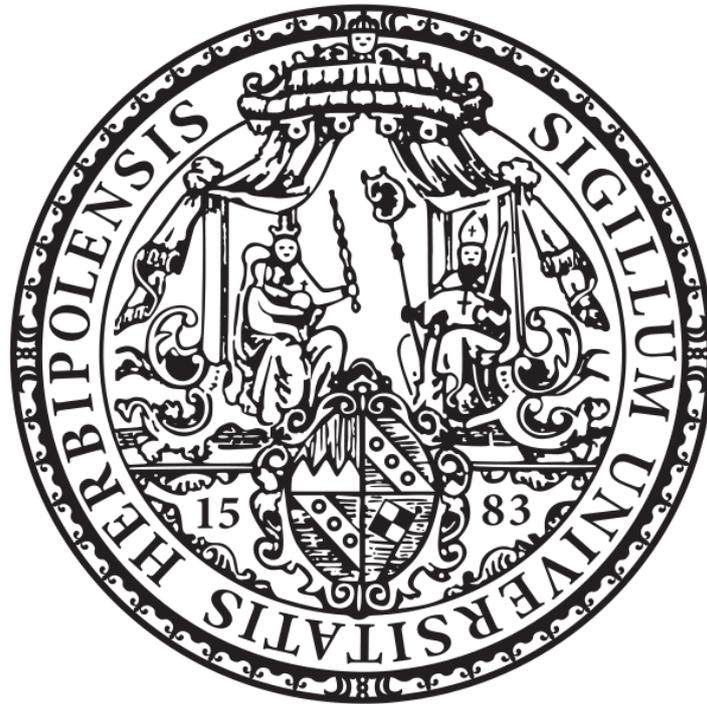


**ERWEITERUNG DES GENETISCHEN MUTATIONSSPEKTRUMS
VERSCHIEDENER KRANKHEITSBILDER UND
IDENTIFIZIERUNG NEUER KRANKHEITSRELEVANTER GENE
IM MENSCHEN
MITTELS *WHOLE EXOME* SEQUENZIERUNG**



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

vorgelegt von
Caroline Lekszas
geboren in Speyer

Würzburg, 2019

Eingereicht am:

MITGLIEDER DER PROMOTIONSKOMMISSION:

Vorsitz:

Erstgutachten: Prof. Dr. Thomas Haaf

Zweitgutachten: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Datum des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2015 bis September 2019 am Institut für Humangenetik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Betreuung von Univ.-Prof. Dr. Thomas Haaf angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Erweiterung des genetischen Mutationsspektrums verschiedener Krankheitsbilder und Identifizierung neuer krankheitsrelevanter Gene im Menschen mittels *Whole Exome* Sequenzierung“ eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig 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. Bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, ist der entsprechende Hypertextlink angegeben.

AFFIDAVIT

The present work was conducted from March 2015 to September 2019 at the Institute of Human Genetics of the Julius-Maximilians-University Würzburg under the supervision of Prof. Dr. Thomas Haaf.

I hereby declare that my thesis entitled: „Expansion of the genetic mutation spectrum of different pathologies and identification of new disease-relevant genes in humans by means of *Whole Exome Sequencing*“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process, neither in identical nor in similar form.

Besides, I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law. For figures taken from the internet, the hyperlink has been added accordingly.

Ort, Datum
Place, Date

Unterschrift
Signature

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
2.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
3.	SUMMARY.....	2
4.	EINLEITUNG.....	3
4.1.	Wandel der molekulargenetischen Sequenziertechniken.....	3
4.2.	<i>Whole Exome</i> Sequenzierung.....	4
4.3.	Skelettdysplasien.....	6
4.4.	Neuropathien.....	7
4.5.	Zielsetzung.....	8
5.	MATERIAL UND METHODEN.....	9
5.1.	Material.....	9
5.1.1.	Patientenproben.....	9
5.1.2.	Chemikalien, Medien und Reagenzien.....	11
5.1.3.	Puffer- und Medien-Zusammensetzungen.....	12
5.1.4.	Bakterienstämme, Enzyme, Morpholinos, Plasmide, Zelllinien.....	13
5.1.5.	Kommerzielle Kits.....	13
5.1.6.	Primer- und Morpholino-Sequenzen.....	14
5.1.7.	Geräte und Hardware.....	15
5.1.8.	Software und Datenbanken.....	15
5.2.	Methoden.....	17
5.2.1.	Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese.....	17
5.2.2.	Sanger-Sequenzierung.....	18
5.2.3.	<i>Whole Exome</i> Sequenzierung.....	21
5.2.4.	<i>Homozygosity Mapping</i>	22
5.2.5.	<i>In-vitro</i> -Spleißanalyse mit Hilfe von Minigen-Konstrukten.....	22
5.2.6.	<i>In-vivo</i> -Spleißanalyse an Patientenproben.....	30
5.2.7.	Extraktion und separate Sequenzierung von Gelbanden.....	31
5.2.8.	Quantitative <i>real-time</i> -PCR.....	31
5.2.9.	Untersuchung der Effekte von verschiedenen <i>vivo</i> Morpholinos auf das <i>MIA3</i> prä-mRNA Spleißen in HeLa-Zellen.....	32
6.	ERGEBNISSE.....	34
6.1.	Überblick über die Analyseergebnisse.....	34

6.2.	Fälle mit pathogenen Mutationen in bekannten krankheitsassoziierten Genen	36
6.2.1.	Familie IRN_1 <i>CPS1</i>	36
6.2.2.	Familie IRN_9 <i>IMPAD1</i>	38
6.2.3.	Familie IRN_10 <i>PYCR1</i>	39
6.2.4.	Familie IRN_11 <i>DNMT3B</i>	41
6.2.5.	Familie IRN_12 <i>PEX7</i>	44
6.2.6.	Familie IRN_13 <i>INPPL1</i>	46
6.2.7.	Familie IRN_15 <i>TRAF3IP1</i>	48
6.2.8.	Familie PAK_1 <i>GCH1</i>	49
6.2.9.	Familie PAK_4 <i>CHST3</i>	51
6.2.10.	Familie PAK_9 <i>MAP3K20</i> <i>NEB</i>	54
6.2.11.	Familie PAK_11 <i>UROC1</i>	57
6.2.12.	Familie PAK_14 <i>SGCA</i>	59
6.2.13.	Familie PAK_15 <i>CAPN3</i>	60
6.2.14.	Familie PAK_16 <i>MTMR2</i>	63
6.2.15.	Familie PAK_18 <i>GAN</i>	64
6.2.16.	Familie PAK_20 <i>ATM</i>	67
6.2.17.	Familie PAK_21 <i>GDAP1</i>	69
6.2.18.	Familie PAK_23 <i>FBN1</i>	71
6.2.19.	Familie PAK_25 <i>ATP7A</i>	73
6.3.	Fälle mit Mutationen in neuen krankheitsrelevanten Genen oder Kandidatengenen.....	75
6.3.1.	Familie IRN_5 <i>SLC10A7</i>	75
6.3.2.	Familie IRN_8 <i>TBX4</i>	78
6.3.3.	Familie IRN_14 <i>MSGN1</i>	79
6.3.4.	Familie BEL_1 <i>MIA3</i>	82
7.	DISKUSSION.....	92
7.1.	Aufklärungsrate	92
7.2.	Fälle mit pathogenen Mutationen in bekannten krankheitsassoziierten Genen	94
7.3.	Fälle mit Mutationen in neuen krankheitsrelevanten Genen oder Kandidatengenen.....	108
7.4.	Ausblick.....	119
8.	LITERATURVERZEICHNIS	IV

9.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIII
10.	TABELLENVERZEICHNIS	XV
11.	DANKSAGUNG	XVI
12.	CURRICULUM VITAE	XVII
13.	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....	XIX
13.1.	Publikationen.....	XIX
13.2.	Kongressbeiträge.....	XX
14.	ANHANG.....	XXI
14.1.	Ethikvotum für die iranische Kohorte	XXI
14.2.	Ethikvotum für die pakistanische Kohorte	XXII
14.3.	Stammbaumlegende	XXIV
14.4.	Unaufgeklärte Fälle.....	XXV
14.4.1.	Familie IRN_2.....	XXV
14.4.2.	Familie IRN_3.....	XXVI
14.4.3.	Familie IRN_4.....	XXVII
14.4.4.	Familie IRN_6.....	XXVIII
14.4.5.	Familie IRN_7.....	XXIX
14.4.6.	Familie IRN_16.....	XXX
14.4.7.	Familie PAK_2.....	XXXI
14.4.8.	Familie PAK_3.....	XXXII
14.4.9.	Familie PAK_5.....	XXXIII
14.4.10.	Familie PAK_6.....	XXXIV
14.4.11.	Familie PAK_7	XXXV
14.4.12.	Familie PAK_8.....	XXXVI
14.4.13.	Familie PAK_10	XXXVII
14.4.14.	Familie PAK_12	XXXVIII
14.4.15.	Familie PAK_13	XXXIX
14.4.16.	Familie PAK_17	XL
14.4.17.	Familie PAK_19	XLI
14.4.18.	Familie PAK_22	XLII
14.4.19.	Familie PAK_24	XLIII
14.4.20.	Familie PAK_26	XLIV

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

	*	Stopcodon
	°	Grad
	∞	Unendlichzeichen
	µg	Mikrogramm
	µl	Mikroliter
	µM	mikromolar
A	A	Adenin
	Abb.	Abbildung
	ad	lat.: <i>ad</i> ; auf
	AK	Antikörper
	Ala	Alanin
	Arg	Arginin
	Asn	Asparagin
	Asp	Asparaginsäure
B	bp	Basenpaare
	bzw.	beziehungsweise
C	C	Celsius Cytosin
	c.	Position auf cDNA-Ebene
	cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
	CGH	engl.: <i>comparative genomic hybridization</i> ; vergleichende genomische Hybridisierung
	Cys	Cystein
D	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
	ddH ₂ O	engl.: <i>double-distilled water</i> ; bidestilliertes Wasser
	ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
	DMEM	engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Eigenname)
	DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
	dpc	engl.: <i>days post coitum</i> ; Tage nach Begattung
	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	engl.	englisch
	Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
	ER	endoplasmatisches Retikulum

	ERES	engl.: <i>endoplasmic reticulum exit sites</i> ; auf den Molekültransport spezialisierte Zonen des ER
	ESE	engl.: <i>exon splice enhancer</i> ; Konsensussequenz für SR Protein
	EtOH	Ethanol
	EZM	extrazelluläre Matrix
F	F	engl.: <i>forward</i> ; vorwärts
	FGF	engl.: <i>fibroblast growth factor</i> ; Fibroblasten-Wachstumsfaktor
	FKS	Fetales Kälberserum
	fmol	Femtomol
	fs	engl.: <i>frameshift</i> ; Verschiebung des Leserasters
G	G	Guanin
	g	Gramm Erdbeschleunigung
	g.	Position auf gDNA-Ebene
	gDNA	genomische DNA
	GfH	Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V.
	ggf.	gegebenenfalls
	Gln	Glutamin
	Glu	Glutaminsäure
	Gly	Glycin
H	HCl	Summenformel für Chlorwasserstoff
	HEK	engl.: <i>human embryonic kidney</i> ; humane embryonale Niere
	HeLa	Henrietta Lacks (Eigenname)
	HGMD	engl.: <i>Human Gene Mutation Database</i> (Eigenname)
	His	Histidin
	HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> ; Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
I	ICCBH	engl.: <i>International Conference on Children's Bone Health</i> (Eigenname)
	Ile	Isoleucin
J	-	
K	K	Kontrolle
	kb	Kilobasen
L	L	Liter
	lat.	lateinisch
	LB	engl.: <i>lysogeny broth</i> (Eigenname); Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
	Leu	Leucin

	linc	engl.: <i>long intergenic noncoding</i> ; lange intergenische nicht-codierende
	Lys	Lysin
M	M	molar
	MAF	engl.: <i>minor allele frequency</i> ; Frequenz des selteneren Allels
	Mb	Megabasen
	MEM	engl.: <i>Minimum Essential Medium Eagle</i> (Eigenname)
	Met	Methionin
	mg	Milligramm
	Min.	Minute
	ml	Milliliter
	mM	millimolar
	Mnt	Mutante
	mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
N	NaOAc	Natriumacetat
	NGS	engl.: <i>Next Generation Sequencing</i> (Eigenname)
	NTP	Nukleosidtriphosphat
O	OMIM	engl.: <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (Eigenname)
P	p.	Position auf Aminosäure-Ebene
	PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
	PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
	pH	lat.: <i>potentia hydrogenii</i> ; Wert für die Azidität oder Basizität einer wässrigen Lösung
	PNS	peripheres Nervensystem
	Pro	Prolin
Q	qPCR	quantitative PCR
R	R	Arginin (Einbuchstabencode) engl.: <i>reverse</i> ; gegenläufig
	rpm	engl.: <i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
	RT	Raumtemperatur engl.: <i>real-time</i> ; Echtzeit
	RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
S	S	Serin (Einbuchstabencode)
	SAP	engl.: <i>shrimp alkaline phosphatase</i> ; alkalische Phosphatase aus Shrimps
	Sek.	Sekunde
	Ser	Serin
	SNP	engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelnukleotid-Polymorphismus

	snRNP	engl.: <i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i> ; kleine nukleäre Ribonukleoprotein-Partikel
	Std.	Stunde
T	T	Thymin
	TAE	TRIS-Acetat-EDTA
	Thr	Threonin
	T _m	Schmelztemperatur
	Trp	Tryptophan
	Tyr	Tyrosin
U	u.a.	unter anderem
	UN	untransfiziert
V	V	Volt
	Val	Valin
W	WES	engl.: <i>Whole Exome Sequencing</i> /Sequenzierung (Eigenname)
	WT	Wildtyp
X	-	
Y	-	
Z	z.B.	zum Beispiel
	ZNS	zentrales Nervensystem

2. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der rasanten Entwicklung molekulargenetischer Analysemethoden sind die Auslöser vieler Erbkrankheiten bislang ungeklärt. Eine Identifikation der genetischen Ursache einer Erkrankung ist jedoch essenziell, um zusätzliche invasive Tests vermeiden, adäquate Therapiemaßnahmen in die Wege leiten, akkurate Prognosen stellen und eine entsprechende genetische Beratung anbieten zu können. *Next Generation Sequencing* (NGS)-basierte Techniken wie die *Whole Exome* Sequenzierung (WES) haben die humangenetische Forschung und Diagnostik in den letzten Jahren revolutioniert. Die WES ermöglicht die Sequenzierung der Exons aller proteincodierenden Gene von mehreren Individuen gleichzeitig und stellt ein hilfreiches Werkzeug bei der Suche nach neuen krankheitsrelevanten Genen im Menschen dar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung genetischer Ursachen verschiedenster Erkrankungen in konsanguinen Familien aus dem nahen und mittleren Osten mittels WES. Insgesamt wurden 43 Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern untersucht, darunter viele mit Skelettdysplasien oder Neuropathien. In 22 Fällen (51%) konnte die entsprechende krankheitsverursachende Mutation auffindig gemacht werden. In 21% der aufgeklärten Fälle wurden Sequenzvarianten detektiert, die in der Literatur bereits als pathogen beschrieben wurden, während 63% bisher noch unbekannte Mutationen in bereits als krankheitsrelevant beschriebenen Genen darstellten. Zudem konnten im Rahmen dieser Arbeit drei neue, für den Menschen krankheitsrelevante Gene identifiziert werden, *solute carrier family 10 member 7* (*SLC10A7*), *T-box 4* (*TBX4*) und *MIA SH3 domain ER export factor 3* (*MIA3*). *SLC10A7* codiert für einen Transporter aus der Familie der *solute carrier*, der in der Plasmamembran verankert ist. In dieser Arbeit geleistete Analyseergebnisse konnten zu der Erstbeschreibung von homozygoten pathogenen *SLC10A7*-Mutationen als Ursache für eine Skelettdysplasie mit Amelogenesis imperfecta beitragen. Bei *TBX4* handelt es sich um einen hochkonservierten Transkriptionsfaktor, der während der embryonalen Entwicklung an der Ausbildung der unteren Extremitäten beteiligt ist. Homozygote pathogene *TBX4*-Mutationen wurden im Kontext dieser Arbeit erstmalig mit einer posterioren Amelie mit Becken- und Lungenhypoplasie in Verbindung gebracht. *MIA3* ist ein Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums, das eine essenzielle Rolle bei der Proteinsekretion spielt. Die hier vorgestellten Patienten mit homozygoten pathogenen *MIA3*-Mutationen zeigen eine komplexe syndromale Erkrankung, die sich hauptsächlich in einer Kollagenopathie, Diabetes mellitus und milder mentaler Retardierung manifestiert und ein neues Krankheitsbild darstellt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse erweitern somit zum einen das Mutationsspektrum verschiedener bekannter Krankheitsbilder und offenbaren zum anderen neue krankheitsrelevante Gene im Menschen.

3. SUMMARY

Despite the rapid development of molecular genetic analysis methods, the causes of many hereditary diseases are still unknown. However, it is essential to identify the genetic cause of a disease in order to avoid additional invasive tests, to initiate adequate therapeutic measures, to be able to provide accurate prognoses, and to offer appropriate genetic counselling. Over the past years, Next Generation Sequencing (NGS)-based technologies such as Whole Exome Sequencing (WES) have revolutionized research and diagnostics in human genetics. WES enables sequencing of the exons of all protein-coding genes from several individuals simultaneously and is a powerful tool in identifying new disease-relevant genes in humans.

The present work deals with the elucidation of genetic disease causes in consanguineous families from the Near and Middle East by means of WES. A total of 43 patients with various clinical phenotypes were examined, including many with skeletal dysplasias or neuropathies. In 22 cases (51%), the genetic cause of the disease could be found. In 21% of the solved cases, sequence variants were detected that were already described as pathogenic in the literature, while 63% showed previously unknown mutations in genes already described as disease-relevant in humans. In addition, three new disease-relevant genes could be identified within the scope of this work: solute carrier family 10 member 7 (*SLC10A7*), T-box 4 (*TBX4*) and MIA SH3 domain ER export factor 3 (*MIA3*). *SLC10A7* encodes a transporter from the family of solute carriers, which is anchored in the plasma membrane. The analysis results performed in this study could contribute to the first description of homozygous pathogenic *SLC10A7* mutations as the cause of a novel skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta. *TBX4* is a highly conserved transcription factor that is involved in the formation of the lower extremities during embryonic development. Homozygous pathogenic *TBX4* mutations were associated for the first time with posterior amelia with pelvic and pulmonary hypoplasia in the context of this study. *MIA3* is a transmembrane protein of the endoplasmic reticulum that plays an essential role in the secretory pathway. The patients presented here with homozygous pathogenic *MIA3* mutations show a complex syndromal disease manifesting mainly in a collagenopathy, diabetes mellitus, and mild mental retardation, representing a novel clinical picture.

The results obtained within the scope of this work expand on the one hand the range of mutations of various known diseases and on the other hand reveal novel disease-relevant genes in humans.

4. EINLEITUNG

4.1. Wandel der molekulargenetischen Sequenziertechniken

Seit der Entwicklung einer Methode zur Identifizierung der Basenabfolge von DNA-Sequenzen durch Frederick Sanger (*1918-†2013) und Kollegen in den 1970er Jahren (Sanger, Nicklen et al. 1977) und der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms im Rahmen des Humangenomprojekts (Consortium 2004) haben die molekulargenetischen Sequenziertechniken einen enormen Wandel erfahren. Während die Sequenzierung nach Sanger auf der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach einer Kettenabbruchreaktion beruht und zunächst nur die gezielte Analyse einzelner DNA-Abschnitte erlaubte (siehe Kapitel 5.2.2), können über Sequenziermethoden der zweiten Generation mittlerweile Gen-Panel und Exome mehrerer Individuen gleichzeitig oder gar komplette Genome in einem Durchlauf sequenziert werden (*Next Generation Sequencing*; NGS). Als „Exom“ wird die Gesamtheit aller Exons von Protein-codierenden Genen bezeichnet, die beim Menschen etwa 1-2% des Genoms, also der gesamten genetischen Information eines Organismus, ausmachen. NGS-basierte Techniken ermöglichen somit die effiziente Generierung großer Sequenz-Datenmengen, was die Entwicklung neuer Analysetools und -strategien erforderte. Im Laufe der Zeit wurden öffentlich zugängliche Online-Datenbanken mit Informationen zu Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism*; SNP), zur Pathogenität einzelner Varianten und sogar mit ganzen Exomen und Genomen gespeist, um die Beurteilung von Sequenzvarianten zu erleichtern. Die anfänglich sehr hohen Kosten für NGS werden durch die beständige Weiterentwicklung der Techniken und Protokolle und durch die zunehmende Automatisierung von Arbeitsschritten stetig gesenkt.

Im Jahr 2011 wurde erstmalig vom erfolgreichen Einsatz einer *Whole Exome* Sequenzierung (WES) zur Diagnosefindung in einem bis dahin ungeklärten Fall berichtet (Worthey, Mayer et al. 2011). Nachdem bei einem 15 Monate alten Kind mit einer entzündlichen Darmerkrankung die genetische Ursache über konventionelle Methoden nicht aufgefunden werden konnte, führte eine WES schließlich zur Identifizierung einer bis dahin noch nicht beschriebenen Sequenzvariante im Gen *XIAP* (*X-linked inhibitor of apoptosis*), die als Ursache für die Erkrankung des Kindes bestätigt werden konnte. Seitdem gewann die WES zunehmend an Bedeutung für das Aufspüren neuer krankheitsrelevanter Gene und neuer kausaler Varianten in bereits bekannten krankheitsassoziierten Genen im Menschen (Warr, Robert et al. 2015). Vor allem für Patienten, die schwierig zu diagnostizieren sind, für junge Patienten, bei denen sich das volle Symptomspektrum noch nicht ausprägt (Iglesias, Anyane-Yeboah et al. 2014), für Patienten mit schwer progressiven Erkrankungen (Bras and Singleton 2011, Sassi, Guerreiro et al. 2014) und für die pränatale Diagnostik (Xu, Xiao et al. 2014) ist die WES ein nützliches Instrument (Warr, Robert et al. 2015). Die Identifikation der genetischen Ursache einer Erkrankung ist essenziell, um adäquate Therapiemaßnahmen in die Wege leiten, zusätzliche invasive Tests vermeiden, die oft als quälend empfundene

Ungewissheit beenden, akkurate Prognosen geben sowie eine sichere Diagnose stellen zu können, welche wiederum Voraussetzung für die Teilnahme an klinischen Studien ist (Grossmann, Tiacci et al. 2011, Rabbani, Mahdih et al. 2012, Taneri, Asilmaz et al. 2012, Iglesias, Anyane-Yeboah et al. 2014, Warr, Robert et al. 2015). Die Charakterisierung neuer krankheitsrelevanter Gene und ein daraus resultierendes Verständnis für den Pathomechanismus sind zudem ausschlaggebend für die Entwicklung neuer Therapieansätze. NGS-basierte Sequenzieretechniken werden aber nicht nur in der humanogenetischen Forschung und Diagnostik, sondern auch für die Grundlagenforschung an Modellorganismen oder agrarwissenschaftliche Zwecke genutzt, indem relevante genetische Marker zur Ertragssteigerung oder für die wirtschaftliche Optimierung der Masttierhaltung aufgefunden werden und bei der Züchtung Anwendung finden können. Hierfür vertreiben die Anbieter der großen NGS-Plattformen u.a. entsprechende Kits für die Sequenzierung von Nutzpflanzen und -Tieren.

Die Etablierung der Sequenzieretechniken der zweiten Generation ermöglichte somit eine Generierung und Analyse von Sequenzierdaten in einer bis dahin nie dagewesenen Geschwindigkeit und Tiefe und hat die molekulargenetische Forschung und Diagnostik in den letzten Jahren revolutioniert.

4.2. *Whole Exome* Sequenzierung

Bei der *Whole Exome* Sequenzierung handelt es sich um eine NGS-basierte Technik, mit Hilfe derer alle Protein-codierenden Bereiche der DNA sequenziert und analysiert werden können. Häufig werden zusätzlich aber auch nicht Protein-codierende Gene angereichert und analysiert, die beispielsweise für funktionale Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*; RNA) codieren, wie microRNAs oder *long intergenic noncoding* (linc) RNAs.

Für eine WES stehen verschiedene kommerzielle Plattformen wie die von Illumina, Agilent Technologies oder NimbleGen (Roche) zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Illumina-Plattform genutzt. Hierbei werden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte zunächst angereichert und schließlich im Hochdurchsatz auf einem Glasobjektträger mit kleinen Kanälen, durch die Reagenzien gepumpt werden können (*Flowcell*), sequenziert. Die kommerziellen Kits mit den dazugehörigen Protokollen wurden im Laufe der Zeit stetig weiterentwickelt, weshalb sich die Anreicherung der DNA *Library* zwischen den verschiedenen Kits in einigen Punkten unterscheidet. Grundsätzlich ist jedoch allen Anreicherungsprotokollen von Illumina gemein, dass die zu untersuchende DNA fragmentiert wird und jedes Fragment mit Bindestellen für die Sequenzierprimer, Indizes und Sequenzen, die komplementär zu den Oligonukleotiden auf der *Flowcell* sind, versehen wird (Abbildung 4.1A). Nach PCR-basierter Anreicherung der DNA-Fragmente folgt die Cluster-Generierung auf der *Flowcell*. Bei der Cluster-Generierung wird jedes Fragment isotherm über einen sogenannten *Bridge Amplification* Prozess klonal amplifiziert (Abbildung 4.1B). Hierbei entstehen Millionen an Cluster, von denen zunächst nur der *forward* Strang zur Sequenzierung genutzt wird. Der Sequenzierprozess besteht aus einer Aneinanderreihung von Zyklen. In jedem Zyklus konkurrieren die vier farblich unterschiedlich markierten Nukleotide um die nächste

Position am naszierenden Strang (Abbildung 4.1C). Der Einbau der komplementären Base führt dann zu einem entsprechenden Lichtsignal (*sequencing by synthesis*). Die Abfolge an Lichtsignalen liefert somit Auskunft über die Sequenz des untersuchten DNA-Fragments und die Anzahl an Zyklen bestimmt die Länge der *Reads*, die generiert werden. Auf diese Weise können unzählige DNA-Fragmente verschiedener Proben gleichzeitig sequenziert werden (*massive parallel sequencing*), wobei die Zugehörigkeit zu einzelnen Individuen über die Indexsequenzen zurückverfolgt werden kann. Nachdem die Sequenzierung des *forward* Strangs abgeschlossen ist, folgt die Sequenzierung des *reverse* Strangs, es wird also in beide Richtungen (*paired end*) sequenziert. Zusammengehörige *forward* und *reverse Reads* werden von einer Software erkannt und schließlich an das humane Referenzgenom aligniert, sodass entsprechende Programme Abweichungen der generierten *Reads* vom humanen Referenzgenom detektieren können (Abbildung 4.1D).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit verschiedensten Erkrankungen, darunter insbesondere Skelettdysplasien und Neuropathien, mittels *Whole Exome* Sequenzierung untersucht, weshalb im Folgenden näher auf diese beiden klinischen Entitäten eingegangen wird.

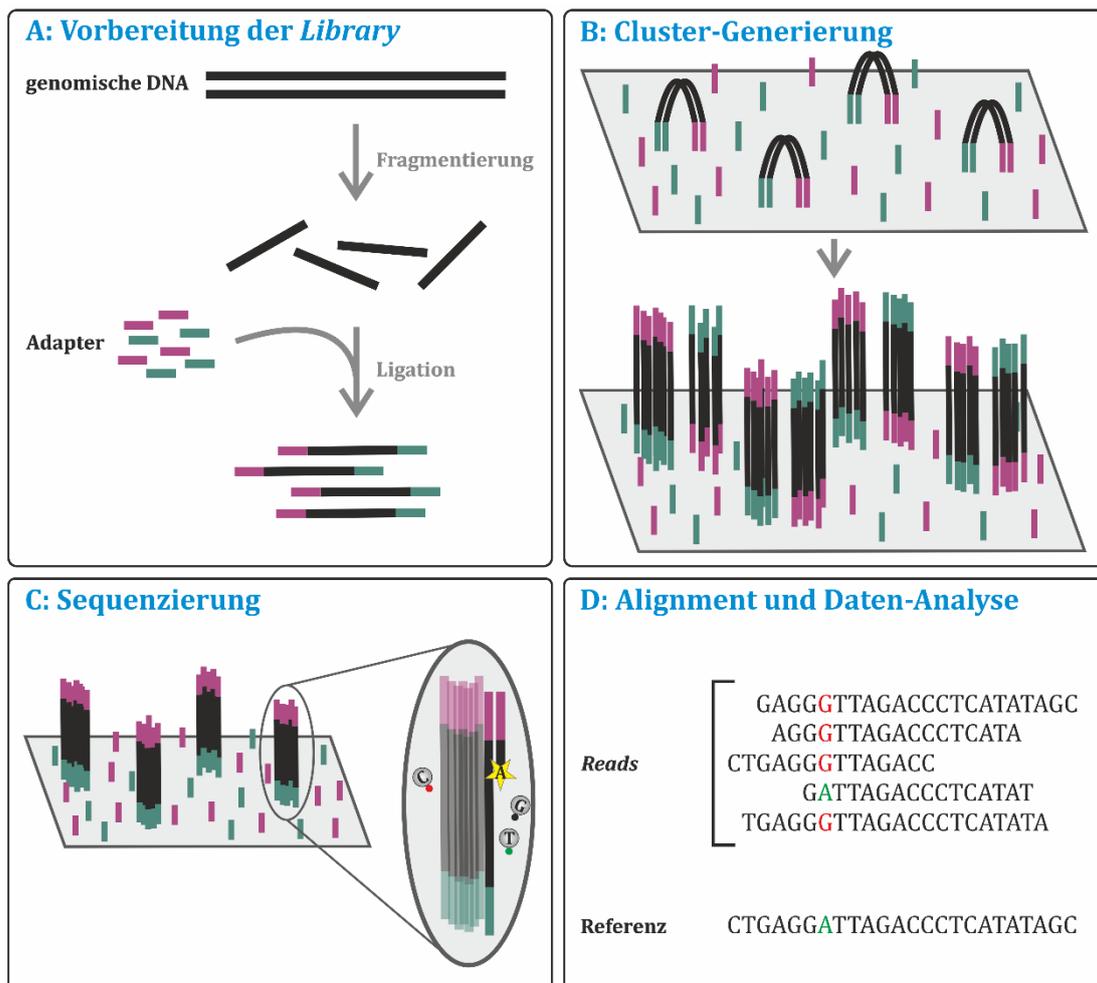


Abbildung 4.1: Arbeitsschritte für die Illumina *Whole Exome* Sequenzierung. Das Protokoll beinhaltet die Fragmentierung der zu untersuchenden DNA und die Adapter-Ligation (A), die Cluster-Generierung über den *Bridge Amplification* Prozess (B), die Sequenzierung der Fragmente auf der Flowcell (C), sowie die Daten-Analyse (D). Erstellt nach Vorlage von https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf.

4.3. Skelettdysplasien

Das menschliche Skelett (griechisch: skeletós; „ausgetrockneter Körper“) besteht aus 206 Knochen, darunter 126 des appendikulären und 74 des axialen Skeletts, sowie sechs Gehörknöchelchen. Zum appendikulären Skelett zählen die Knochen des Schulter- und Beckengürtels sowie die der Extremitäten. Das axiale Skelett besteht aus dem Rumpf mit Wirbelsäule, dem Brustbein, den Rippen und dem Kreuzbein. Appendikuläres und axiales Skelett gehören zum postcranialen (lateinisch: *post*; „nach, hinter“ und *cranium*; „Schädel“) Teil des Wirbeltierskeletts, welcher vom cranialen Teil abgegrenzt wird. Knochen- und Knorpelgewebe bilden zusammen mit Muskeln, Sehnen und Bändern das muskuloskeletale System, den Stütz- und Bewegungsapparat eines Lebewesens, der für das Längenwachstum und die Bildung der Blutzellen verantwortlich ist, als Mineralstoffreservoir dient und einen Schutz der inneren Organe bietet (Krakow and Rimoin 2010).

Im Menschen werden zwei unterschiedliche Prozesse der Knochenbildung unterschieden, die desmale und die chondrale Ossifikation. Beide Prozesse beginnen mit der Kondensierung mesenchymaler Zellen an den Stellen, wo später Knochen entstehen soll (Hall and Miyake 2000, Kronenberg 2003, Karsenty, Kronenberg et al. 2009, Krakow and Rimoin 2010). Bei der desmalen Ossifikation, durch die Schädeldach, Gesichtsschädel, sowie das Schlüsselbein gebildet werden, differenzieren sich mesenchymale Zellen direkt zu Osteoblasten. Die chondrale Ossifikation ist dadurch gekennzeichnet, dass aus den Mesenchymzellen zunächst Chondrozyten (Zellen des Knorpelgewebes) entstehen, bevor es zur vollständigen Verknöcherung kommt. Die Röhrenknochen des Menschen werden in Diaphyse, Metaphyse und Epiphyse untergliedert. Zwischen der Metaphyse und der Epiphyse befindet sich die Epiphysenfuge, an der durch enchondrale Ossifikation (Verknöcherung von innen her) das Längenwachstum der Röhrenknochen stattfindet, während die perichondrale Ossifikation (Verknöcherung von außen) entlang der Diaphyse dem Dickenwachstum dient (appositionelles Wachstum).

Die Skelettdysplasien oder Osteochondrodysplasien (griechisch: ostéon; „Knochen“ und chondrós; „Knorpel“) beschreiben eine klinisch und genetisch äußerst heterogene Gruppe von Störungen der Bildung, des Wachstums und der Homöostase von Knochengewebe. Sie verursachen in vielen Fällen einen disproportionierten Minderwuchs und können je nach Funktion des krankheitsverursachenden Gens neben dem Skelett auch andere Strukturen und Organsysteme betreffen. Ein proportionierter Minderwuchs ist, mit einigen Ausnahmen, dagegen meist eher durch endokrinologische Störungen, Mangelernährung oder anderweitig teratogene Ursachen bedingt (Krakow and Rimoin 2010). Skelettdysplasien werden u.a. durch pathogene Mutationen in Genen verursacht, die für Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM), Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressoren, Signaltransduktionsmoleküle, Zilienproteine, Enzyme, Transporter, Chaperone oder RNA prozessierende Proteine codieren und treten mit einer Häufigkeit von etwa 1:5000 Neugeborenen auf (Orioli, Castilla et al. 1986, Krakow and Rimoin 2010). Das klinische Spektrum reicht dabei von mild betroffenen bis zu letalen Phänotypen, bei denen meist eine Thoraxhypoplasie die

Entwicklung und Funktionstüchtigkeit der Lungen beeinträchtigt (Dighe, Fligner et al. 2008, Geister and Camper 2015). Die klinische Zuordnung von Skelettdysplasien stellt häufig eine große Herausforderung dar. Zum einen können verschiedene Mutationen im selben Gen unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen, zum anderen kann auch der gleiche Phänotyp von Mutationen in unterschiedlichen Genen verursacht werden (Geister and Camper 2015, Chen, Jiang et al. 2016). Eine Diagnose wird meist über körperliche, molekulargenetische und radiologische Untersuchungen erzielt. In der zuletzt veröffentlichten Version einer kontinuierlich überarbeiteten Nosologie aus dem Jahr 2015 werden 436 verschiedene Skelettdysplasien beschrieben, die in 42 Gruppen unterteilt werden und 336 bekannte krankheitsverursachende Gene aufgeführt (Bonafe, Cormier-Daire et al. 2015). Zudem wurde die Online-Datenbank „Skeleton Genetics“ entwickelt, die u.a. alle bekannten, mit einer Skelettdysplasie in Verbindung stehenden Gene, Mutationen und Signalwege beinhaltet (Chen, Jiang et al. 2016). In schwierigen Fällen können das „International Skeletal Dysplasia Registry“ und das „European Skeletal Dysplasia Network“ bei der Diagnosefindung helfen.

4.4. Neuropathien

Das menschliche Nervensystem wird topographisch in das zentrale und das periphere Nervensystem untergliedert. Das zentrale Nervensystem (ZNS) umfasst Gehirn und Rückenmark und wird von der Blut-Hirn-Schranke vor einem unkontrollierten Übertritt von Blutbestandteilen geschützt. Zum peripheren Nervensystem (PNS) zählt das Nervengeflecht der Haut und der Muskulatur außerhalb des ZNS. ZNS und PNS sind wiederum in das somatische und vegetative/autonome Nervensystem unterteilt. Das somatische Nervensystem ermöglicht die bewusste Wahrnehmung von Umweltreizen und des eigenen Körpers sowie entsprechend willkürliche Reaktionen. Das vegetative Nervensystem dient der Aufrechterhaltung lebenswichtiger Körperfunktionen wie Herzschlag, Atmung und Stoffwechsel und kann im Gegensatz zum somatischen Nervensystem nicht willentlich beeinflusst werden.

Auf zellulärer Ebene ist das Nervensystem aus Nervenzellen (Neuronen) und Gliazellen aufgebaut. Neuronen sind auf die Erregungsweiterleitung spezialisierte Zellen und bestehen aus einem Zellkörper (Soma) sowie zweierlei Zellfortsätzen, den verästelten Dendriten, die Erregung von anderen Neuronen aufnehmen, und dem Axon, einem von einer Myelinschicht aus Gliazellen ummantelten Fortsatz, der Spannungsänderungen weiterleitet. Die Enden eines Axons stehen über Synapsen in Verbindung zu den Dendriten anderer Nervenzellen, zu den neuromuskulären Endplatten von Muskelzellen oder zu Drüsenzellen und leiten die Erregung meist über Botenstoffe (Neurotransmitter), in einigen Fällen aber auch direkt elektrisch weiter. Je nach Richtung der Erregungsleitung unterscheidet man afferente Nervenzellen, die sensorische Stimuli über die Sinnesorgane an das ZNS übermitteln, und efferente Nervenzellen (Motoneurone), die motorische Stimuli vom ZNS an die Muskeln weiterleiten, damit der Organismus adäquat auf wahrgenommene Reize reagieren kann. Hierbei läuft der Informationsfluss, mit Ausnahme des Reflexbogens, vom Gehirn über das 1. (obere) Motoneuron auf das 2. (untere) Motoneuron bis hin zum Muskel. Die Gliazellen stellen

eine heterogene Gruppe nichtneuronaler Zellen dar. Sie übernehmen wichtige Funktionen während der Ontogenese, sowie Isolations- und Pufferfunktionen und sind an der Informationsverarbeitung beteiligt.

Als Neuropathie wird eine Erkrankung des peripheren Nervensystems bezeichnet. Primäre, also von der Nervenzelle selbst ausgehende Neuropathien sind meist vererbt und eher selten, wohingegen sekundäre Neuropathien in Folge anderer Erkrankungen auftreten oder durch neurotoxische Substanzen ausgelöst werden können und wesentlich häufiger vorkommen. Während bei einer Mononeuropathie nur ein Neuron betroffen ist, treten bei einer Polyneuropathie Schädigungen in mehreren Nervenzellen auf. Die Polyneuropathien unterteilen sich je nach Lokalisation der Schädigung wiederum in axonale Formen, die durch ein Zugrundegehen des Axons gekennzeichnet sind, und demyelinisierende Formen, bei denen eine Schädigung der Myelinscheide vorliegt, wodurch die Nervenleitgeschwindigkeit beeinträchtigt wird. Polyneuropathien äußern sich insbesondere durch Taubheitsgefühle und Missempfindungen, häufig begleitet von einem Schwächegefühl und Schmerzen. Die meisten Formen entwickeln sich über eine lange Zeitspanne (Monate oder Jahre), einige verlaufen aber auch schnell progressiv. Aufgrund unterschiedlicher Bewertungsprotokolle und Untersuchungskohorten schwankt die Prävalenzangabe einzelner Studien, scheint in der Gesamtbevölkerung aber etwa 1% zu betragen und bei älteren Menschen auf bis zu 7% anzusteigen (Hanewinkel, van Oijen et al. 2016). Chronische Polyneuropathien treten in westlichen Industrienationen häufiger auf als in Entwicklungsländern. Zu den Risikofaktoren in den westlichen Ländern zählen vor allem Diabetes, Alkoholabusus, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die Einnahme von zytostatischen Medikamenten. In den Entwicklungsländern hingegen werden Polyneuropathien vor allem durch übertragbare Infektionskrankheiten ausgelöst. Neben den bekannten Ursachen erblicher und erworbener Polyneuropathien bleiben ~20-30% der Fälle idiopathisch (Hanewinkel, van Oijen et al. 2016). Zur Diagnosefindung können verschiedene körperliche Untersuchungen wie Reflextests, Elektroneurogramme, Elektromyogramme, histologische und labordiagnostische Untersuchungen dienen. Behandlungsmöglichkeiten sind von der jeweiligen Ätiologie abhängig.

4.5. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, über WES das genetische Mutationsspektrum verschiedener Krankheitsbilder zu erweitern, sowie gegebenenfalls neue krankheitsrelevante Gene im Menschen aufzuspüren. Für die Analyse standen hauptsächlich konsanguine (lateinisch: *con*; „mit“ und *sanguis*; „Blut“) Familien aus dem nahen und mittleren Osten (Iran, Pakistan, Türkei) mit unterschiedlichen Erkrankungen, darunter insbesondere Skelettdysplasien und Neuropathien, zur Verfügung (siehe Kapitel 5.1.1). Hierbei sollte die Relevanz der Blutsverwandtschaft innerhalb der analysierten Familien sowie die der klinischen Beschreibung im Hinblick auf die Aufklärungsrate der Studie in einen wissenschaftlichen Kontext gebracht werden.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Material

5.1.1. Patientenproben

Die in dieser Doktorarbeit analysierten Patientenproben wurden von externen Kollaborationspartnern rekrutiert und zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 16 Familien aus dem Iran (Kollaborationspartner: Dr. Reza Maroofian), 26 Familien aus Pakistan (Kollaborationspartner: Dr. Hyung-Goo Kim) sowie eine Familie aus Belgien (Kollaborationspartnerin: Prof. Dr. Rita Cauwels) untersucht (Tabelle 5.1). Der klinische Phänotyp der Patienten wurde entweder durch die betreuenden Ärzte vor Ort beschrieben oder musste anhand weniger Fotos ermittelt werden. In einigen Fällen lag jedoch weder eine detaillierte klinische Beschreibung vor, noch konnten pathologische Veränderungen über die Fotos festgestellt werden. Einverständniserklärungen der Patienten zu den durchgeführten Analysen, die Erlaubnis Patientenbilder mit zensierten Augen zu zeigen, sowie entsprechende Ethikvoten liegen vor.

Tabelle 5.1: Auflistung der für diese Arbeit untersuchten Patienten.

Familie	Phänotyp	KollaborationspartnerIn
IRN_1	neonatal letale metabolische Erkrankung	Dr. Reza Maroofian
IRN_2	unklare syndromale Erkrankung	Dr. Reza Maroofian
IRN_3	neonatal letale Herzinsuffizienz	Dr. Reza Maroofian
IRN_4	neonatal letale Immundefizienz	Dr. Reza Maroofian
IRN_5	unklare Osteochondrodysplasie	Dr. Reza Maroofian
IRN_6	unklare Bindegewebserkrankung	Dr. Reza Maroofian
IRN_7	unklare syndromale Erkrankung	Dr. Reza Maroofian
IRN_8	Dysmelie bei Fehlgeburten	Dr. Reza Maroofian
IRN_9	unklare Osteochondrodysplasie	Dr. Reza Maroofian
IRN_10	unklare Bindegewebserkrankung	Dr. Reza Maroofian
IRN_11	unklare syndromale Erkrankung	Dr. Reza Maroofian
IRN_12	unklare Osteochondrodysplasie	Dr. Reza Maroofian
IRN_13	Extremitätenfehlbildung	Dr. Reza Maroofian
IRN_14	Fehlbildung der vorderen Extremitäten	Dr. Reza Maroofian
IRN_15	unklare Osteochondrodysplasie	Dr. Reza Maroofian
IRN_16	unklare Osteochondrodysplasie	Dr. Reza Maroofian
PAK_1	Dystonie unklarer Ursache	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_2	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung, ansonsten keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_3	keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_4	unklare Osteochondrodysplasie	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_5	keine eindeutige klinische Beschreibung	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_6	keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_7	atrophe Extremitäten und Fußfehlbildung	Dr. Hyung-Goo Kim

Familie	Phänotyp	KollaborationspartnerIn
PAK_8	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung, Exotropie, Polydaktylie	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_9	<i>Pectus excavatum</i> , Skoliose, Scapulae alatae	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_10	keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_11	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung und Gangschwierigkeiten	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_12	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung, Esotropie	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_13	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung, ansonsten keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_14	keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_15	keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_16	unklare Neuropathie	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_17	atrophe Extremitäten	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_18	atrophe Extremitäten	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_19	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung, ansonsten keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_20	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung, ansonsten keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_21	unklare Neuropathie	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_22	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung, ansonsten keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_23	unklare Brustkorbfehlbildung, Fingergelenkkontrakturen, Arachnodaktylie	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_24	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung, ansonsten keine eindeutige klinische Beschreibung	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_25	intellektuell-kognitive Beeinträchtigung, ansonsten keine eindeutige klinische Beschreibung, Fotos nicht informativ	Dr. Hyung-Goo Kim
PAK_26	<i>Pectus excavatum</i> , Kontrakturen der Finger	Dr. Hyung-Goo Kim
BEL_1	unklare Kollagenopathie	Prof. Dr. Rita Cauwels

5.1.2. Chemikalien, Medien und Reagenzien

Tabelle 5.2: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Medien und Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate sodium salt solution	Sigma-Aldrich
2'-Deoxycytidine 5'-triphosphate disodium salt	Sigma-Aldrich
2'-Deoxyguanosine 5'-triphosphate trisodium salt solution	Sigma-Aldrich
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus	Solis BioDyne
Ammoniumsulfat	Merck KGaA
Ampuwa®	Fresenius SE & Co. KGaA
BigDye® Terminator v1.1 Cycle	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific
BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific
Buffer EB	QIAGEN
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG
CutSmart® Buffer	NEW ENGLAND BioLabs®, Inc.
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	anprotec
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH + Co. KG
Fetal Bovine Serum	anprotec
FuGENE® HD Transfection Reagent	Roche
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific
HDGreen™ DNA Stain	Intas Pharmaceuticals Ltd.
HiDi™ Formamide	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific
LB-Agar (Luria/Miller), granuliert	Carl Roth GmbH + Co. KG
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Magnesiumsulfat	Merck KGaA
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich
PCR_x Enhancer System	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific
peqGOLD Universal Agarose	VWR® Life Science
Thymidine 5'-triphosphate sodium salt solution	Sigma-Aldrich
Tris ultrapure	PanReac AppliChem ITW Reagents
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Sigma-Aldrich
Wasser, ROTISOLV® HPLC Gradient Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG
QIAzol™ Lysis Reagent	QIAGEN

5.1.3. Puffer- und Medien-Zusammensetzungen

Ammonium-Puffer (10x)

75 ml 1 M Tris-HCl, pH: 8,8
 2,64 g Ammoniumsulfat
 100 µl Tween® 20
 →ad 100 ml mit ddH₂O

DMEM/10% FKS

500 ml DMEM
 50 ml FKS (zuvor 30 Min. bei 56°C inaktiviert)

LB-Medium (flüssig)

25 g LB-Medium (Luria/Miller)
 →ad 1 L mit ddH₂O und autoklavieren
 →Antibiotikum in gewünschter Konzentration zugeben

LB-Agar zum Ausgießen von Petrischalen

40 g LB-Agar (Luria/Miller), granuliert
 →ad 1 L mit ddH₂O und autoklavieren
 →Antibiotikum in gewünschter Konzentration zugeben

Puffer B (5x)

4 ml Ammonium-Puffer (10x)
 80 µl 100mM dATP
 80 µl 100mM dTTP
 80 µl 100mM dCTP
 80 µl 100mM dGTP
 1,76 ml 50mM Magnesiumsulfat
 8 ml PCR_x Enhancer
 19,2 ml ddH₂O

TAE-Puffer (50x)

484 g Tris ultrapure
 200 ml 0,5 M EDTA, pH: 8,0
 800 ml ddH₂O
 114,2 ml Essigsäure
 →ad 2 L mit ddH₂O
 →pH auf 8,3 einstellen

5.1.4. Bakterienstämme, Enzyme, Morpholinos, Plasmide, Zelllinien

Tabelle 5.3: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Enzyme, Morpholinos, Plasmide und Zelllinien.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Bam</i> HI	NEW ENGLAND BioLabs®, Inc.
ExoSAP-IT®	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific
HEK293T-Zelllinie	AG Prof. Dr. med. Brenda Gerull, Abteilung für kardiovaskuläre Genetik, Universitätsklinikum Würzburg
HeLa-Zelllinie	AG Prof. Dr. med. Brenda Gerull, Abteilung für kardiovaskuläre Genetik, Universitätsklinikum Würzburg
hu_mia3_ex8_ESE <i>vivo</i> Morpholino	Gene Tools, LLC
Mango Taq™ DNA Polymerase	Bioline
NEB® 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	NEW ENGLAND BioLabs®, Inc.
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific
pSPL3b-cam Vektor	AG Prof. Dr. Manfred Gessler, Lehrstuhl für Entwicklungsbiochemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
T4 DNA Ligase	NEW ENGLAND BioLabs®, Inc.
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	NEW ENGLAND BioLabs®, Inc.
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	NEW ENGLAND BioLabs®, Inc.
Q5® Reaction Buffer	NEW ENGLAND BioLabs®, Inc.
<i>Vivo</i> Standard Control Morpholino	Gene Tools, LLC
<i>Xho</i> I	NEW ENGLAND BioLabs®, Inc.

5.1.5. Kommerzielle Kits

Tabelle 5.4: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten kommerziellen Kits.

Kit	Hersteller
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific
High Sensitivity DNA Reagents	Agilent Technologies
miRNeasy Mini Kit	QIAGEN
NEB® PCR Cloning Kit	NEW ENGLAND BioLabs®, Inc.
Nextera™ DNA Exome Kit	Illumina, Inc.
Nextera® Rapid Capture Enrichment Kit	Illumina, Inc.
NextSeq 500/550 High Output v2 Kit (150 cycles)	Illumina, Inc.
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	MACHEREY-NAGEL
PAXgene® Blood RNA Kit	PreAnalytiX – A QIAGEN/BD Company
PAXgene® Blood RNA Tube	BD Bioscience
TA Cloning® Kit, Dual Promoter (pCR®II)	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific
TruSeq® Rapid Exome Library Prep Kit	Illumina, Inc.
Qubit™ dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific

Kit	Hersteller
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific
Qubit™ Protein Assay Kit	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN

5.1.6. Primer- und Morpholino-Sequenzen

Tabelle 5.5: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Primer- und Morpholino-Sequenzen.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Schmelztemperatur [°C]
CAPN3_F	AAAGAACATCACAGCATCCAAGAGG	64
CAPN3_R	CAGACTTACATCAATGGAGCAGC	63
CHST3_F	ACTGACCCTGATCTTCTTTGTCC	63
CHST3_R	GGTTCTTGCAGTGGTACTTCTCG	65
CPS1_F	CATAGAGGCTAGAAGATTGAGTGGG	66
CPS1_R	ATCCTAGTGTCTTTCTTTCTTTCC	64
DNMT3B_F	TGTTAAGCAGCCGATCCTAGG	61
DNMT3B_R	CTAACTCAGAAGGCTACATACAACC	64
FBN1_F	CACTACATAACCATTGCACTGTCC	63
FBN1_R	ATGTGAGAGGCTTTGTTGACTGG	63
GAN_F	TAAGAAGTAGCATTTGGGATCCTGG	64
GAN_R	AGGATCTCTCTCATAACCATTACCG	64
GCH1_F	GCACCATATGACGTTACTAAAGGC	64
GCH1_R	TCAAACCTGAGCTCCTTATCACATCC	64
GDAP1_F	ATTGCATCGACTGAAGTTCCTGG	63
GDAP1_R	AATATCCCCTCCTGCAAGCAAACC	66
HPRT1_F	TGACACTGGCAAACAATGCA	58
HPRT1_R	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	60
hu_MIA3_Ex8_XhoI_F	AATTCTCGAGTATCTTTAGCTGTGCAAA GT	67
hu_MIA3_Ex8_BamHI_R	ATTGGATCCAAGGTCAATCTGCCCCAAAT	69
IMPAD1_F	CTTGTGCACGTTAACTTCTGCG	62
IMPAD1_R	CTCCACGAGAAGTCCAAGGG	63
INPPL1_F	CAAGAATTTGGGTCAAGGGTATGG	64
INPPL1_R	TCACCTTTCTTGGAGATGAACTGG	64
M13 Forward Primer	GTAAAACGACGGCCAG	59
M13 Reverse Primer	CAGGAAACAGCTATGAC	56
MIA3-001_37_Intron7-8_F	TCAGACCACAACATATCACTACTGG	61,3
MIA3-001_37_Intron8-9_R	TACTCTATCATACAACCTGGCAACC	61,3
MIA3_Ex.6_A_F	ACACTCCTATGGATGCTATTGATGC	64
MIA3_Ex.11_R	CTCTCTCAGATTCTAGCATAACACG	64
MIA3_Ex.7_A_F	GACTGCCATGGAAACCTGTATT	60
MIA3_Ex.7/8_R	CCTTCACAACAAGGACAGTTCT	60
MIA3_Ex.7/9_R	TCCGTGAAACAAGGACAGTTCT	60
MLTK_F	TTTGTGTGAAGTGAAGTGCAGC	59
MLTK_R	TCCTTGTCTGTGATATCCATTTGG	64
MTMR2_F	TTCACCTCGACTAGAAGCACC	61
MTMR2_R	TTCTGAGGTCTCTGGAAATTACTGG	64
NEB_F	CAAGTTATAAACAGGCAGACACGG	64
NEB_R	GCTATAGATAAAGATTTTCAGCCTTGCC	65
PEX7_F	TGCTTTGACATTTCTTCGTGGG	60

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Schmelztemperatur [°C]
PEX7_R	AGCAAGACTGTATTTAAGGGCC	60
PYCR1_F	TCAGGAAACACACTGACCAGG	61
PYCR1_R	CAGAAGGGAAGGAGGAGAAGC	63
SA2	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC	54
SD6	TCTGAGTCACCTGGACAACC	59
SLC10A7_F	ACCTCCTTCTTTCACAAGCTGC	62
SLC10A7_R	GCACTCACTATACCTTGACTGC	62
TBX4_F	CTTGCTCACTCTGTTCCATCTCTCC	67
TBX4_R	AGTCACTCAGGTAGCTAAGAAATCC	64
UROC1_F	ATGGATAGGCAGAGGGACAGATAGC	67
UROC1_R	AAGATGACAGAGGAGCAGACTTTGG	66
hu_mia3_ex8_ESE <i>vivo</i> Morpholino	TACCTTGATATACTCTATCCTTCAC	61,3
<i>Vivo</i> Standard Control Morpholino	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA	61,3

5.1.7. Geräte und Hardware

Tabelle 5.6: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Geräte und Hardware.

Bezeichnung	Hersteller
ABI 3130xl	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific
Agilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA Chips	Agilent Technologies
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	peqlab Biotechnologie GmbH (jetzt VWR® Life Science)
NextSeq 500 System	Illumina, Inc.
Qubit® fluorometer	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific

5.1.8. Software und Datenbanken

Tabelle 5.7: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Software und Datenbanken.

Software/Datenbank	Quelle
2100 Expert Software	Agilent Technologies, Inc.
Alamut® Visual	Interactive Biosoftware
ApE – A plasmide Editor	M. Wayne Davis
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
CodonCode Aligner Version 5.1.5	CodonCode Corporation
Database of Genomic Variants (DGV)	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home
domino	https://www.fbm.unil.ch/domino/
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html
ExAC Browser	http://exac.broadinstitute.org/
ExpASY Translate tool	https://web.expasy.org/translate/

Software/Datenbank	Quelle
GeneCards® Human Gene Database	https://www.genecards.org/
GeneMatcher	https://genematcher.org/
Genic Intolerance	http://genic-intolerance.org/
GME Variome	http://igm.ucsd.edu/gme/index.php
gnomAD Browser	http://gnomad.broadinstitute.org/
Gensearch®	PhenoSystems® S.A.
Gensearch® NGS	PhenoSystems® S.A.
HGMD® Professional	QIAGEN
HGNC HUGO Gene Nomenclature Committee	https://www.genenames.org/
HomozygosityMapper	http://www.homozygositymapper.org/
Human BLAT Search	https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?hgsid=217463243_RgWEPpmWS6tjA5aKJUthsUeHfAxB&command=start
Human Phenotype Ontology	https://hpo.jax.org/app/
Illumina Experiment Manager	Illumina, Inc.
International Mouse Phenotype Consortium (IMPC)	http://www.mousephenotype.org/
Iranome	http://www.iranome.com/
metabion Biocalculator	http://www.metabion.com/support-and-solution/biocalculator/
Mouse Genome Informatics (MGI)	http://www.informatics.jax.org/
NCBI PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
OMIM	https://www.omim.org/
Orphanet	https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php
Primer3Plus	http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi
Primer3 web Version 4.1.0	http://bioinfo.ut.ee/primer3/
Reverse Complement science gateway Protein Molecular Weight Calculator	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
Sequence Scanner	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific
SNPCheck3	https://secure.ngrl.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm;jsessionid=B54382AE182578AC3EADD9C4CC8CF458
Stammbaumerstellung - Pedigree Chart Designer	http://www.cegat.de/fuer-aerzte/stammbaumerstellung/
STRING	https://string-db.org/cgi/input.pl
THE HUMAN PROTEIN ATLAS	https://www.proteinatlas.org/
T_m Calculator	https://tmcalculator.neb.com/#!/main
UCSC Genome Browser	https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?redirect=auto&source=genome.ucsc.edu
UniProt	https://www.uniprot.org/
VarSome	https://varsome.com/
ViiA™ 7 RUO Software	Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific
ZFIN The Zebrafish Information Network	https://zfin.org/

5.2. Methoden

5.2.1. Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine der grundlegenden Methoden in den Biowissenschaften und Ausgangspunkt vieler Techniken. Bei der PCR wird eine Nukleinsäuresequenz von Interesse vervielfältigt, sodass eine ausreichende Menge des zu untersuchenden Moleküls für weitere Analysen vorliegt. Hierfür werden einer PCR-Reaktion die zu vervielfältigende DNA, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), eine DNA-Polymerase und Oligonukleotide (Primer), die der DNA-Polymerase als Startpunkt für das Anfügen weiterer dNTPs dienen, hinzugefügt.

Eine Standard-PCR wird in drei aufeinanderfolgende Phasen unterteilt:

- 1. Denaturierung:** Die Wasserstoffbrückenbindungen, die zwei DNA-Stränge zusammenhalten, werden durch Erhitzen auf ca. 95°C für wenige Minuten gelöst, wodurch DNA-Einzelstränge entstehen. Auch die Primer werden hierbei denaturiert.
- 2. Hybridisierung:** Die Temperatur wird für einige Sekunden herabgesetzt, um die Hybridisierung (Anlagerung) der Primer an die DNA-Zielsequenz zu ermöglichen. Die Temperatur wird hierbei von der Länge und der Basenpaarzusammensetzung der verwendeten Primer bestimmt.
- 3. Elongation:** Je nach Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz wird die Temperatur für einige Sekunden auf das Arbeitsoptimum der entsprechenden DNA-Polymerase eingestellt. Die DNA-Polymerase setzt am 3'-Ende des Primers an und beginnt einen neuen, zu der an den Primer gebundenen DNA-Sequenz komplementären DNA-Strang in 5'-3'-Richtung zu synthetisieren. Hierfür bedient sie sich der freien dNTPs in der Reaktion.

Diese drei Phasen bilden zusammen einen Zyklus, der viele Male wiederholt wird, was letztendlich zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA-Sequenz von Interesse führt. Je nach Reaktion werden die Dauer und die Temperatur der einzelnen Phasen an die verwendeten Komponenten angepasst.

Über eine gelelektrophoretische Analyse können der Erfolg der PCR-Amplifikation, sowie die Anzahl und die Größe der entstandenen PCR-Produkte ermittelt werden. Hierfür wird beispielsweise an ein Agarose/TAE-Gel eine Spannung angelegt und die PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe und Eigenladung neben einem Marker mit vielen definierten Fragmentlängen elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes wie HDGreen™ DNA Stain kann das Muster der entstandenen Gelbanden über UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden.

Sofern an entsprechender Stelle nicht anders vermerkt, wurden die PCRs mit anschließender gelelektrophoretischer Analyse für diese Arbeit wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

Bei jeder PCR wurde ein Leerwert als Kontrolle mitgeführt, der ddH₂O statt DNA enthielt. Der PCR-Ansatz für die Amplifikation der DNA-Abschnitte von Interesse sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen für ~15 µl Ansatz
Puffer B	12,5 µl
10µM Primer F	0,5 µl
10µM Primer R	0,5 µl
Platinum® Taq DNA Polymerase	0,2 µl
DNA	1 µl (>50 ng/µl)

Die Proben wurden unter folgenden Thermocycler-Bedingungen amplifiziert:

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	3 Min.	
95°C	30 Sek.	
T _m -2°C	30 Sek.	33
72°C	45 Sek.	
72°C	8 Min.	
4°C	∞	

Für PCR-Ansätze, bei denen Primer mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen eingesetzt wurden, wurde unter folgenden Thermocycler-Bedingungen amplifiziert (*Touchdown*-PCR):

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	5 Min.	
95°C	30 Sek.	
62°C	30 Sek.	3
72°C	30 Sek.	
95°C	30 Sek.	
59°C	30 Sek.	3
72°C	30 Sek.	
95°C	30 Sek.	
56°C	30 Sek.	30
72°C	30 Sek.	
72°C	5 Min.	
4°C	∞	

Sofern an entsprechender Stelle nicht anders vermerkt, wurden für die gelelektrophoretische Analyse je 5 µl PCR-Produkt mit je 1 µl DNA Gel Loading Dye (6x) vermischt, auf ein 1-2%-iges Agarose/TAE-Gel mit 0,001% HDGreen™ DNA Stain aufgetragen und bei 120 V bis zum gewünschten Ausmaß aufgetrennt.

5.2.2. Sanger-Sequenzierung

Für eine Sanger-Sequenzierung wird der DNA-Abschnitt von Interesse zunächst über eine PCR amplifiziert. Auf einem Agarosegel kann über eine elektrophoretische Auftrennung der Erfolg der PCR-Amplifikation und die Größe des entstandenen PCR-Produktes ermittelt werden. Primer-Reste und übriggebliebene dNTPs werden mit Hilfe einer

Exonuklease I und einer Alkalischen Phosphatase aus Shrimps (*shrimp alkaline phosphatase*; SAP) verdaut und die PCR-Reaktion somit aufgereinigt. Daraufhin folgt die für die Sanger-Sequenzierung charakteristische Kettenabbruchreaktion (Sequenzierreaktion). Diese läuft hier ähnlich wie eine standardmäßige PCR ab, jedoch beinhaltet sie nicht nur Desoxyribonukleotide, sondern auch mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs), welche zu einem Kettenabbruch führen, sobald sie in den neu entstehenden DNA-Strang eingebaut werden. Da dies zufällig und in jeweils unterschiedlichen Phasen der Elongation passiert, entstehen viele verschiedene, unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die an ihren Enden eines der vier verschiedenfarbig-markierten ddNTPs tragen. Daraufhin werden die Proben über eine Ethanol-Fällung erneut aufgereinigt. Im Kapillar-Sequenzierer werden die unterschiedlich langen DNA-Fragmente schließlich in mit einem Polyacrylamidgel befüllten Kapillaren ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und wandern somit zu unterschiedlichen Zeitpunkten an einem Detektionsfenster vorbei. An diesem Detektionsfenster befindet sich ein Laser, mit Hilfe dessen die Abfolge der an die vorbeiwandernden ddNTPs gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe erkannt und somit die Basenabfolge der zu untersuchenden DNA-Sequenz determiniert werden kann.

In dieser Arbeit wurden Sanger-Sequenzierungen zur Validierung von WES-Ergebnissen und zur Segregationsanalyse einzelner Sequenzvarianten innerhalb einer Familie durchgeführt.

Das hierfür befolgte Protokoll wird im Folgenden beschrieben.

PCR-Amplifikation und gelelektrophoretische Analyse

Die PCRs mit anschließender gelelektrophoretischer Analyse für eine Sanger-Sequenzierung wurden wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben durchgeführt.

Aufreinigung der PCR-Ansätze mit Hilfe von ExoSAP-IT®

Der Ansatz für die Aufreinigung der PCR-Produkte sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen für 7 µl Ansatz
ddH₂O	5,5 µl
ExoSAP-IT®	0,5 µl
PCR-Produkt	1 µl

Die Proben wurden unter folgenden Thermocycler-Bedingungen verdaut:

Temperatur	Dauer
37°C	30 Min.
95°C	5 Min.
4°C	∞

Sequenzierreaktion

Der Ansatz für die Sequenzierreaktion sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen für 11 µl Ansatz
BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	2 µl
BigDye® Terminator v1.1 Cycle	1 µl
10µM Primer (F oder R)	1 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	7 µl

Die Kettenabbruch-Reaktion erfolgte unter folgenden Thermocycler-Bedingungen:

Temperatur	Dauer	Zyklen
96°C	2 Min.	
96°C	20 Sek.	
auf 56°C abkühlen (1°C/Sek.)		
56°C	20 Sek.	30
auf 60°C hochheizen (1°C/Sek.)		
60°C	3 Min.	
60°C	3 Min.	
10°C	∞	

Ethanol-Fällung und ABI-Sequenzierung

Für die abschließende Aufreinigung wurden je 45 µl ROTISOLV® HPLC Gradient Grade Wasser, 5 µl 3M NaOAc und die gesamte Sequenzierreaktion in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) gegeben. Die Proben wurden gevortext und 30 Sek. ruhen gelassen, dann wurden je 125 µl eiskaltes EtOH hinzugegeben. Daraufhin wurden die Proben durch Anschneiden des Eppis gemischt und 15 Min. bei 13 000 rpm und RT zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand abgenommen und je 250 µl 75% EtOH in die Eppis gegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 Min. bei 13 000 rpm und RT wurde der Überstand abgenommen und das meist unsichtbare Pellet an der Luft trocknen gelassen. Schließlich wurden die Proben in 25 µl HiDi™ Formamide aufgenommen und sequenziert. Sofern an entsprechender Stelle nicht anders angegeben, wurde immer sowohl in *forward* als auch in *reverse* Richtung sequenziert.

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Programme Sequence Scanner, Gensearch® und CodonCode Aligner.

5.2.3. *Whole Exome* Sequenzierung

Daten-Generierung

Die *Whole Exome* Sequenzierungen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe verschiedener Anreicherungs-Kits von Illumina (Nextera® Rapid Capture Enrichment Kit, TruSeq® Rapid Exome Library Prep Kit, oder Nextera™ DNA Exome Kit), sowie des NextSeq 500/550 High Output v2 Kits (150 cycles) und einer NextSeq® 500/550 High Output Flow Cell Cartridge v2 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzierung von jeweils zwölf Proben gleichzeitig erfolgte am NextSeq 500 System.

Die vom Sequenzierer generierten .bcl-Dateien wurden extern zunächst in .fastq-Dateien und dann in für die weitere Analyse geeignete .bam-Dateien konvertiert. Für das Alignment der Daten an das humane Referenzgenom (NCBI build 37/hg19) wurde der Burrows-Wheeler Aligner genutzt.

Daten-Analyse

Die im Rahmen der WES generierten Daten wurden mit Hilfe verschiedener Programme und Online-Datenbanken ausgewertet. Eine erste Bewältigung der enormen Datenmenge wurde mit Hilfe des Programms Gensearch® NGS erreicht, das viel Gestaltungsspielraum bei der Filterung der Daten lässt. Die Filter können hier so gewählt werden, dass einem nur noch Varianten angezeigt werden, die bestimmte Kriterien im Hinblick u.a. auf Abdeckung, Frequenz, *minor allele frequency* (MAF), assoziierte Phänotypen oder Funktion der entsprechenden Genprodukte erfüllen. Als Standardfilter wurden für diese Arbeit eine Abdeckung ≥ 15 , eine Frequenz ≥ 20 , eine Qualität $\geq 98\%$ sowie eine MAF $\leq 1\%$ gewählt. Es wurden nur Varianten analysiert, die keinen synonymen Effekt haben (außer solche mit Auswirkung auf das prä-mRNA Spleißen) und im codierenden Bereich der DNA liegen. Zusätzliche Filter wurden je nach Fall individuell ergänzt. Des Weiteren wurden, sofern möglich und sinnvoll, weitere Familienmitglieder sowie nicht-verwandte Personen aus der Kohorte zum Filtern genutzt. Erste wichtige Hinweise zu der Pathogenität einzelner Sequenzvarianten lieferte Alamut® Visual. Hier werden die Konsequenz der Variante auf Aminosäure- und Proteinebene sowie die Konservierung des von der Mutation betroffenen Nukleotids und der entsprechenden Aminosäure angezeigt. Zudem sind in Alamut® Visual Informationen aus und Quicklinks zu verschiedenen anderen Datenbanken und Webtools eingebettet. Vorhersageprogramme wie SIFT, MutationTaster, PolyPhen-2, DANN Score und RVIS Score treffen auf Grundlage unterschiedlicher Algorithmen und unter Einbeziehung verschiedenster Parameter, wie zum Beispiel Konservierung oder physikalisch-chemischen Eigenschaften ausgetauschter Aminosäuren, Vorhersagen zur Pathogenität einzelner Varianten. Auch potenzielle Auswirkungen einer Sequenzvariante auf das prä-mRNA Spleißen können über in Alamut® Visual inkorporierte Vorhersageprogramme wie SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer, Human Splicing Finder, ESEfinder, RESCUE-ESE und EX-SKIP ermittelt werden. In großen Populationsdatenbanken wie ExAC oder gnomAD wurde geprüft, ob eine Variante bereits in der „Normalbevölkerung“ aufgetreten ist, wobei unter homo-, hetero- und hemizygot sowie unter verschiedenen Ethnizitäten unterschieden werden kann. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Daten aus

verschiedenen Sequenzierprojekten bzw. Kohorten stammen und nicht nur gesunde Referenzpersonen repräsentieren (nähere Infos hierzu unter <http://exac.broadinstitute.org/faq>). GME und Iranome sind Repositorien, die speziell Sequenzvarianten aus der Bevölkerung des mittleren Ostens bzw. des Iran annotieren und auch pathogene Varianten enthalten. Das kuratierte und quartalsweise auf den neusten Stand gebrachte Programm HGMD® Professional wiederum führt jegliche (potenziell) pathogene Varianten auf, die in der Literatur und in Locus-spezifischen Datenbanken zu finden sind. Interaktionsnetzwerke von Proteinen können Hinweise auf die Bedeutung einzelner Gene bei der Kandidatengenanalyse liefern und wurden mit Hilfe des Webtools STRING analysiert. Nähere Informationen zu Proteinaufbau, -funktion und -expression wurden den Datenbanken UniProt und The Human Protein Atlas entnommen. Als weitere wichtige Informationsquelle dienten die Datenbanken MGI, IMPC und ZFIN, in denen Tiermodell-Daten zu Genexpressionsmustern, phänotypischen Effekten von Mutationen oder Knockouts sowie entsprechende Literaturverweise hinterlegt sind. Die Daten aus den jeweiligen Datenbankeinträgen wurden zwischen Februar 2019 und März 2019 zusammengetragen und können sich im Laufe der Zeit ändern. Alle Analysen und Ergebnisse beziehen sich auf die humane Genomversion GRCh37/hg19.

5.2.4. *Homozygosity Mapping*

Die Tatsache, dass sich eine identifizierte Sequenzvariante bei einer konsanguinen Familie mit autosomal rezessivem Erbgang einer Erkrankung innerhalb eines homozygoten Intervalls in Betroffenen befindet, kann die Einstufung dieser Variante als potenziell pathogene Mutation bekräftigen.

Für das *Homozygosity Mapping* wurde der online *HomozygosityMapper* (Seelow, Schuelke et al. 2009) genutzt und nach gemeinsamen homozygoten Intervallen von so vielen Betroffenen einer Familie wie möglich gesucht. Hierfür wurden zunächst .vcf-Dateien der zu untersuchenden Patienten mit Hilfe des Programms Gensearch® NGS generiert. Die .vcf-Dateien wurden aus Variantenlisten mit den Filtereinstellungen Abdeckung > 20, Frequenz > 20% und Qualität > 98% erstellt. Alternativ wurden von entsprechenden Individuen der Familien IRN_5 und BEL_1 von der Firma LIFE & BRAIN GmbH (Bonn) mittels des Infinium Global Screening Array-24 v1.0 BeadChips (Illumina) Genotypisierungsdaten generiert und die daraus hervorgegangenen .txt-Dateien für das *Homozygosity Mapping* verwendet.

5.2.5. *In-vitro-Spleißanalyse mit Hilfe von Minigen-Konstrukten*

Ob und inwiefern sich eine Sequenzvariante auf das prä-mRNA Spleißen eines Gens/Transkripts auswirkt, kann man über das Sequenzieren der cDNA aus dem entsprechenden Zielgewebe des Patienten ermitteln. Liegt jedoch kein Patientenmaterial zur RNA-Isolierung vor, kann man sich auch eines Minigen-Konstrukts bedienen, welches

die Untersuchung von Spleißeffekten einzelner Sequenzvarianten in einem artifiziiellen System (*in vitro*) ermöglicht. Hierfür wird der zu untersuchende genomische Bereich des Patienten zunächst über eine PCR amplifiziert und in einen Vektor eingebracht, der wiederum in Bakterien kloniert und somit vervielfältigt wird. Das Vektor-Konstrukt wird aus den Bakterien wieder isoliert und über eine Transfektion in Zellen eingeschleust, wo man sich die Transkriptions- und Spleißmaschinerie dieser Zellen zu Nutze macht. Nach RNA-Isolierung aus den Zellen mit anschließender cDNA-Synthese und -Sequenzierung können etwaige Auswirkungen der zu untersuchenden Variante auf das Spleißverhalten abgeschätzt werden. Das Ergebnis dient allerdings nur als Hinweis und sollte nach Möglichkeit an entsprechendem Patientenmaterial überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein solches Minigen-Konstrukt genutzt, um potenzielle Auswirkungen einer Sequenzvariante auf das prä-mRNA Spleißen des entsprechenden Gens/Transkripts zu untersuchen (siehe Kapitel 6.3.4). Das hierfür durchgeführte Protokoll wird im Folgenden beschrieben.

Probenauswahl / Assay-Design

Für die Spleißanalyse wurden die Auswirkungen der Sequenzvariante c.3621A>G (NM_001324062.1) des Gens *MIA3* auf das prä-mRNA Spleißen bei einem homozygot betroffenen Patienten im Vergleich zu einer wildtypischen Kontrolle untersucht.

Als Vektor diente das Plasmid pSPL3b-cam (Abbildung 5.1), das unter anderem eine Chloramphenicolresistenz, einen SV40 Promotor, SD6- und SA2-Primersequenzen sowie einen Spleißdonor und einen Spleißakzeptor enthält, zwischen denen sich eine *multiple cloning site* befindet (Burn, Connors et al. 1995). Innerhalb dieser *multiple cloning site* liegen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *BamHI*, mit denen der Vektor bereits verdaut und somit linearisiert worden war.

Primer-Design

Die Primer hu_MIA3_Ex8_XhoI_F und hu_MIA3_Ex8_BamHI_R wurden so designt, dass sie das zu untersuchende Exon mit der Sequenzvariante inklusive jeweils etwa 240 bp flankierender Intronsequenzen einschlossen und zu einem Amplikon von 521 bp führen würden. Um die generierten gDNA-Amplikons in den linearisierten Vektor ligieren zu können, wurden an die 5'-Enden der Primer Erkennungssequenzen für die gleichen Restriktionsenzyme (*XhoI* und *BamHI*) angehängt, von denen der Vektor geschnitten worden war. Außerdem benötigten beide Restriktionsenzyme am 5'-Ende der Erkennungssequenzen zusätzlich 3-4 Basen, um ansetzen zu können.

PCR-Amplifikation der gDNA-Proben und gelelektrophoretische Analyse

Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer (hu_MIA3_Ex8_XhoI_F und hu_MIA3_Ex8_BamHI_R) wurden mit Hilfe des T_m Calculators (NEB) ermittelt. Zunächst wurden die gDNA-Proben mit ddH₂O auf eine Konzentration von etwa 50 ng/μl eingestellt.

Der PCR-Ansatz zur Amplifikation der gDNA-Proben sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen für 25 µl Ansatz
Q5® Reaction Buffer	5 µl
dNTP-Mix 2,5 mM	4,5 µl
10µM Primer hu_MIA3_Ex8_XhoI_F	1,25 µl
10µM Primer hu_MIA3_Ex8_BamHI_R	1,25 µl
ddH2O	11,75 µl
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	0,25 µl
gDNA (~50 ng/µl)	1 µl

Der PCR-Ansatz wurde unter folgenden Thermocycler-Bedingungen amplifiziert:

Temperatur	Dauer	Zyklen
98°C	2 Min.	
98°C	20 Sek.	
59°C	30 Sek.	35
72°C	20 Sek.	
72°C	2 Min.	
10°C	∞	

Um die erfolgreiche Amplifikation der gDNA-Abschnitte zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben gelelektrophoretisch analysiert.

Daraufhin wurde ein 5x PCR-Ansatz von jeder Probe vorbereitet, amplifiziert und auf einem Agarose/TAE-Gel überprüft, um eine ausreichende Amplikon-Menge für das weitere Vorgehen zu erzielen.

Aufreinigung der gDNA PCR-Produkte

Die gDNA PCR-Produkte wurden mit Hilfe des GenElute™ PCR Clean-Up Kits (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und im letzten Schritt in 50 µl ddH2O eluiert.

Enzymatischer Verdau der aufgereinigten gDNA PCR-Produkte

Im folgenden Schritt wurde in die aufgereinigten gDNA PCR-Produkte durch Restriktionsenzyme an deren spezifischen Schnittstellen ein Doppelstrangbruch eingeführt.

Der Verdau-Ansatz sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen für 100 µl Ansatz
gDNA PCR-Produkt	50 µl
CutSmart® Buffer (10x)	10 µl
ddH2O	36 µl
Restriktionsenzym <i>BamHI</i>	2 µl
Restriktionsenzym <i>XhoI</i>	2 µl

Der Ansatz wurde für 2 Std. auf einem Heizblock bei 37°C inkubiert.

Aufreinigung der Verdau-Reaktionen

Die verdauten gDNA PCR-Produkte wurden mit Hilfe des GenElute™ PCR Clean-Up Kits (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und im letzten Schritt in 50 µl ddH2O eluiert.

Ligation von geschnittenen PCR-Produkten und linearisiertem Vektor

Die durch die Restriktionsenzyme *BamHI* und *XhoI* geschnittenen PCR-Produkte wurden mit dem durch die gleichen Enzyme geschnittenen Vektor pSPL3b-cam ligiert. Durch den Verdau mit den gleichen Restriktionsenzymen enthielten die PCR-Produkte und der linearisierte Vektor zueinander komplementäre *sticky ends* für eine Verknüpfung in gezielter Orientierung. Neben den zu untersuchenden Proben wurde auch eine Negativkontrolle (ddH₂O statt PCR-Produkt) angesetzt.

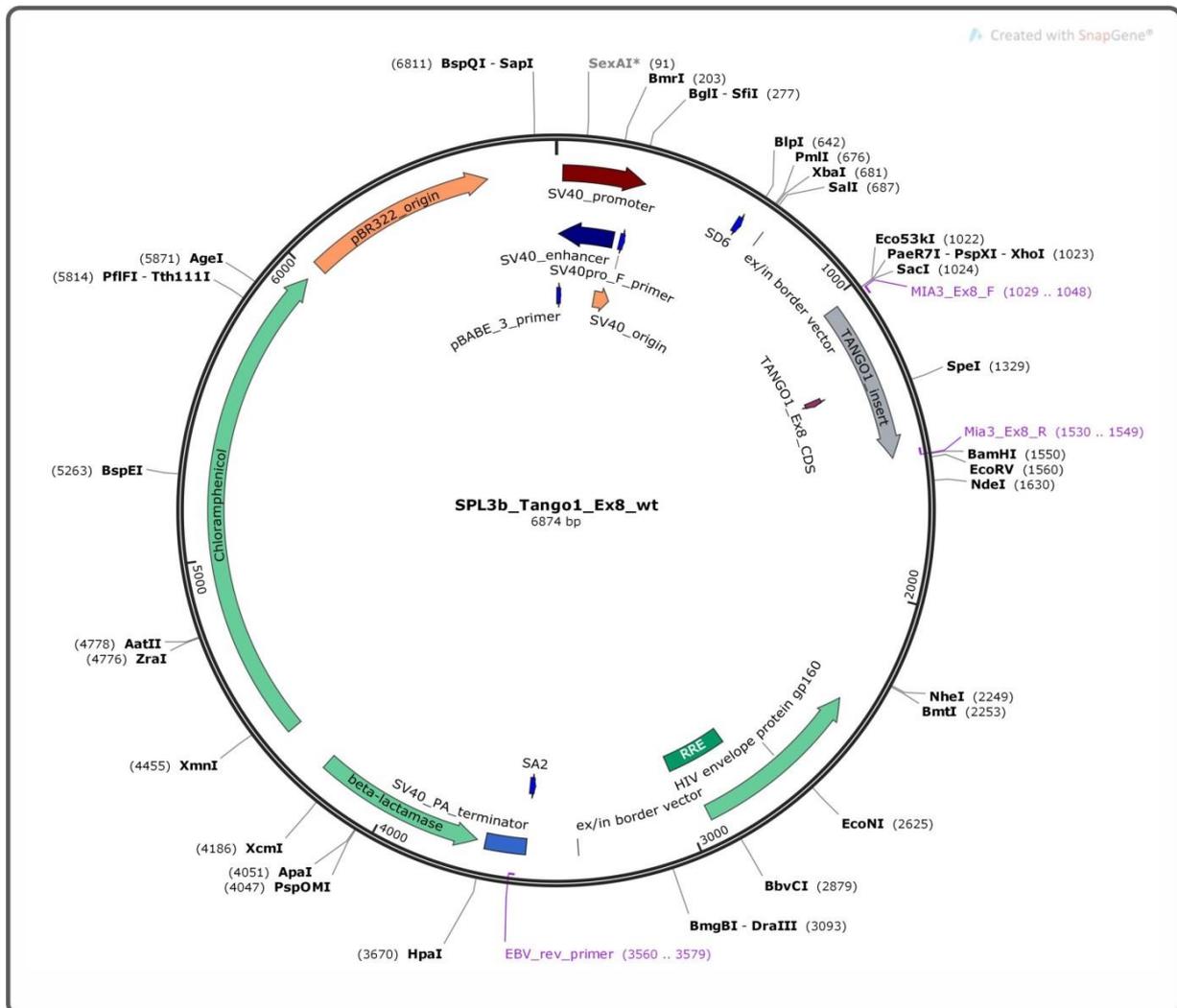


Abbildung 5.1: Vektorkarte zu pSPL3b-cam. Das Plasmid enthält u.a. eine *multiple cloning site*, in die das *MIA3/TANGO1* Insert eingebracht wurde.

Der Ligations-Ansatz sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen für 20 µl Ansatz
linearisierter Vektor pSPL3b-cam	1 µl
geschnittenes PCR-Produkt	3 µl
ddH ₂ O	13,5 µl
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)	2 µl
T4 DNA Ligase	0,5 µl

Der Ligations-Ansatz wurde über Nacht bei RT inkubiert.

Transformation

Bei einer Transformation wird ein Vektorkonstrukt in Bakterienzellen eingebracht, sodass es bei der Replikation in den Bakterien mitamplifiziert wird. Es gibt verschiedene Methoden der Transformation, wie Hitzeschock oder Elektroporation. Für diese Arbeit wurden 100 µl 5-alpha Competent *E. coli* Bakterien mit 10 µl Ligations-Ansatz vorsichtig in einem 1,5 ml Eppi vermischt und für etwa 30 Min. auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte der Hitzeschock für 90 Sek. bei 42°C, bei dem die Bakterienzellen permeabel werden und das Vektorkonstrukt inkorporiert werden kann. Hiernach wurden die Proben wieder für 2 Min. auf Eis inkubiert und je 900 µl flüssiges LB-Medium hinzugegeben. Daraufhin folgte die Anzucht der Bakterien auf einem Schüttler für 1 Std. bei 37°C mit anschließender Zentrifugation für 5 Min. bei 2,5 g. Der Überstand wurde abgenommen, das Bakterien-Pellet resuspendiert und auf eine LB/Agar/Chloramphenicol-Petrischale ausplattiert, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurde.

Colony Screen

Über einen *Colony Screen* wurde geprüft, welche der auf der LB/Agar/Chloramphenicol-Petrischale gewachsenen Bakterien-Kolonien das Vektorkonstrukt inklusive Insert (gDNA PCR-Produkt) aufwiesen. Hierfür wurde zunächst ein MasterMix für folgenden PCR-Ansatz vorbereitet:

Reagenz	Volumen für 24 µl Ansatz
5x Reaction Buffer, coloured (bei Mango Taq™ DNA Polymerase mitgeliefert)	5 µl
MgCl ₂ 50mM (bei Mango Taq™ DNA Polymerase mitgeliefert)	1 µl
dNTP-Mix 2,5 mM	1 µl
10µM Primer SD6_F	0,75 µl
10µM Primer hu_MIA3_Ex8_BamHI_R	0,75 µl
ddH ₂ O	15,25 µl
Mango Taq™ DNA Polymerase	0,25 µl

Je 24 µl MasterMix wurden auf die entsprechende Anzahl PCR-Stripes verteilt. Die einzelnen Bakterien-Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen und kurz auf eine neue, mit einem Gitternetz markierte LB/Agar/Chloramphenicol-Petrischale ausgestrichen. Die Pipettenspitze mit den verbleibenden Bakterien wurde in das entsprechende PCR-Reagiergefäß samt MasterMix eingetaucht und darin etwa 1 Min. inkubiert.

Der PCR-Ansatz wurde unter folgenden Thermocycler-Bedingungen amplifiziert:

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	5 Min.	
95°C	30 Sek.	
59°C	30 Sek.	35
72°C	40 Sek.	
72°C	5 Min.	
10°C	∞	

Um eine eventuelle Amplifikation der Vektorkonstrukt-Abschnitte zu überprüfen, wurden je 10 µl der PCR-Produkte auf einem 1% Agarose/TAE-Gel für etwa 30 Min. bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Eine erfolgreiche Ligation und Transformation führte zu einer Gelbande auf einer Höhe von etwa 1000 bp.

Ergebnis der Transformation	Petrischale	Agarose/TAE-Gel
Bakterien ohne Vektorkonstrukt	→kein Wachstum	
Bakterien mit geschnittenem Vektor ohne Insert	→kein Wachstum	
Bakterien mit ungeschnittenem Vektor	→Wachstum	→keine Gelbande
Bakterien mit Vektor inklusive Insert	→Wachstum	→Gelbande

Ansatz von Übernachtskulturen

In ein Kulturröhrchen wurden 4 ml flüssiges LB-Medium und 4 µl Antibiotikum (Chloramphenicol) gegeben. Mit einer Pipettenspitze wurden die entsprechenden Kolonien, die das Vektorkonstrukt inklusive Insert aufwiesen, von der mit einem Gitternetz markierten LB/Agar/Chloramphenicol-Petrischale aufgenommen und samt Pipettenspitze in das Kulturröhrchen gegeben. Die befüllten Kulturröhrchen wurden über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Isolierung des Vektorkonstruktes aus den Bakterien

Das Vektorkonstrukt wurde mit Hilfe des GenElute™ Plasmid Miniprep Kits (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers, mit leichten Modifikationen, isoliert. Nach Zugabe des Lysis-Puffers wurden die Proben für 3 Min. bei 37°C auf einem Heizblock lysiert und im letzten Schritt in 50 µl warmem ddH₂O eluiert.

Sequenzierungsansatz, Aufreinigung und ABI-Sequenzierung des Vektorkonstruktes

Die Konzentrationen der einzelnen Vektorkonstrukte wurden mit Hilfe des NanoDrop 2000c Spectrophotometers bestimmt. Für die Sequenzierungsreaktion wurden je 100 fmol Vektorkonstrukt eingesetzt. Die hierfür benötigte Masse in ng und damit das Volumen in µl wurden anhand der folgenden Formel berechnet:

$$ng(\text{Vektorkonstrukt}) = fmol \times bp(\text{Vektorkonstrukt inklusive Insert})$$

$$V_{soll} = \frac{ng(\text{Vektorkonstrukt})}{\text{Konzentration}(\text{Vektorkonstrukt})}$$

Der PCR-Ansatz für die Amplifikation der Vektorkonstrukte sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen für ~10 µl Ansatz
ddH ₂ O	6 µl
BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	2 µl
BigDye® Terminator v1.1 10µM Primer (SD6_F oder hu_MIA3_Ex8_BamHI_R)	1 µl 0,5 µl
Vektorkonstrukt	X µl (V _{soll})

Der PCR-Ansatz wurde unter folgenden Thermocycler-Bedingungen amplifiziert:

Temperatur	Dauer	Zyklen
96°C	2 Min.	
96°C	20 Sek.	
59°C	20 Sek.	28
60°C	3 Min.	
60°C	10 Min.	
10°C	∞	

Danach wurden je 10 µl ddH₂O, 2 µl 100mM EDTA und 2 µl 3M NaOAc in ein neues 1,5 ml Eppi gegeben und die gesamte Sequenzierreaktion hinzugefügt. Dem Ansatz wurden je 60 µl eiskaltes EtOH zugegeben und das Eppi invertiert. Daraufhin wurden die Proben für 5 Min. bei 4°C und höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand abgenommen und je 180 µl 70% EtOH hinzugefügt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 Min. bei 4°C und höchster Geschwindigkeit wurde der Überstand wieder abgenommen, das Pellet an der Luft trocknen gelassen, schließlich in je 30 µl HiDi™ Formamide resuspendiert und nach Sanger sequenziert.

Transfektion von Zellen mit dem Vektorkonstrukt

Um das Vektorkonstrukt in HEK293T-Zellen einzubringen und die Expressions- und Speißmaschinerie der Zellen für die spätere cDNA-Analyse nutzen zu können, wurden je 4×10^{15} HEK293T-Zellen in 2 ml MEM pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag waren die Wells zu ~85% konfluent, sodass mit der Transfektion begonnen werden konnte. Hierfür wurden je 2 µg Vektorkonstrukt mit X µl FKS-freiem MEM (zusammen 95 µl) in ein 1,5 ml Eppi gegeben. Hinzu kamen je 6 µl FuGENE® HD Transfection Reagent, woraufhin der Ansatz für 15 Min. bei RT inkubiert wurde. Während der Inkubationszeit wurde das Medium der Zellen abgenommen und je 2 ml frisches, FKS-freies MEM hinzugegeben. Dann wurde der Transfektions-Ansatz langsam zu den Zellen gegeben und diese 24 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

RNA-Isolierung aus transfizierten Zellen

Für die RNA-Isolierung aus den transfizierten Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen, dann je 2 ml 1xPBS zu jedem Well hinzugegeben, die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst und in ein 2 ml Eppi überführt. Die Proben wurden für 5 Min. bei 4°C und 3000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet durch Ansnippen aufgelockert. Die weiteren Schritte wurden mit Hilfe des

miRNeasy Mini Kits (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die RNA schließlich in je 35 µl warmem ddH₂O eluiert.

cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des High Capacity RNA-to-cDNA Kits (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen für 20 µl Ansatz
2x RT Buffer Mix	10 µl
20x RT Enzyme Mix	1 µl
RNA	1 µg (ggf. ad 9 µl mit ddH ₂ O)

Der Reaktionsansatz wurde unter folgenden Thermocycler-Bedingungen inkubiert:

Temperatur	Dauer
37°C	90 Min.
65°C	5 Min.
4°C	∞

PCR-Amplifikation der cDNA und gelelektrophoretische Analyse

Für die spätere Sanger-Sequenzierung wurden je 1,5 µl cDNA wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben über eine PCR mit Hilfe der SD6_F- und SA2_R-Primer amplifiziert (*Touchdown-PCR*).

Um die erfolgreiche Amplifikation der cDNA-Abschnitte zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben gelelektrophoretisch analysiert.

Aufreinigung der cDNA PCR-Produkte

Die Aufreinigung der cDNA PCR-Produkte mit Hilfe von ExoSAP-IT® erfolgte wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben.

Die Thermocycler-Bedingungen wichen hier jedoch wie folgt von denen aus Kapitel 5.2.2 ab:

Temperatur	Dauer
37°C	30 Min.
85°C	15 Min.
95°C	3 Min.
10°C	∞

Sequenzierreaktionsansatz, Aufreinigung und ABI-Sequenzierung der cDNA PCR-Produkte

Die Sequenzierreaktion wurde wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben angesetzt.

Die Thermocycler-Bedingungen wichen hier jedoch wie folgt von denen aus Kapitel 5.2.2 ab:

Temperatur	Dauer	Zyklen
96°C	2 Min.	
96°C	20 Sek.	
56°C	20 Sek.	28
60°C	3 Min.	
60°C	10 Min.	
10°C	∞	

Danach wurden je 10 µl ddH₂O, 2 µl 100mM EDTA und 2 µl 3M NaOAc in ein neues 1,5 ml Eppi gegeben und die gesamte Sequenzierreaktion hinzugefügt. Dem Ansatz wurden je 60 µl eiskaltes EtOH zugegeben und das Eppi invertiert. Daraufhin wurden die Proben für 5 Min. bei 4°C und höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand abgenommen und je 180 µl 70% EtOH hinzugefügt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 Min. bei 4°C und höchster Geschwindigkeit wurde der Überstand wieder abgenommen, das Pellet an der Luft trocknen gelassen, schließlich in je 30 µl HiDi™ Formamide resuspendiert und nach Sanger sequenziert.

Für die separate Sequenzierung mehrerer PCR-Produkte aus einer Probe wurde das TA Cloning® Kit, Dual Promoter (pCR®II) von Invitrogen™ nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.2.6. *In-vivo*-Spleißanalyse an Patientenproben

RNA-Isolierung aus Blutproben mit Hilfe des PAXgene® Blood RNA Kits

Peripheres Blut von Patienten wurde von externen Kollaborationspartnern in RNA-stabilisierende PAXgene® Blood RNA Tubes abgenommen und zur weiteren Analyse bereitgestellt. Aus den so gewonnenen Blutproben wurde die RNA mit Hilfe des PAXgene® Blood RNA Kits (PreAnalytiX) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Proben wurden in 50 µl Buffer BR5 eluiert und die Konzentrationen mittels des NanoDrop 2000c Spectrophotometers bestimmt.

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte wie in Kapitel 5.2.5 beschrieben mit Hilfe des High Capacity RNA-to-cDNA Kits (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific). Sofern mehrere Proben miteinander verglichen werden sollten, bei einer von ihnen aufgrund ihrer niedrigen Konzentration aber nicht 1 µg in 9 µl erreicht werden konnte, wurde die Menge an eingesetzter RNA für die cDNA-Synthese aller anderen Proben auf die Menge dieser Probe angepasst.

PCR-Amplifikation der cDNA und gelelektrophoretische Analyse

Die Amplifikation der cDNA über eine *Touchdown*-PCR und die gelelektrophoretische Analyse wurden wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben durchgeführt.

Aufreinigung der cDNA PCR-Produkte mit Hilfe von ExoSAP-IT®

Die cDNA PCR-Produkte wurden wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben aufgereinigt.

Sequenzierreaktionsansatz, Aufreinigung und Sequenzierung der cDNA PCR-Produkte

Die Sequenzierreaktion, die Aufreinigung und die anschließende Sequenzierung der cDNA PCR-Produkte erfolgte wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben.

5.2.7. Extraktion und separate Sequenzierung von Gelbanden

Einzelne Gelbanden einer Probe wurden mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (QIAGEN) und des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (MACHEREY-NAGEL) nach Angaben der Hersteller extrahiert. Die Sequenzierreaktion, Ethanol-Fällung und Sanger-Sequenzierung wurden wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben mit jeweils 1-3 µl der Gelextrakte durchgeführt.

5.2.8. Quantitative *real-time*-PCR

Die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) ermöglicht die relative oder sogar absolute Quantifizierung von Ausgangsmolekülen, indem die Produktmenge im Verlauf der PCR über Fluoreszenzsignale bestimmt wird. So lassen sich beispielsweise Kopiezahlen definierter DNA-Abschnitte (gDNA) oder Expressionsmengen bestimmter Gene (cDNA) quantifizieren. Hierfür werden interkalierende oder in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, deren Signalstärke nach jeder Elongation während der exponentiellen Wachstumsphase gemessen wird. Um Schwankungen in der eingesetzten Ausgangsmenge auszugleichen, werden Haushaltsgene als interne Kontrollen zur Normierung mitgeführt. Solche Haushaltsgene werden unabhängig von Zelltyp, Zeitpunkt und exogenen Einflüssen kontinuierlich exprimiert, da ihre Genprodukte für grundlegende Funktionen der Zelle unerlässlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden qRT-PCRs zur relativen Quantifizierung verschiedener, durch eine Mutation hervorgerufener Spleißprodukte eines Gens durchgeführt (siehe Kapitel 6.3.4).

Das hierfür befolgte Protokoll wird im Folgenden beschrieben.

Primer-Design für qRT-PCR

Die Primer wurden mit Hilfe des Webtools Primer3Plus designt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Primerpaare zu einem PCR-Produkt von 80-90 bp führen, die Primer zwischen 18 und 22 bp lang sind, ihre Schmelztemperatur (T_m) zwischen 58°C und 62°C liegt und die T_m von *forward* und *reverse* Primer nicht mehr als 2°C unterschiedlich ist, sowie dass innerhalb eines Primers die gleiche Base nicht mehr als drei Mal aufeinander folgt.

qRT-PCR-Ansatz und Thermocycler-Bedingungen

Als Haushaltsgene diente *HPRT1*. Alle Proben wurden in Triplikaten angesetzt und bearbeitet. Bei jeder qRT-PCR wurde ein Leerwert als Kontrolle mitgeführt, der ddH₂O statt cDNA enthält.

Der Ansatz für die qRT-PCR sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen für 10 µl Ansatz
ddH ₂ O	3 µl
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus	2 µl
2,5 pmol/µl Primer (Mix aus F und R)	1 µl
2,5 ng/µl cDNA	4 µl

Der qRT-PCR-Ansatz wurde unter folgenden Thermocycler-Bedingungen amplifiziert:

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	15 Min.	
95°C	15 Sek.	
60°C	20 Sek.	40
72°C	20 Sek.	

Schmelzkurve: 60°C → 95°C

Die Daten wurden mit Hilfe des ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems generiert, die Analyse erfolgte mit der ViiA™ 7 RUO Software.

5.2.9. Untersuchung der Effekte von verschiedenen *vivo* Morpholinos auf das *MIA3* prä-mRNA Spleißen in HeLa-Zellen

Für die Untersuchung der Effekte von verschiedenen *vivo* Morpholinos auf das *MIA3* prä-mRNA Spleißen wurden kultivierte HeLa-Zellen verwendet. Zunächst wurde der Effekt eines selbstdesignten *MIA3* Exon 8 spezifischen *vivo* Morpholinos (hu_mia3_ex8_ESE *vivo* Morpholino; TACCTTGATATACTCTATCCTTCAC) im Vergleich zu dem eines Standardkontrolle *vivo* Morpholinos (*Vivo* Standard Control Morpholino; CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA) und zu unbehandelten HeLa-Zellen getestet. Hierfür wurden je 2x10⁵ Zellen in je 2 ml DMEM in drei Wells einer 6-Well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden je 20 µl (5 µM) der *vivo* Morpholinos hinzugegeben und diese 24 Std. mit den Zellen im Brutschrank inkubiert. Weitere 24 Std. später wurde das Medium abgenommen, die Zellen vorsichtig in 1xPBS gewaschen und schließlich jeweils 0,5 ml Trypsin-EDTA Solution hinzugegeben, bis sich die Zellen langsam ablösten. Daraufhin wurden jeweils 1,5 ml 1xPBS dazugegeben, die Zellen darin in 2 ml Eppis überführt und auf Eis gestellt. Die Proben wurden für 5 Min. bei 4°C und 3000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet durch Anschnippen aufgelockert. Die weiteren Schritte wurden mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die RNA schließlich in je 35 µl warmem ddH₂O eluiert. Die cDNA-Synthese, die PCR mit gelelektrophoretischer Analyse, die Aufreinigung, die Sequenzierreaktion, die erneute Aufreinigung und schließlich die Sanger-Sequenzierung erfolgten wie in Kapitel 5.2.5 beschrieben.

Zudem wurde der Effekt des selbstdesignten *MIA3* Exon 8 spezifischen *vivo* Morpholinos (hu_mia3_ex8_ESE *vivo* Morpholino) auf HeLa-Zellen ermittelt, die zuvor mit einem Vektorkonstrukt transfiziert wurden, das die in Familie BEL_1 detektierte Mutation in

Exon 8 des Gens *MIA3* trug (Vektorkonstrukt aus Kapitel 5.2.5). Zum Vergleich wurden HeLa-Zellen mit dem wildtypischen *MIA3* Exon 8 Vektorkonstrukt (siehe Kapitel 5.2.5) transfiziert und auch hier der Effekt des selbstdesignten *MIA3* Exon 8 spezifischen *vivo* Morpholinos getestet. Als weitere Kontrollen dienten zwei HeLa-Zellkulturen, die mit jeweils einem der beiden Vektorkonstrukte transfiziert wurden, zu denen aber kein *vivo* Morpholino gegeben wurde. Für die Transfektion der HeLa-Zellen mit den Vektorkonstrukten wurden je 2×10^5 Zellen in je 2 ml DMEM in vier Wells einer 6-Well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden je 2 μ g Vektorkonstrukt auf 95 μ l mit FKS-freiem DMEM in ein 1,5 ml Eppi gegeben. Hinzu kamen jeweils 6 μ l FuGENE® HD Transfection Reagent, worauf eine Inkubation bei RT für 15 Min. folgte (Transfektions-Mix). Währenddessen wurde das Medium der Zellen zu FKS-freiem DMEM gewechselt. Schließlich wurde der Transfektions-Mix langsam zu der entsprechenden Zellkultur gegeben und vorsichtig gemischt. Zu den Zellkulturen, bei denen zusätzlich der Effekt der *vivo* Morpholinos getestet werden sollte, wurden jeweils 28 μ l (7 μ M) des entsprechenden *vivo* Morpholinos hinzugefügt. Die RNA-Isolierung, die cDNA-Synthese, die PCR mit gelelektrophoretischer Analyse, die Aufreinigung, die Sequenzierreaktion, die erneute Aufreinigung und schließlich die Sanger-Sequenzierung erfolgten wie im Abschnitt weiter oben beschrieben.

6. ERGEBNISSE

6.1. Überblick über die Analyseergebnisse

Insgesamt wurden 43 Fälle mittels *Whole Exome* Sequenzierung untersucht, darunter 16 Familien aus der iranischen Kohorte, 26 Familien aus der pakistanischen Kohorte und eine Familie türkischer Herkunft.

In 22 (~51%) der 43 analysierten Familien wurden Mutationen in Genen gefunden, die sehr wahrscheinlich die Krankheitsursache der Patienten darstellen. In einer weiteren Familie (IRN_14) konnte eine Mutation in einem Kandidatengen identifiziert werden, die weiterer Analysen bedarf.

Betrachtet man die beiden großen Kohorten separat, so liegt die Aufklärungsrate bei der sehr gut klinisch beschriebenen iranischen Kohorte bei ~63%, bei der schlecht bis gar nicht klinisch beschriebenen pakistanischen Kohorte dagegen bei ~46%.

Unter den 24 identifizierten Mutationen befinden sich 20 (~83%) *missense* Mutationen, wobei in einer Familie zwei krankheitsrelevante *missense* Mutationen detektiert wurden, eine *inframe* Deletion, eine *frameshift* Insertion, eine *stop gained* Mutation, sowie eine synonyme Spleißmutation (Abbildung 6.1).

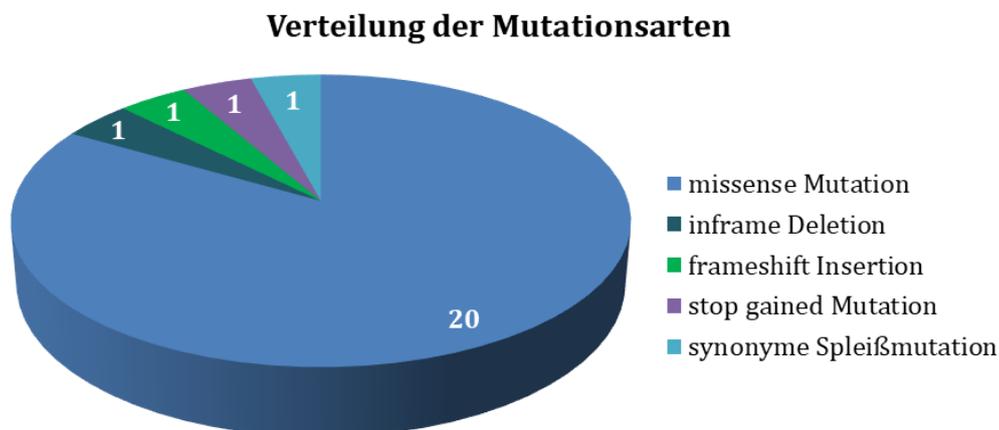


Abbildung 6.1: Verteilung der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationsarten. Bei 83% der nachgewiesenen Sequenzvarianten handelt es sich um *missense* Mutationen, daneben wurde jeweils eine *inframe* Deletion, *frameshift* Insertion, *stop gained* Mutation, sowie synonyme Spleißmutation detektiert.

Bei fünf (~21%) der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Mutationen handelt es sich um in der Literatur bereits beschriebene pathogene Sequenzvarianten und bei 15 (~63%) um bisher noch unbekannte Mutationen in bereits als krankheitsrelevant bekannten Genen. In drei Fällen (~13%) konnten pathogene Mutationen in bisher noch nicht als krankheitsrelevant beschriebenen Genen identifiziert werden und in einem weiteren Fall (IRN_14) wurde eine Mutation in einem neuen Kandidatengen detektiert, deren pathologische Relevanz noch ermittelt werden sollte (Abbildung 6.2).

Neuartigkeit der Mutationen

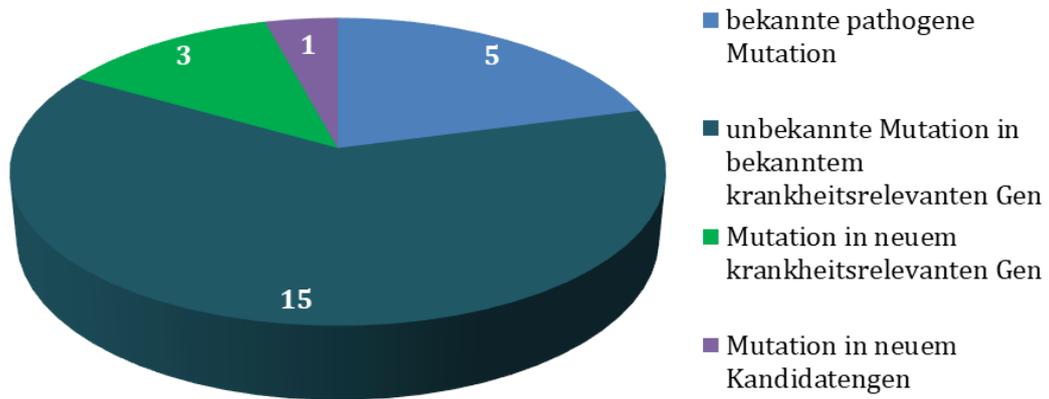


Abbildung 6.2: Neuartigkeit der detektierten Mutationen. Bei 21% der identifizierten Sequenzvarianten handelt es sich um in der Literatur bereits beschriebene pathogene Mutationen und bei 63% um unbekannte Mutationen in bekannten krankheitsrelevanten Genen. In 13% der Fälle konnten pathogene Mutationen in bisher noch nicht als krankheitsrelevant beschriebenen Genen identifiziert werden und in einem weiteren Fall wurde eine Mutation in einem neuen Kandidatengen nachgewiesen, deren pathologische Relevanz noch unklar ist.

6.2. Fälle mit pathogenen Mutationen in bekannten krankheitsassoziierten Genen

Im Folgenden werden die Fälle gelistet, bei denen pathogene Mutationen in bekannten krankheitsassoziierten Genen detektiert wurden. Die pathologische Relevanz der identifizierten Mutationen sowie die entsprechenden Krankheitsbilder werden in Kapitel 7.2 näher diskutiert.

6.2.1. Familie IRN_1 | CPS1

In Familie IRN_1 sind drei gleichermaßen betroffene Neugeborene (Abbildung 6.3C; IV.1, IV.2 und VI.1) kurz nach der Geburt verstorben. Alle drei kamen nach einer unauffälligen Schwangerschaft termingerecht zur Welt. In den Tagen darauf verweigerten sie das Trinken, entwickelten Flatulenzen, bekamen Atemnot und verstarben schließlich jeweils etwa drei Monate nach der Geburt. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

Durch die WES wurde bei Patientin IV.1 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *CPS1* (*carbamoyl-phosphate synthase 1*) detektiert, die bei den Familienmitgliedern V.1 und V.2 (Abbildung 6.3) in heterozygotem Zustand vorlag. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.1.

Die nachgewiesene *CPS1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper etwa 2,7 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall auf Chromosom 2 entfernt (Abbildung 6.3A). Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.3B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.3C).

Tabelle 6.1: Informationen zur identifizierten *CPS1*-Mutation in Familie IRN_1.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>CPS1</i> (<i>carbamoyl-phosphate synthase 1</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.211502478G>C
c.Position (Transkript)	c.2758G>C (NM_001122633.2)
p.Position	p.Asp920His
Exon/Intron	Exon 23
Chromosom	2
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0)</i>
MutationTaster	<i>Disease causing (p-value: 1)</i>
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 1.000)</i>
DANN Score	0.9952 (0=benigne, 1=maligne)
RVIS Score	-0.63 (16.81%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	<i>Allele Frequency: 0.000007957</i> <i>Number of Homozygotes: 0</i>
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt

DATENBANK	ANNOTATION
OMIM	<i>Carbamoylphosphate synthetase I deficiency</i> (MIM# 237300)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

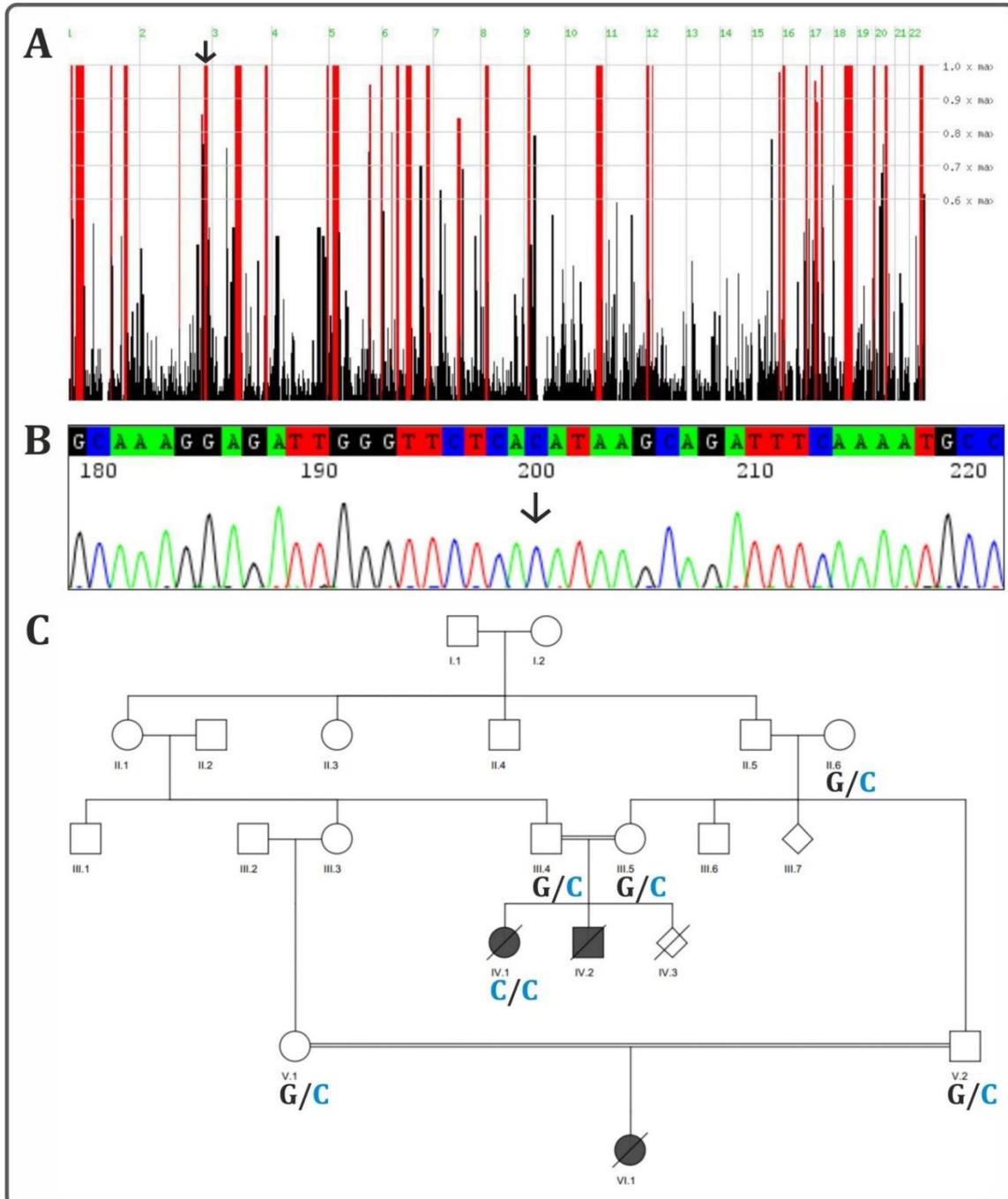


Abbildung 6.3: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_1. (A) Darstellung der bei Patientin IV.1 detektierten homozygoten Intervalle. Die *CPS1*-Mutation liegt laut Homozygoten-Mapper ~2,7 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall (schwarzer Pfeil) auf Chromosom 2 entfernt. (B) Elektropherogramm der *CPS1* Sanger-Sequenzierung von Patientin IV.1 aus Familie IRN_1. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *CPS1*-Mutation innerhalb der Familie IRN_1.

6.2.2. Familie IRN_9 | *IMPAD1*

In Familie IRN_9 gab es zwei betroffene Kinder (Abbildung 6.4B; V.1 und V.2), die kurz nach der Geburt verstorben sind. Beide wiesen verkürzte Extremitäten auf. Der hier analysierte Indexpatient (Abbildung 6.4B; V.5) zeigte als Fötus während einer Ultraschalluntersuchung in der Schwangerschaft ebenfalls verkürzte Extremitäten. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

Durch die WES wurde bei Patient V.5 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *IMPAD1* (*inositol monophosphatase domain containing 1*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.2.

Die nachgewiesene *IMPAD1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper weder innerhalb eines homozygoten Intervalls, noch in dessen Nähe.

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.4A), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.4B).

Tabelle 6.2: Informationen zur identifizierten *IMPAD1*-Mutation in Familie IRN_9.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>IMPAD1</i> (<i>inositol monophosphatase domain containing 1</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.57905815G>T
c.Position (Transkript)	c.330C>A (NM_017813.4)
p.Position	p.Asp110Glu
Exon/Intron	Exon 1
Chromosom	8
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	schwach
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0)</i>
MutationTaster	<i>Disease causing (p-value: 1)</i>
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 1.000)</i>
DANN Score	0.9971
RVIS Score	-0.32 (31.69%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Chondrodysplasia with joint dislocations, GPAPP type (MIM# 614078)</i>
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

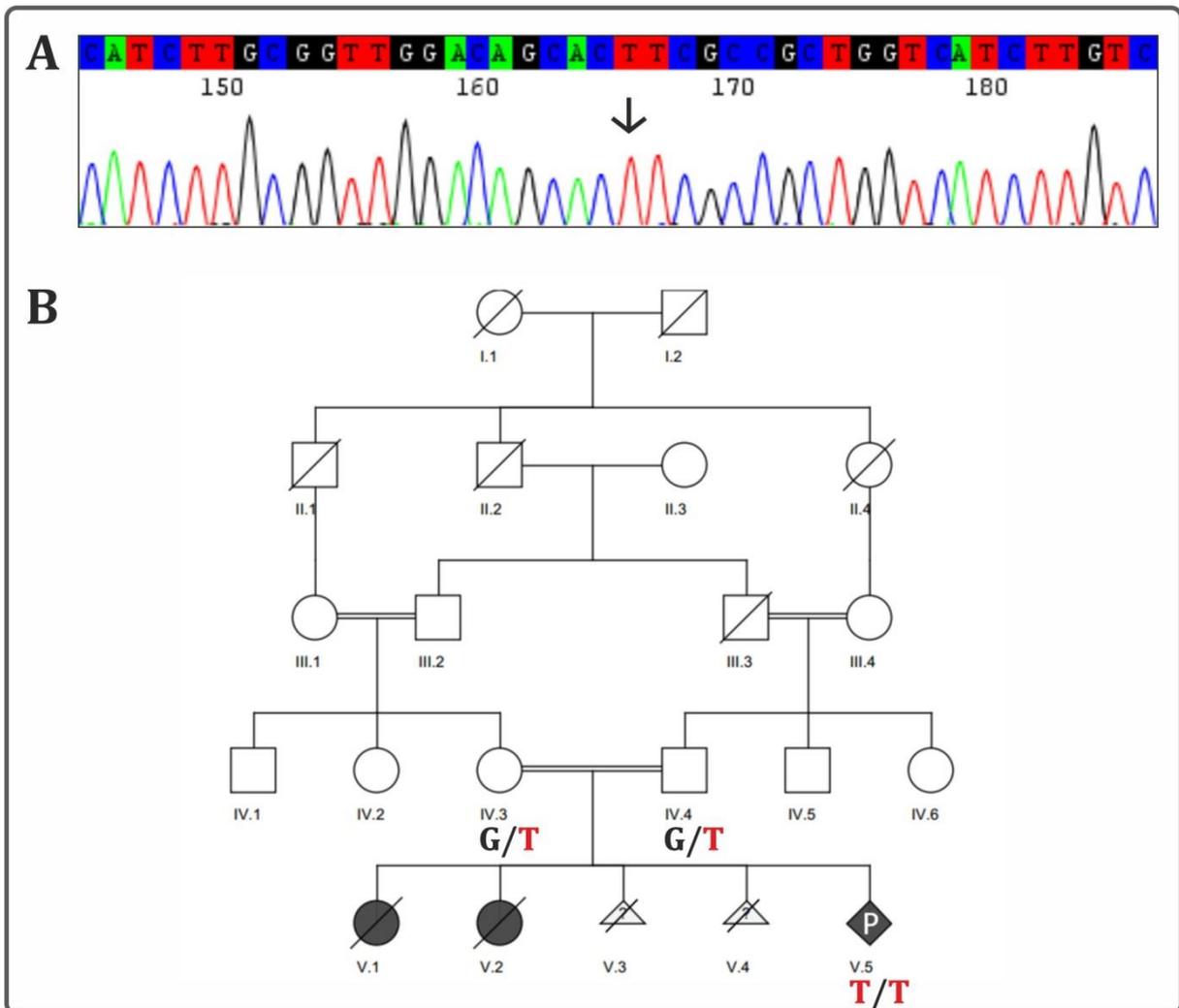


Abbildung 6.4: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_9. (A) Elektropherogramm der *IMPAD1* Sanger-Sequenzierung von Patient V.5 aus Familie IRN_9. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (B) Segregation der *IMPAD1*-Mutation innerhalb der Familie IRN_9.

6.2.3. Familie IRN_10 | *PYCR1*

Für die zwei betroffenen Kinder (Abbildung 6.6C; II.1 und II.2) aus Familie IRN_10 lagen zwar keine detaillierten klinischen Informationen vor, jedoch konnte anhand der Fotos eine schlaffe, faltige Haut bei beiden Kindern festgestellt werden.



Abbildung 6.5: Patient II.1 (A, B) und II.2 (C, D) aus Familie IRN_10.

Durch die WES wurde bei Patient II.1 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *PYCR1* (*pyrroline-5-carboxylate reductase 1*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.3.

Die nachgewiesene *PYCR1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper innerhalb eines etwa 4 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 17 (Abbildung 6.6A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.6B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.6C). Vom Vater (Abbildung 6.6C; I.1) der betroffenen Kinder lag keine DNA für die Segregationsanalyse vor.

Tabelle 6.3: Informationen zur identifizierten *PYCR1*-Mutation in Familie IRN_10.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gencode	<i>PYCR1</i> (<i>pyrroline-5-carboxylate reductase 1</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.79892596G>A
c.Position (Transkript)	c.647C>T (NM_001282281.1)
p.Position	p.Ala216Val
Exon/Intron	Exon 6
Chromosom	17
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Tolerated (score: 0.1)</i>
MutationTaster	<i>Disease causing (p-value: 1)</i>
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 0.995)</i>
DANN Score	0.9981
RVIS Score	-0.53 (20.7%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Cutis laxa, autosomal recessive, type IIB</i> (MIM# 612940) und <i>Cutis laxa, autosomal recessive, type IIIB</i> (MIM# 614438)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

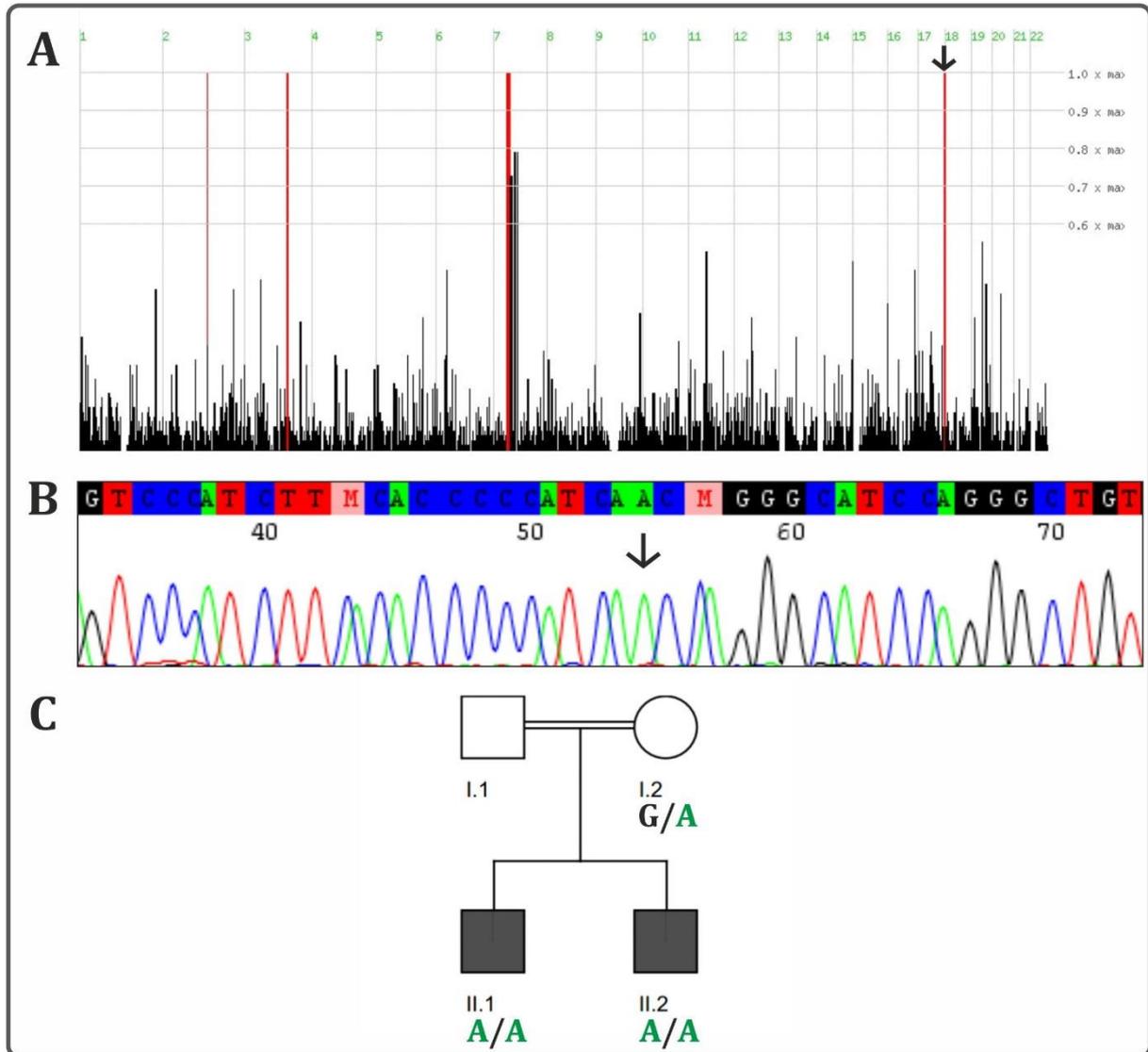


Abbildung 6.6: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_10. (A) Darstellung der bei Patient II.1 detektierten homozygoten Intervalle. Die *PYCR1*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper innerhalb eines ~4 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 17 (schwarzer Pfeil). (B) Elektropherogramm der *PYCR1* Sanger-Sequenzierung von Patient II.1 aus Familie IRN_10. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *PYCR1*-Mutation innerhalb der Familie IRN_10.

6.2.4. Familie IRN_11 | *DNMT3B*

Bei dem einzigen betroffenen Kind (Abbildung 6.8C; IV.1) aus Familie IRN_11 handelt es sich um einen zum Zeitpunkt der Untersuchung 3,5-jährigen Jungen mit mildem Hydrozephalus, Entwicklungsverzögerung, Fehlbildungen des Harnleiters und des Herzens, fazialen Dysmorphiezeichen (Ptosis, Epicanthus, Hypertelorismus, geschwungene Augenbrauen) und einem gotischen Gaumen. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.



Abbildung 6.7: Patient IV.1 aus Familie IRN_11.

Durch die WES wurde bei Patient IV.1 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *DNMT3B* (*DNA methyltransferase 3 beta*) detektiert, die bei der Mutter (Abbildung 6.8C; III.2) in heterozygotem Zustand vorlag. Vom Vater (Abbildung 6.8C; III.3) des betroffenen Jungen stand keine DNA zur Verfügung. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.4.

Die nachgewiesene *DNMT3B*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper zwischen zwei homozygoten Intervallen auf Chromosom 20 und etwa 1,3 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall entfernt (Abbildung 6.8A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.8B, C).

Tabelle 6.4: Informationen zur identifizierten *DNMT3B*-Mutation in Familie IRN_11.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gename	<i>DNMT3B</i> (<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.31386367G>A
c.Position (Transkript)	c.1592G>A
p.Position	p.Arg531His
Exon/Intron	Exon 15
Chromosom	20
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	moderat
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious</i> (score: 0.01)
MutationTaster	<i>Disease causing</i> (p-value: 0.889)
PolyPhen-2	<i>Probably damaging</i> (score: 0.998)
DANN Score	0.9988
RVIS Score	-1.7 (2.54%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Allele Frequency: 0.00006381 Number of Homozygotes: 0
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome 1</i> (MIM# 242860)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

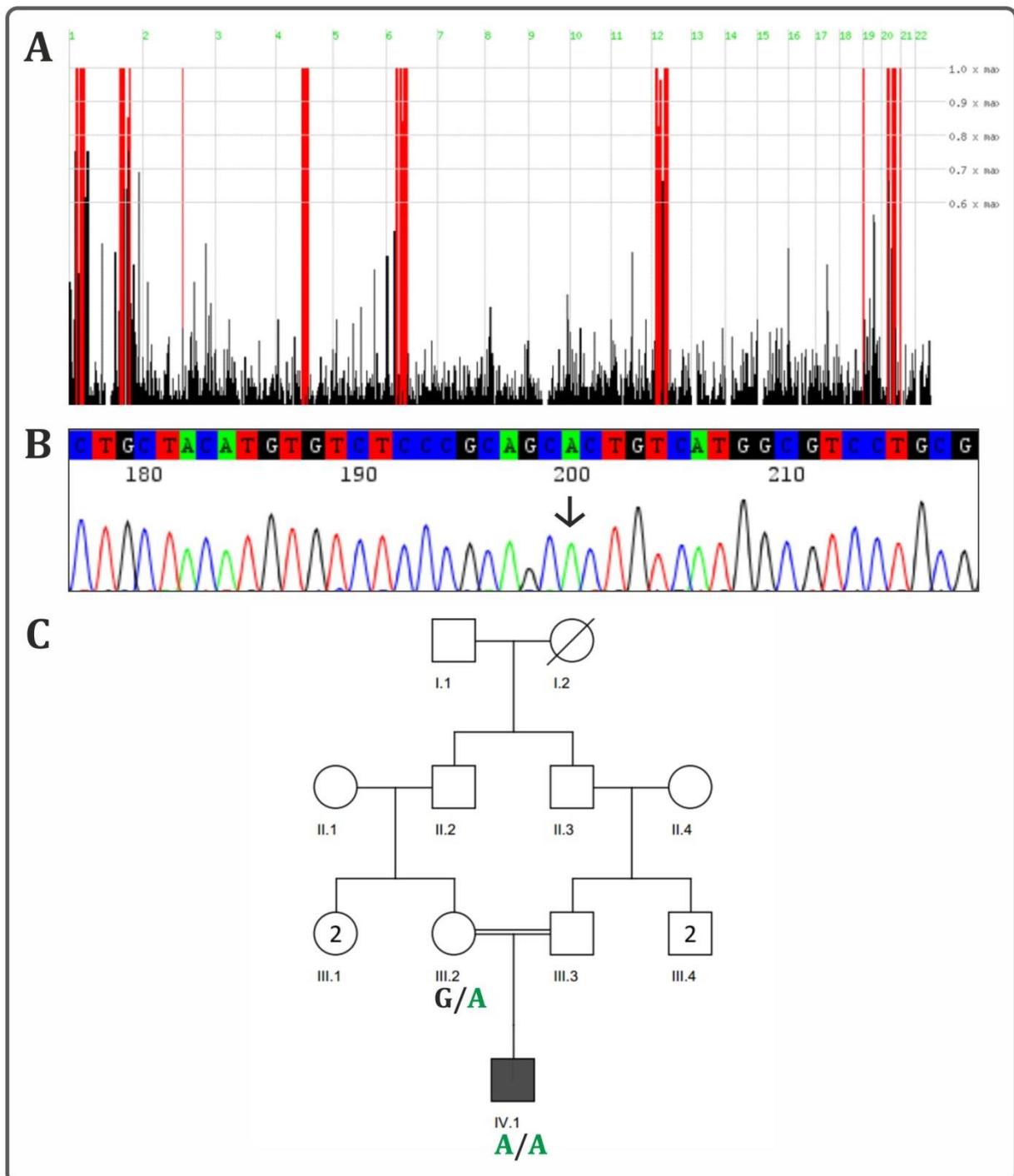


Abbildung 6.8: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_11. (A) Darstellung der bei Patient IV.1 detektierten homozygoten Intervalle. Die *DNMT3B*-Mutation liegt laut Homozygoten-Mapper ~1,3 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall auf Chromosom 20 entfernt. (B) Elektropherogramm der *DNMT3B* Sanger-Sequenzierung von Patient IV.1 aus Familie IRN_11. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *DNMT3B*-Mutation innerhalb der Familie IRN_11.

6.2.5. Familie IRN_12 | PEX7

In Familie IRN_12 gibt es drei betroffene Kinder (Abbildung 6.9B; III.8, III.9, IV.1) in zwei verschiedenen Familienzweigen, die alle den gleichen Phänotyp zeigen. Für die Indexpatientin IV.1 sind klinisch eine Deformation und Subluxation der Epiphysen des Femur, eine angeborene Coxa vara, eine Intelligenzminderung, wiederkehrende Pneumonien, steife Gelenke seit der Geburt, Fehlbildungen des Herzens, ein bilaterales Katarakt, eine Athelie (Fehlen der Brustwarzen), Krampfanfälle, sowie Konstipation und Gewichtsverlust beschrieben.

Durch die WES wurde bei Patientin IV.1 eine homozygote *inframe* Deletion im Gen *PEX7* (*peroxisomal biogenesis factor 7*) detektiert, die bei beiden Eltern (Abbildung 6.9B; III.4 und III.5) in heterozygotem Zustand vorlag. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.5.

Die nachgewiesene *PEX7*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper weder innerhalb eines homozygoten Intervalls, noch in dessen Nähe.

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.9A), sowie die Segregation der nachgewiesenen Deletion innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.9B). Ein betroffener Onkel 2. Grades (Abbildung 6.9B; III.9) der Indexpatientin weist die *PEX7* Deletion ebenfalls auf.

Tabelle 6.5: Informationen zur identifizierten *PEX7*-Mutation in Familie IRN_12.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>PEX7</i> (<i>peroxisomal biogenesis factor 7</i>)
Mutationstyp	<i>inframe deletion</i>
g.Position	g.137166782delAGGTGAACAGCTTGTGGTGTCTGGCTC
c.Position (Transkript)	c.370_396del (NM_000288.3)
p.Position	p.Gly124_Ser132del
Exon/Intron	Exon 4
Chromosom	6
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	/
Aminosäure	/
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	/
MutationTaster	/
PolyPhen-2	/
DANN Score	/
RVIS Score	0.01 (54.95%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Peroxisome biogenesis disorder 9B</i> (MIM# 614879) und <i>Rhizomelic chondrodysplasia punctata, type 1</i> (MIM# 215100)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

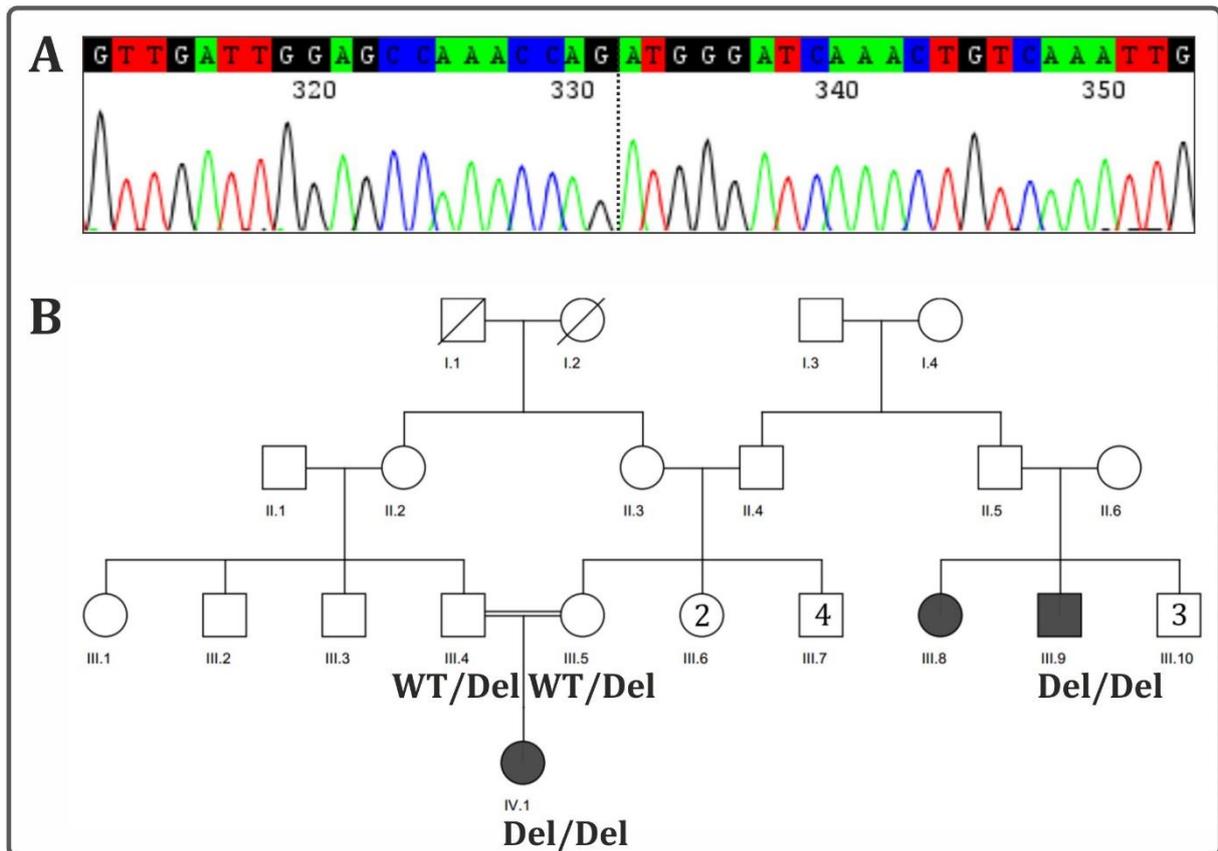


Abbildung 6.9: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_12. (A) Elektropherogramm der *PEX7* Sanger-Sequenzierung von Patientin IV.1 aus Familie IRN_12. Die gestrichelte Linie markiert die beiden Basen, zwischen denen die Deletion stattgefunden hat. (B) Segregation der *PEX7*-Mutation innerhalb der Familie IRN_12.

6.2.6. Familie IRN_13 | *INPPL1*

In Familie IRN_13 gab es ein betroffenes Kind (Abbildung 6.10C; V.3), das kurz nach der Geburt verstorben ist und verkürzte Extremitäten aufwies. Bei dem Fötus der darauffolgenden Schwangerschaft (Abbildung 6.10C; V.4) wurden über eine Ultraschall-Untersuchung ebenfalls verkürzte Extremitäten festgestellt. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

Durch die WES wurde bei Patient V.4 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *INPPL1* (*inositol polyphosphate phosphatase like 1*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.6.

Die nachgewiesene *INPPL1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper innerhalb eines etwa 8,8 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 11 (Abbildung 6.10A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.10B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.10C).

Tabelle 6.6: Informationen zur identifizierten *INPPL1*-Mutation in Familie IRN_13.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>INPPL1</i> (<i>inositol polyphosphate phosphatase like 1</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.71944506T>C
c.Position (Transkript)	c.2062T>C (NM_001567.3)
p.Position	p.Trp688Arg
Exon/Intron	Exon 18
Chromosom	11
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0.04)</i>
MutationTaster	<i>Disease causing (p-value: 1)</i>
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 1.000)</i>
DANN Score	0.9967
RVIS Score	-1.63 (2.84%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Opsismodysplasia</i> (MIM# 258480)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

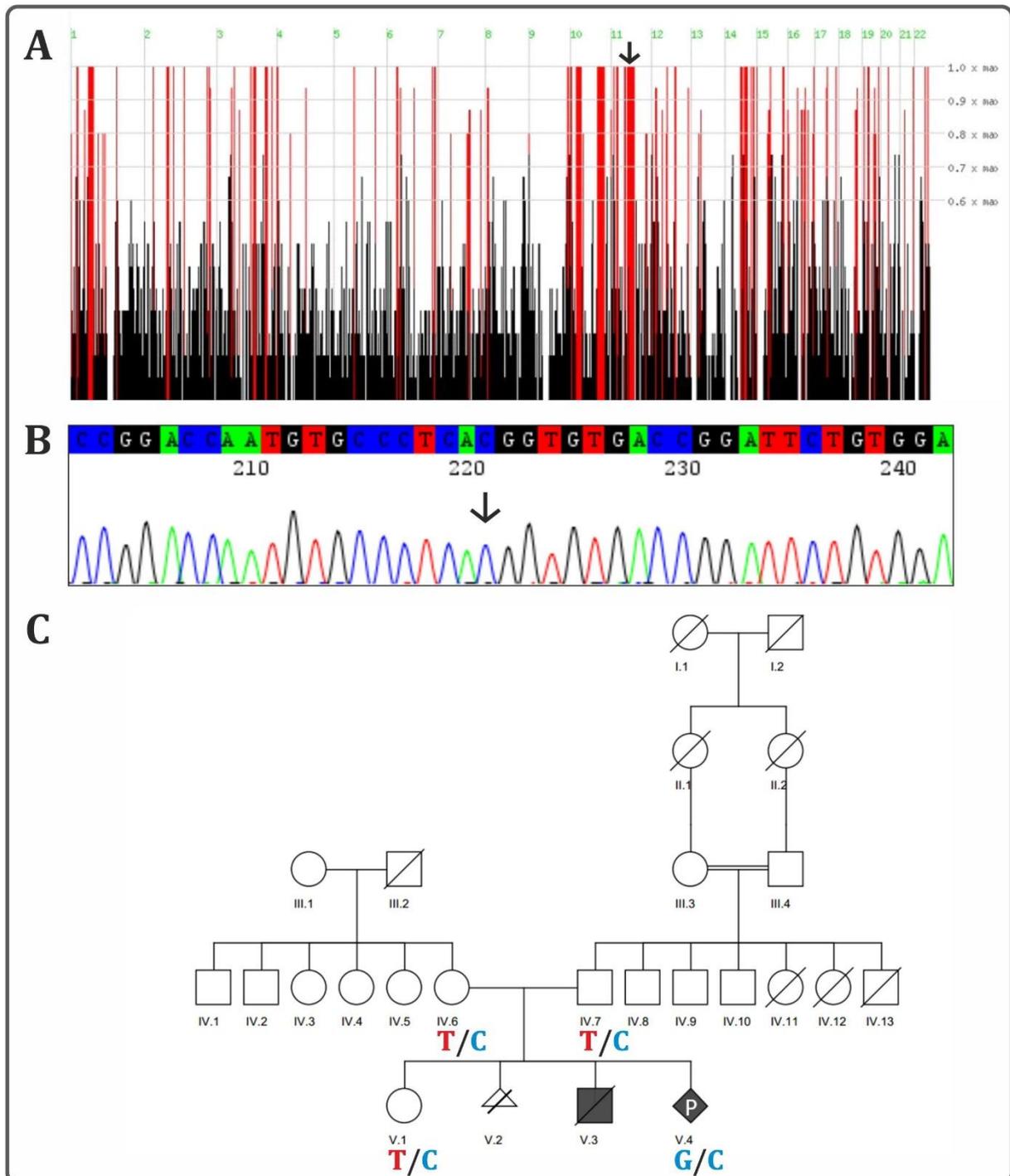


Abbildung 6.10: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_13. (A) Darstellung der bei Patient V.4 detektierten homozygoten Intervalle. Die *INPPL1*-Mutation liegt laut Homozygotismapper innerhalb eines ~8,8 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 11 (schwarzer Pfeil). (B) Elektropherogramm der *INPPL1* Sanger-Sequenzierung von Patient V.4 aus Familie IRN_13. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *INPPL1*-Mutation innerhalb der Familie IRN_13.

6.2.7. Familie IRN_15 | *TRAF3IP1*

In Familie IRN_15 gab es zwei betroffene Kinder (Abbildung 6.11B; IV.1 und IV.2), die kurz nach der Geburt verstorben sind. Beide zeigten eine starke Verkürzung der Extremitäten. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

Durch die WES wurde bei Patientin IV.2 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *TRAF3IP1* (*TRAF3 interacting protein 1*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.7.

Die nachgewiesene *TRAF3IP1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper weder innerhalb eines homozygoten Intervalls, noch in dessen Nähe. Das nächstgelegene homozygote Intervall auf Chromosom 2 befindet sich etwa 106 Mb entfernt.

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.11A), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.11B).

Tabelle 6.7: Informationen zur identifizierten *TRAF3IP1*-Mutation in Familie IRN_15.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gename	<i>TRAF3IP1</i> (<i>TRAF3 interacting protein 1</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.239233992G>A
c.Position (Transkript)	c.169G>A (NM_015650.3)
p.Position	p.Glu57Lys
Exon/Intron	Exon 2
Chromosom	2
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0)</i>
MutationTaster	<i>Disease causing (p-value: 1)</i>
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 1.000)</i>
DANN Score	0.9993
RVIS Score	0.96 (90.17%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	<i>Allele Frequency: 0.00002121</i> <i>Number of Homozygotes: 0</i>
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Senior-Loken syndrome 9 (MIM# 616629)</i>
HGMD	CM182286: <i>Short rib-polydactyly syndrome, type 2</i>

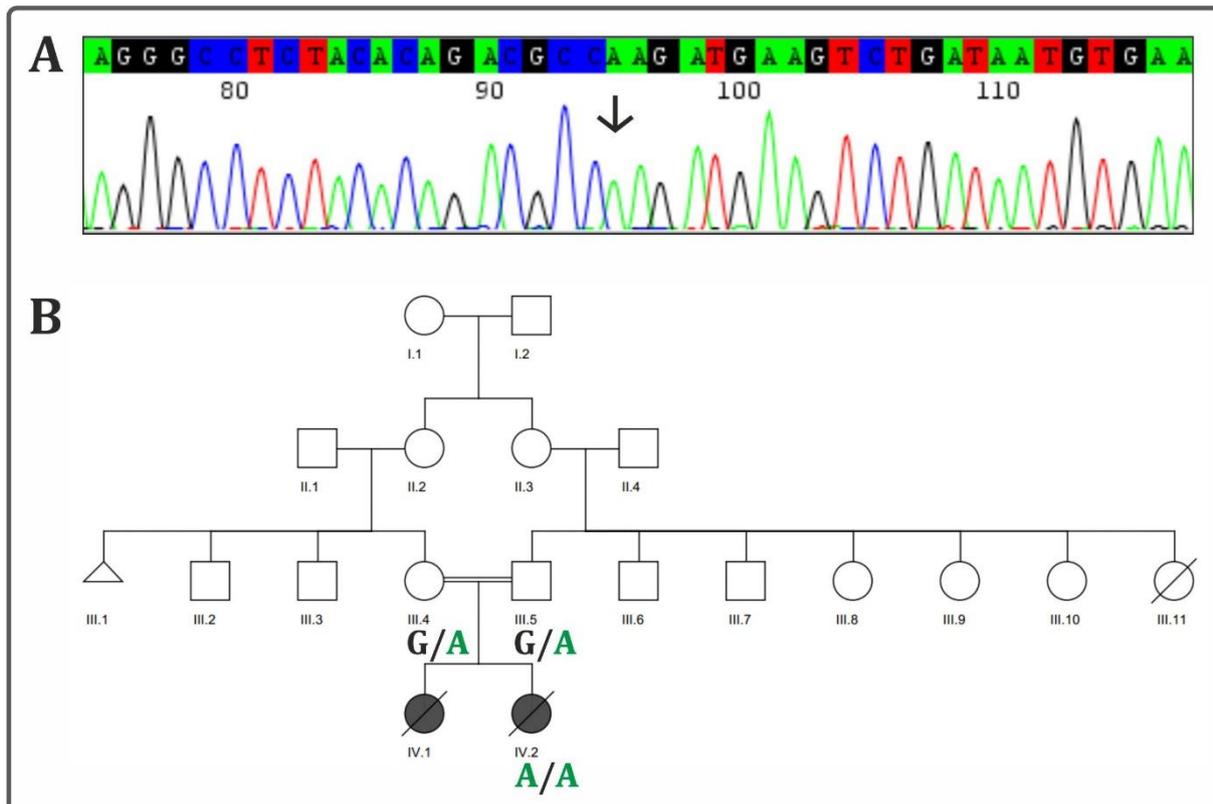


Abbildung 6.11: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_15. (A) Elektropherogramm der *TRAF3IP1* Sanger-Sequenzierung von Patientin IV.2 aus Familie IRN_15. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (B) Segregation der *TRAF3IP1*-Mutation innerhalb der Familie IRN_15.

6.2.8. Familie PAK_1 | *GCH1*

In Familie PAK_1 gibt es zwei Kinder (Abbildung 6.13C; II.3 und II.4), die gleichermaßen von Dystonien betroffen sind und nicht in der Lage sind, selbstständig zu sitzen oder zu gehen. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.



Abbildung 6.12: Patientin II.3 (A, rechts und C) und Patient II.4 (A, links und B) aus Familie PAK_1.

Durch die WES wurde bei Patientin II.3 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *GCH1* (*GTP cyclohydrolase 1*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.8.

Die nachgewiesene *GCH1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper etwa 600 kb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall auf Chromosom 14 entfernt (Abbildung 6.13A). Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.13B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.13C).

Tabelle 6.8: Informationen zur identifizierten *GCH1*-Mutation in Familie PAK_1.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gencode	<i>GCH1 (GTP cyclohydrolase 1)</i>
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.55312520G>A
c.Position (Transkript)	c.592C>T (NM_001024024.1)
p.Position	p.Arg198Trp
Exon/Intron	Exon 5
Chromosom	14
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	schwach
Aminosäure	schwach
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0.01)</i>
MutationTaster	<i>Polymorphism (p-value: 0.521)</i>
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 0.982)</i>
DANN Score	0.9989
RVIS Score	-0.1 (46.2%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Dystonia, DOPA-responsive, with or without hyperphenylalaninemia (MIM# 128230) und Hyperphenylalaninemia, BH4-deficient, B (MIM# 233910)</i>
HGMD	CM086712: <i>Dystonia, DOPA-responsive</i>

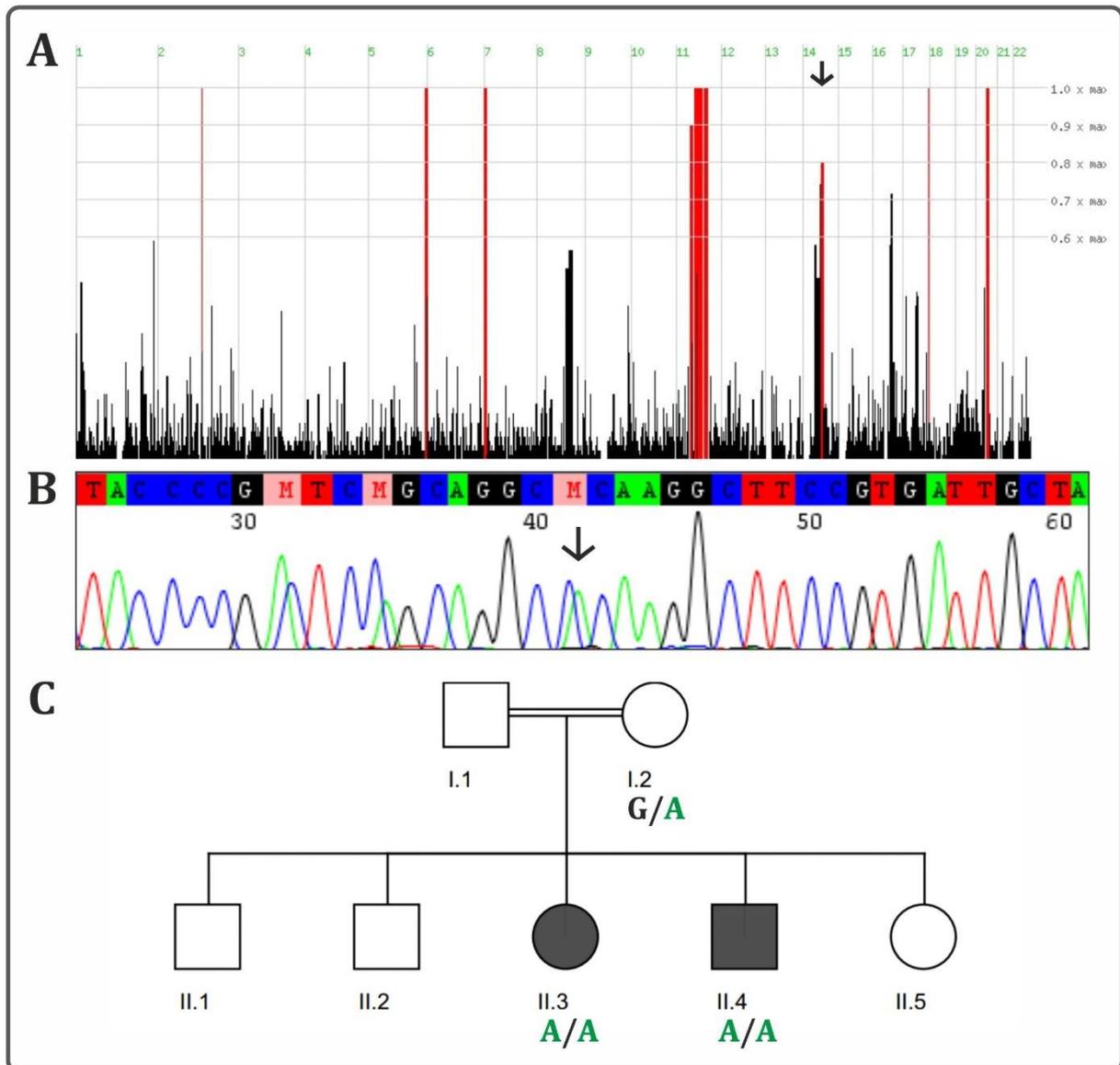


Abbildung 6.13: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_1. (A) Darstellung der bei Patientin II.3 detektierten homozygoten Intervalle. Die *GCH1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper ~600 kb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall (schwarzer Pfeil) auf Chromosom 14 entfernt. (B) Elektropherogramm der *GCH1* Sanger-Sequenzierung von Patientin II.3 aus Familie PAK_1. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *GCH1*-Mutation innerhalb der Familie PAK_1.

6.2.9. Familie PAK_4 | *CHST3*

Für die beiden betroffenen Frauen (Abbildung 6.15C; IV.1 und IV.2) aus Familie PAK_4 lagen keine klinischen Informationen vor. Anhand der Fotos konnten bei beiden jedoch Fehlbildungen (u.a. starke Verkürzung) der unteren Extremitäten festgestellt werden.



Abbildung 6.14: Patientinnen IV.1 (A) und IV.2 (B) aus Familie PAK_4.

Durch die WES wurde bei Patientin IV.2 eine homozygote *frameshift* Insertion im Gen *CHST3* (*carbohydrate sulfotransferase 3*) detektiert, die bei der Mutter (Abbildung 6.15C; III.4) in heterozygotem Zustand vorlag. Bei der ebenfalls betroffenen Schwester (IV.1) zeigte diese Insertion eine auf einen heterozygoten Zustand hindeutende Frequenz. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.9.

Die nachgewiesene *CHST3*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper zwischen zwei homozygoten Intervallen auf Chromosom 10, die sich beide betroffenen Schwestern IV.1 und IV.2 teilen und etwa 2 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall entfernt (Abbildung 6.15A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.15B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.15C). Patientin IV.1 wies die *CHST3*-Mutation dabei ebenfalls in homozygotem Zustand auf.

Tabelle 6.9: Informationen zur identifizierten *CHST3*-Mutation in Familie PAK_4.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gename	<i>CHST3</i> (<i>carbohydrate sulfotransferase 3</i>)
Mutationstyp	<i>frameshift insertion</i>
g.Position	g.73767162insGACC
c.Position (Transkript)	c.373_374insGACC (NM_004273.4)
p.Position	p.Ala127Thrfs*194
Exon/Intron	Exon 3
Chromosom	10
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	/
Aminosäure	/
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	/
MutationTaster	/
PolyPhen-2	/
DANN Score	/
RVIS Score	-0.34 (30.37%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt

DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Spondyloepiphyseal dysplasia with congenital joint dislocations</i> (MIM# 143095)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

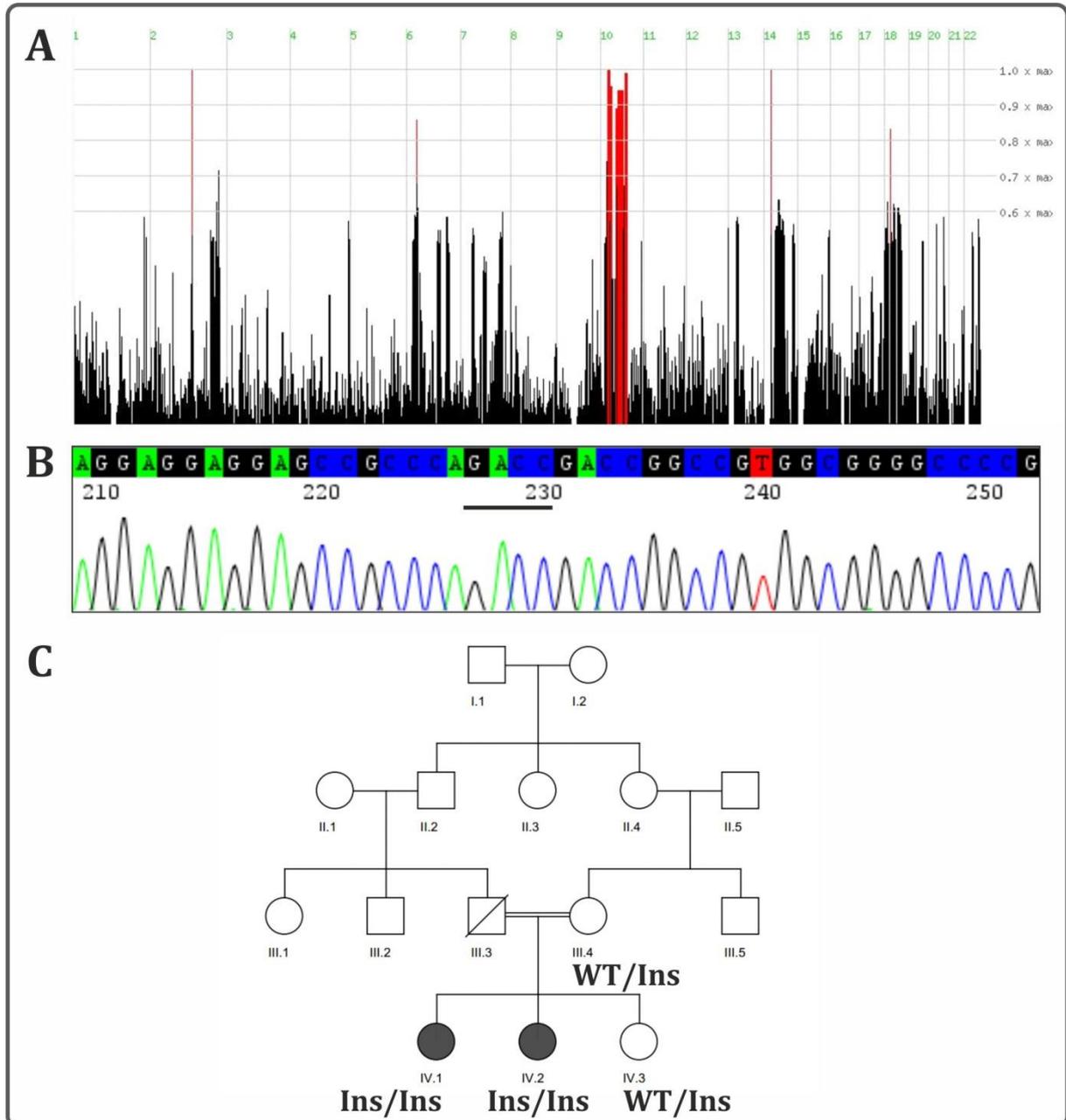


Abbildung 6.15: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_4. (A) Darstellung der homozygoten Intervalle, die sich die Patientinnen IV.1 und IV.2 aus Familie PAK_4 teilen. Die *CHST3*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper ~2 Mb vom nächstgelegenen gemeinsamen homozygoten Intervall auf Chromosom 10 entfernt. (B) Elektropherogramm der *CHST3* Sanger-Sequenzierung von Patientin IV.2 aus Familie PAK_4. Die schwarze Linie markiert die inserierten Nukleotide. (C) Segregation der *CHST3*-Mutation innerhalb der Familie PAK_4.

6.2.10. Familie PAK_9 | *MAP3K20* | *NEB*

Zu den betroffenen Kindern (Abbildung 6.17C; IV.1 und IV.2) aus Familie PAK_9 lag keine klinische Beschreibung vor. Anhand der Bilder konnten zumindest bei dem betroffenen Jungen (IV.1) eine starke Skoliose, Scapulae alatae sowie eine Trichterbrust (*Pectus excavatum*) festgestellt werden.

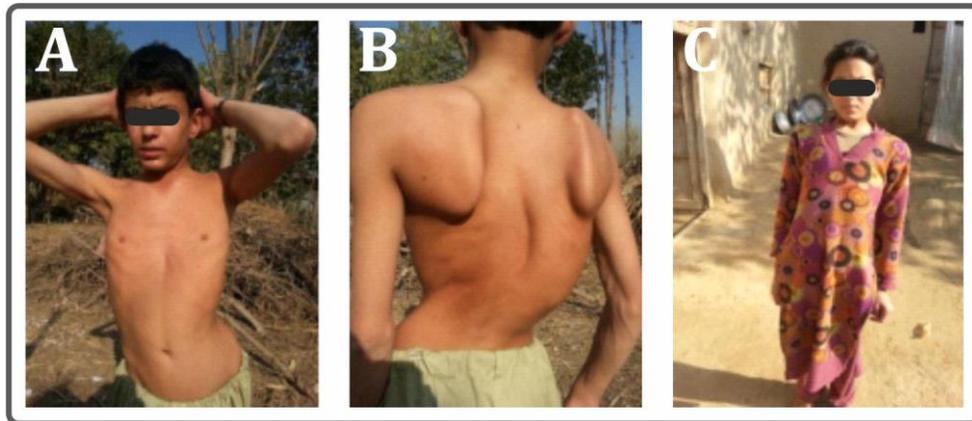


Abbildung 6.16: Patient IV.1 (A, B) und Patientin IV.2 (C) aus Familie PAK_9.

Durch die WES wurde bei Patientin IV.2 sowohl eine homozygote *missense* Mutation im Gen *MAP3K20* (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 20*), als auch eine homozygote *missense* Mutation im Gen *NEB* (*nebulin*) detektiert. Weitere Details zu den identifizierten Mutationen finden sich in Tabelle 6.10 und Tabelle 6.11.

Die nachgewiesene *MAP3K20*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper etwa 10 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall entfernt. Die *NEB*-Mutation liegt dagegen innerhalb eines etwa 8,2 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 2 (Abbildung 6.17A). Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.17B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvarianten innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.17C).

Tabelle 6.10: Informationen zur identifizierten *MAP3K20*-Mutation in Familie PAK_9.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>MAP3K20</i> (<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 20</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.173955806T>C
c.Position (Transkript)	c.47T>C (NM_016653.2)
p.Position	p.Leu16Ser
Exon/Intron	Exon 2
Chromosom	2
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious</i> (score: 0)
MutationTaster	<i>Disease causing</i> (p-value: 1)
PolyPhen-2	<i>Probably damaging</i> (score: 0.997)
DANN Score	0.9988
RVIS Score	0.71 (85.82%)

POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Centronuclear myopathy 6 with fiber-type disproportion (MIM# 617760) und Split-foot malformation with mesoaxial polydactyly (MIM# 616890)</i>
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

Tabelle 6.11: Informationen zu einer zweiten identifizierten *NEB*-Mutation in Familie PAK_9.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gename	<i>NEB (nebulin)</i>
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.152420387G>A
c.Position (Transkript)	c.18529C>T (NM_001271208.1)
p.Position	p.Arg6177Cys
Exon/Intron	Exon 118
Chromosom	2
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	schwach
Aminosäure	moderat
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0)</i>
MutationTaster	/
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 0.999)</i>
DANN Score	0.9988
RVIS Score	0.88 (88.9%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	<i>Allele Frequency: 0.00006468 Number of Homozygotes: 0</i>
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Nemaline myopathy 2, autosomal recessive (MIM# 256030)</i>
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

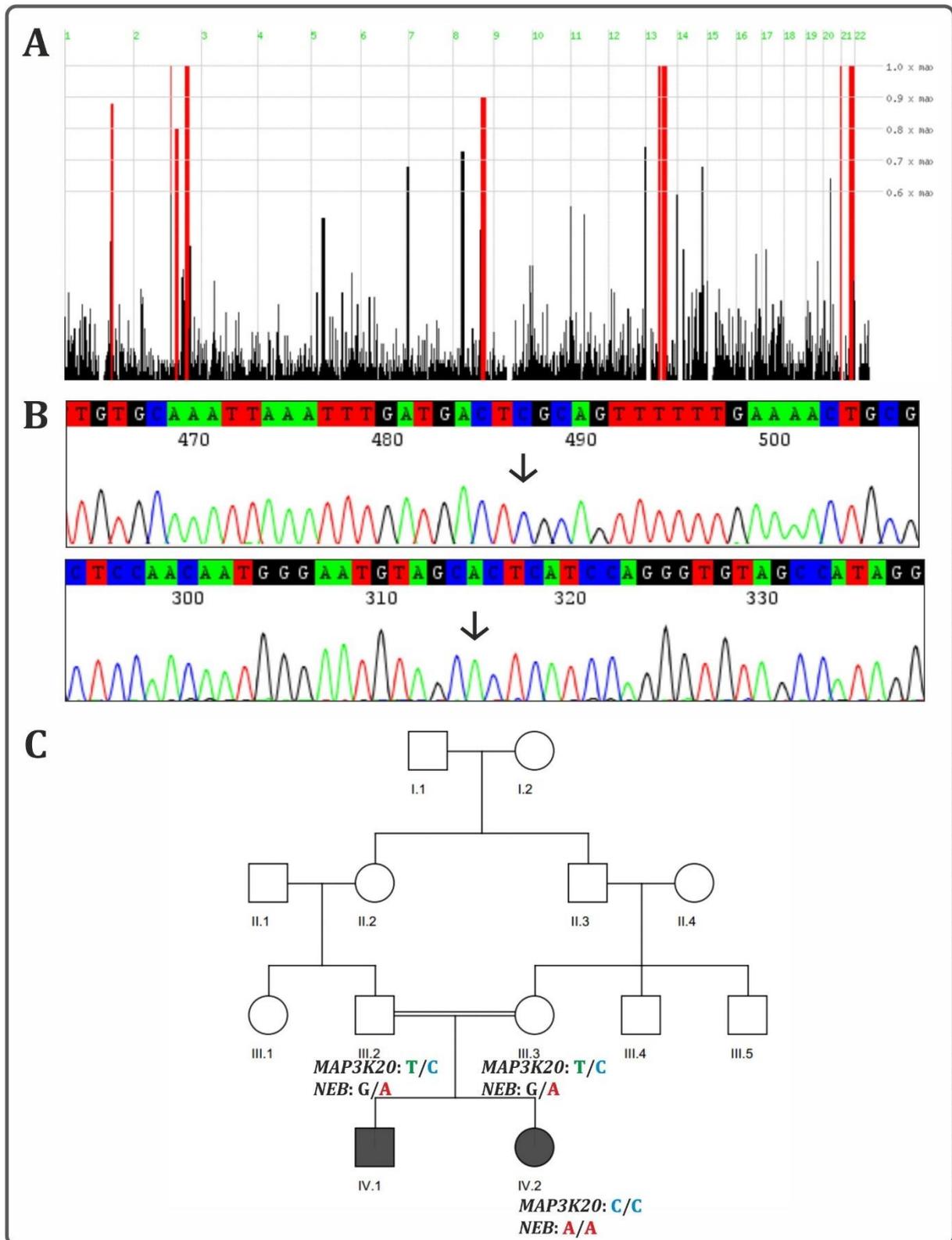


Abbildung 6.17: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_9. (A) Darstellung der bei Patientin IV.2 detektierten homozygoten Intervalle. Die *MAP3K20*-Mutation liegt laut HomozygotenMapper ~10 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall entfernt. Die *NEB*-Mutation hingegen liegt innerhalb eines ~8,2 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 2. (B) Elektropherogramme der *MAP3K20* (oben) und *NEB* (unten) Sanger-Sequenzierungen von Patientin IV.2 aus Familie PAK_9. Die schwarzen Pfeile markieren die mutierten Basen. (C) Segregation der *MAP3K20*- und *NEB*-Mutationen innerhalb der Familie PAK_9.

6.2.11. Familie PAK_11 | *UROC1*

In Familie PAK_11 gibt es zwei betroffene Schwestern (Abbildung 6.19C; IV.1 und IV.2), die nach Angaben des Kollaborationspartners eine Intelligenzminderung sowie einen ruckartigen Gang aufweisen. Ein weiteres, als betroffen markiertes Familienmitglied im Stammbaum (Abbildung 6.19C; III.1) wurde klinisch nicht näher beschrieben.



Abbildung 6.18: Patientinnen IV.1 (A) und IV.2 (B) aus Familie PAK_11.

Durch die WES wurde bei Patientin IV.1 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *UROC1* (*urocanate hydratase 1*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.12.

Die nachgewiesene *UROC1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper innerhalb eines etwa 14,4 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 3 (Abbildung 6.19A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.19B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.19C).

Tabelle 6.12: Informationen zur identifizierten *UROC1*-Mutation in Familie PAK_11.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>UROC1</i> (<i>urocanate hydratase 1</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.126226592C>T
c.Position (Transkript)	c.595G>A (NM_001165974.1)
p.Position	p.Val199Ile
Exon/Intron	Exon 6
Chromosom	3
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	moderat
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0)</i>
MutationTaster	<i>Disease causing (p-value: 1)</i>
PolyPhen-2	<i>Benign (score: 0.074)</i>
DANN Score	0.9988
RVIS Score	0.32 (72.83%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	<i>Allele Frequency: 0.00001988</i> <i>Number of Homozygotes: 0</i>
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt

DATENBANK	ANNOATION
OMIM	?Urocanase deficiency (MIM# 276880)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

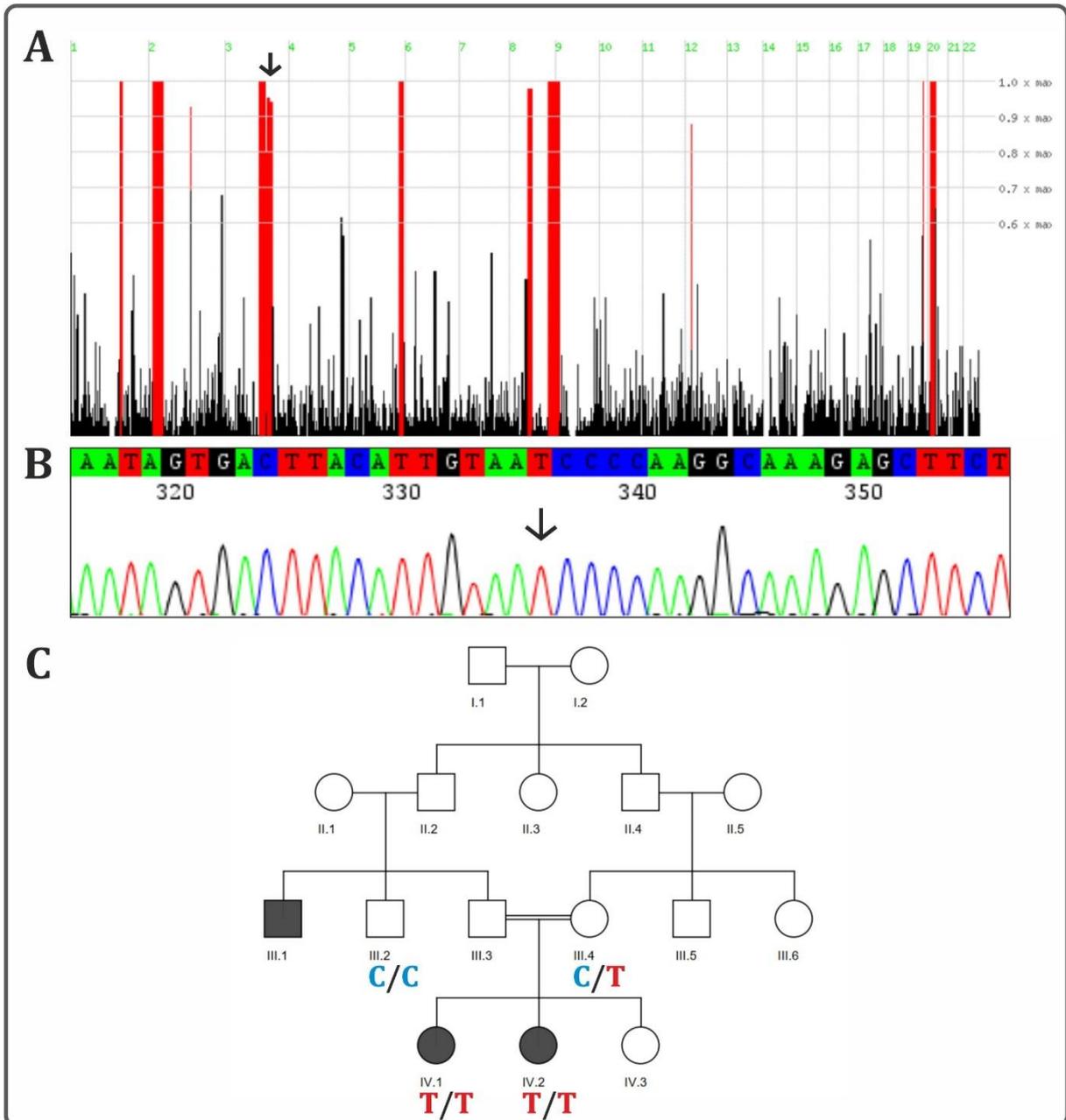


Abbildung 6.19: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_11. (A) Darstellung der bei Patientin IV.1 detektierten homozygoten Intervalle. Die *UROC1*-Mutation liegt laut HomozygotenMapper innerhalb eines ~14,4 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 3 (schwarzer Pfeil). (B) Elektropherogramm der *UROC1* Sanger-Sequenzierung von Patientin IV.1 aus Familie PAK_11. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *UROC1*-Mutation innerhalb der Familie PAK_11.

6.2.12. Familie PAK_14 | SGCA

In Familie PAK_14 gibt es fünf als betroffen markierte Kinder (Abbildung 6.21C; IV.1, IV.2, IV.5, IV.7, IV.8), deren Phänotyp jedoch weder näher beschrieben wurde, noch anhand der Fotos ersichtlich war. Lediglich bei Patient IV.7 war eine Fußfehlbildung zu erkennen.



Abbildung 6.20: Patienten IV.5 (A, B), IV.7 (C, D) und IV.8 (E, F) aus Familie PAK_14.

Durch die WES wurde bei Patient IV.7 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *SGCA* (*sarcoglycan alpha*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.13.

Die nachgewiesene *SGCA*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper etwa 5,8 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall auf Chromosom 17 entfernt (Abbildung 6.21A). Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.21B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.21C).

Tabelle 6.13: Informationen zur identifizierten *SGCA*-Mutation in Familie PAK_14.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gencode	<i>SGCA</i> (<i>sarcoglycan alpha</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.48244982T>A
c.Position (Transkript)	c.197T>A (NM_000023.2)
p.Position	p.Leu66His
Exon/Intron	Exon 3
Chromosom	17
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	schwach
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0.01)</i>
MutationTaster	<i>Disease causing (p-value: 1)</i>
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 1.000)</i>
DANN Score	0.9844
RVIS Score	-0.71 (14.5%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Muscular dystrophy, limb-girdle, autosomal recessive 3 (MIM# 608099)</i>
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

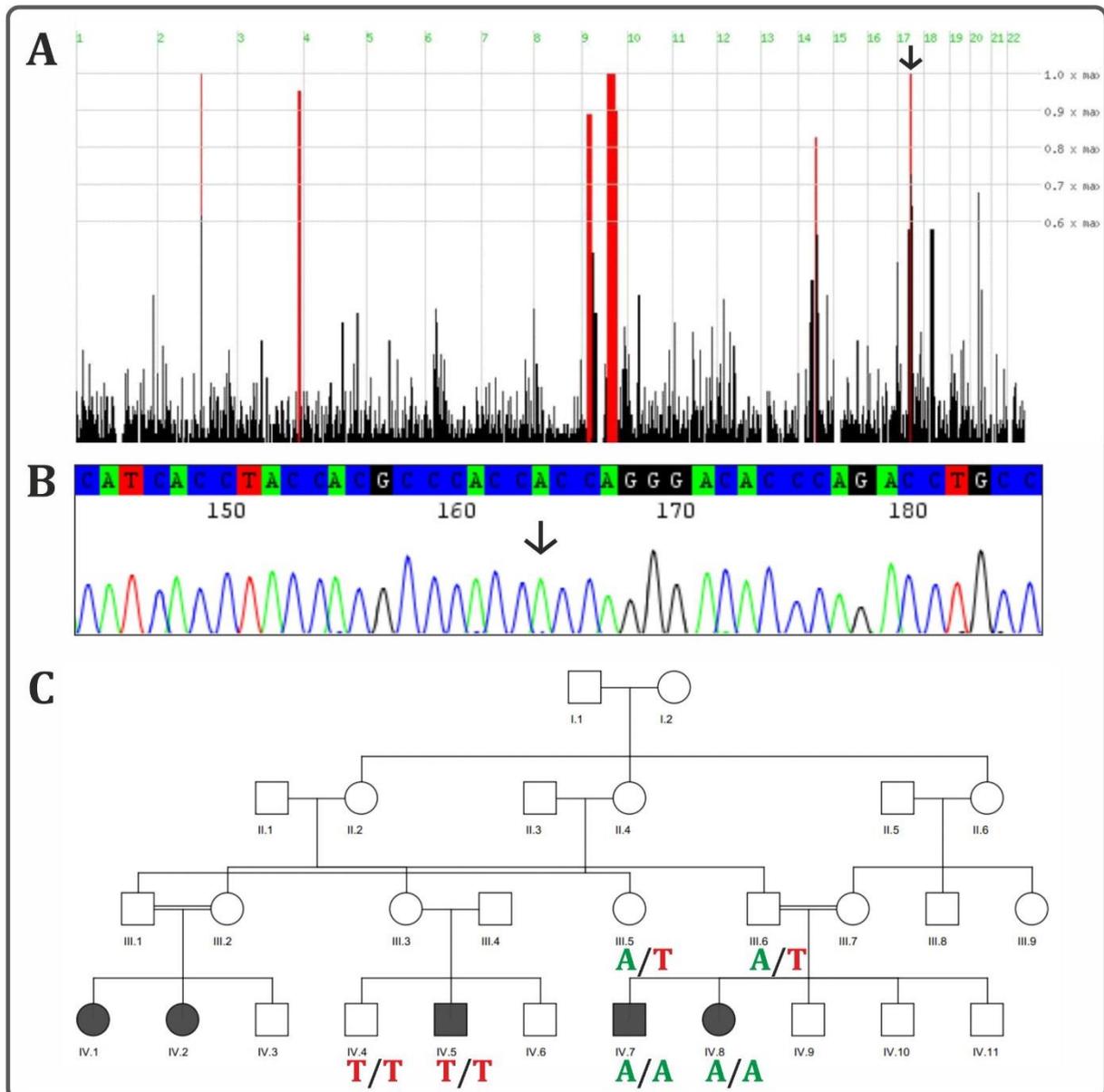


Abbildung 6.21: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_14. (A) Darstellung der bei Patient IV.7 detektierten homozygoten Intervalle. Die *SGCA*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper ~5,8 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall (schwarzer Pfeil) auf Chromosom 17 entfernt. (B) Elektropherogramm der *SGCA* Sanger-Sequenzierung von Patient IV.7 aus Familie PAK_14. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *SGCA*-Mutation innerhalb der Familie PAK_14.

6.2.13. Familie PAK_15 | *CAPN3*

In Familie PAK_15 gibt es zwei betroffene Brüder (Abbildung 6.23C; IV.1 und IV.3), deren Phänotyp nicht näher beschrieben wurde. Die Fotos der Betroffenen lassen jedoch darauf schließen, dass sie nur mühsam oder gar nicht selbstständig gehen können.



Abbildung 6.22: Patienten IV.1 (A, B) und IV.3 (C) aus Familie PAK_15.

Durch die WES wurde bei Patient IV.1 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *CAPN3* (*calpain 3*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.14.

Die nachgewiesene *CAPN3*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper zwischen zwei homozygoten Intervallen auf Chromosom 15 und etwa 380 kb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall entfernt (Abbildung 6.23A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.23B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.23C).

Tabelle 6.14: Informationen zur identifizierten *CAPN3*-Mutation in Familie PAK_15.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gencode	<i>CAPN3</i> (<i>calpain 3</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.42681188C>T
c.Position (Transkript)	c.695C>T (NM_000070.2)
p.Position	p.Thr232Ile
Exon/Intron	Exon 11
Chromosom	15
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious</i> (score: 0)
MutationTaster	<i>Disease causing</i> (p-value: 1)
PolyPhen-2	<i>Probably damaging</i> (score: 1.000)
DANN Score	0.9992
RVIS Score	-0.7 (14.81%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Muscular dystrophy, limb-girdle, autosomal dominant 4</i> (MIM# 618129) und <i>Muscular dystrophy, limb-girdle, autosomal recessive 1</i> (MIM# 253600)
HGMD	CM990307: <i>Muscular dystrophy, limb girdle</i>

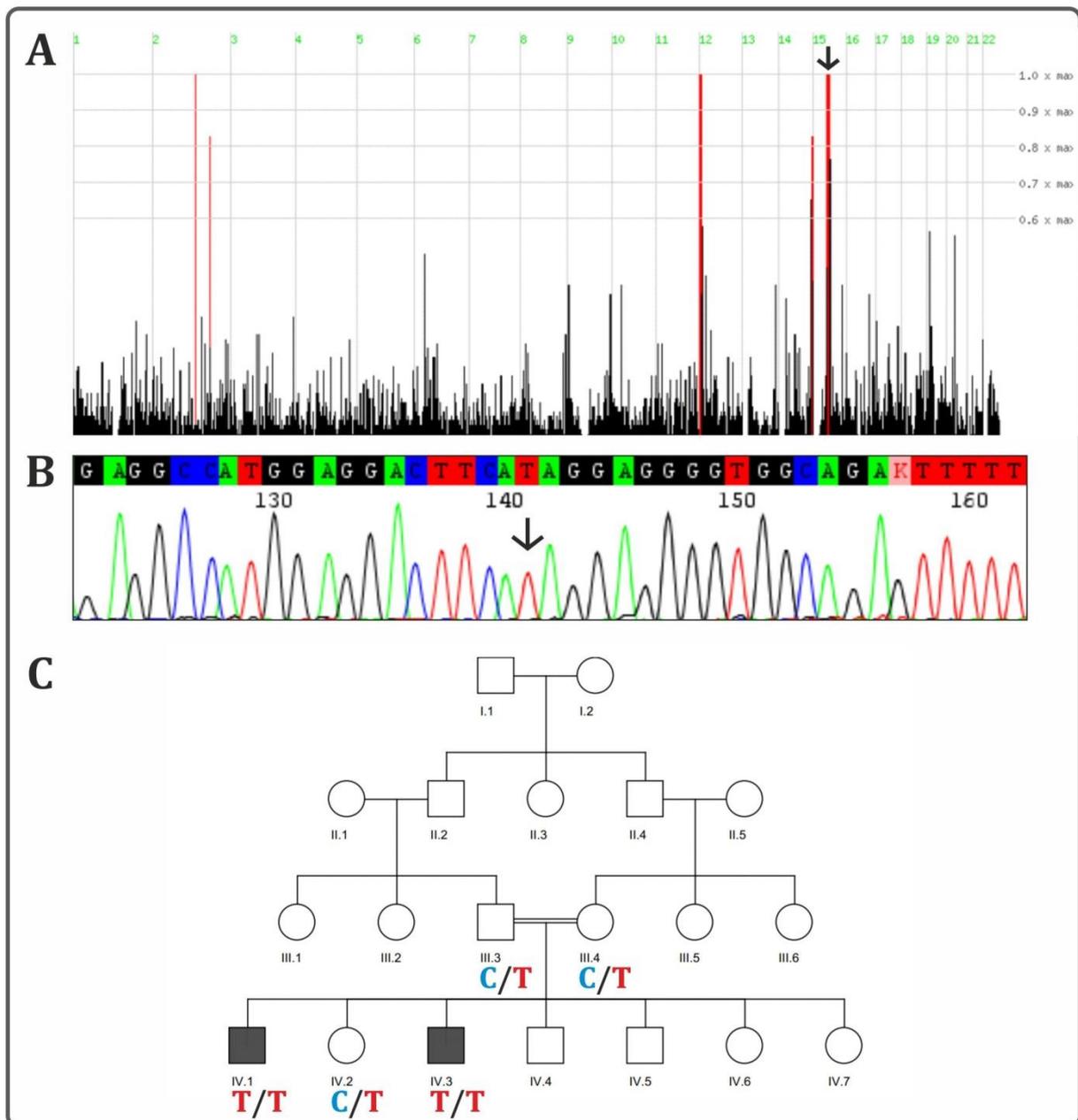


Abbildung 6.23: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_15. (A) Darstellung der bei Patient IV.1 detektierten homozygoten Intervalle. Die *CAPN3*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper ~380 kb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall (schwarzer Pfeil) auf Chromosom 15 entfernt. (B) Elektropherogramm der *CAPN3* Sanger-Sequenzierung von Patient IV.1 aus Familie PAK_15. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *CAPN3*-Mutation innerhalb der Familie PAK_15.

6.2.14. Familie PAK_16 | *MTMR2*

In Familie PAK_16 gibt es fünf betroffene Geschwister (Abbildung 6.25B; IV.3, IV.4, IV.5, IV.6, IV.7), die alle Kontrakturen der Finger- und teilweise auch der Zehngelenke aufweisen. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.



Abbildung 6.24: Patientin IV.7 (A, links), Patientin IV.5 (A, zweite von links und C), Patient IV.6 (A, zweiter von rechts) und Patient IV.3 (A, rechts und B) aus Familie PAK_16.

Durch die WES wurde bei Patient IV.3 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *MTMR2* (*myotubularin related protein 2*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.15.

Die nachgewiesene *MTMR2*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper weder innerhalb eines homozygoten Intervalls, noch in dessen Nähe. Das nächstgelegene homozygote Intervall auf Chromosom 11 befindet sich etwa 27,7 Mb entfernt.

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.25A), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.25B).

Tabelle 6.15: Informationen zur identifizierten *MTMR2*-Mutation in Familie PAK_16.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>MTMR2</i> (<i>myotubularin related protein 2</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.95595470G>A
c.Position (Transkript)	c.323C>T (NM_016156.5)
p.Position	p.Thr108Met
Exon/Intron	Exon 4
Chromosom	11
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious</i> (score: 0)
MutationTaster	<i>Disease causing</i> (p-value: 1)
PolyPhen-2	<i>Probably damaging</i> (score: 1.000)
DANN Score	0.9993
RVIS Score	0.33 (73.54%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt

DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	Charcot-Marie-Tooth disease, type 4B1 (MIM# 601382)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

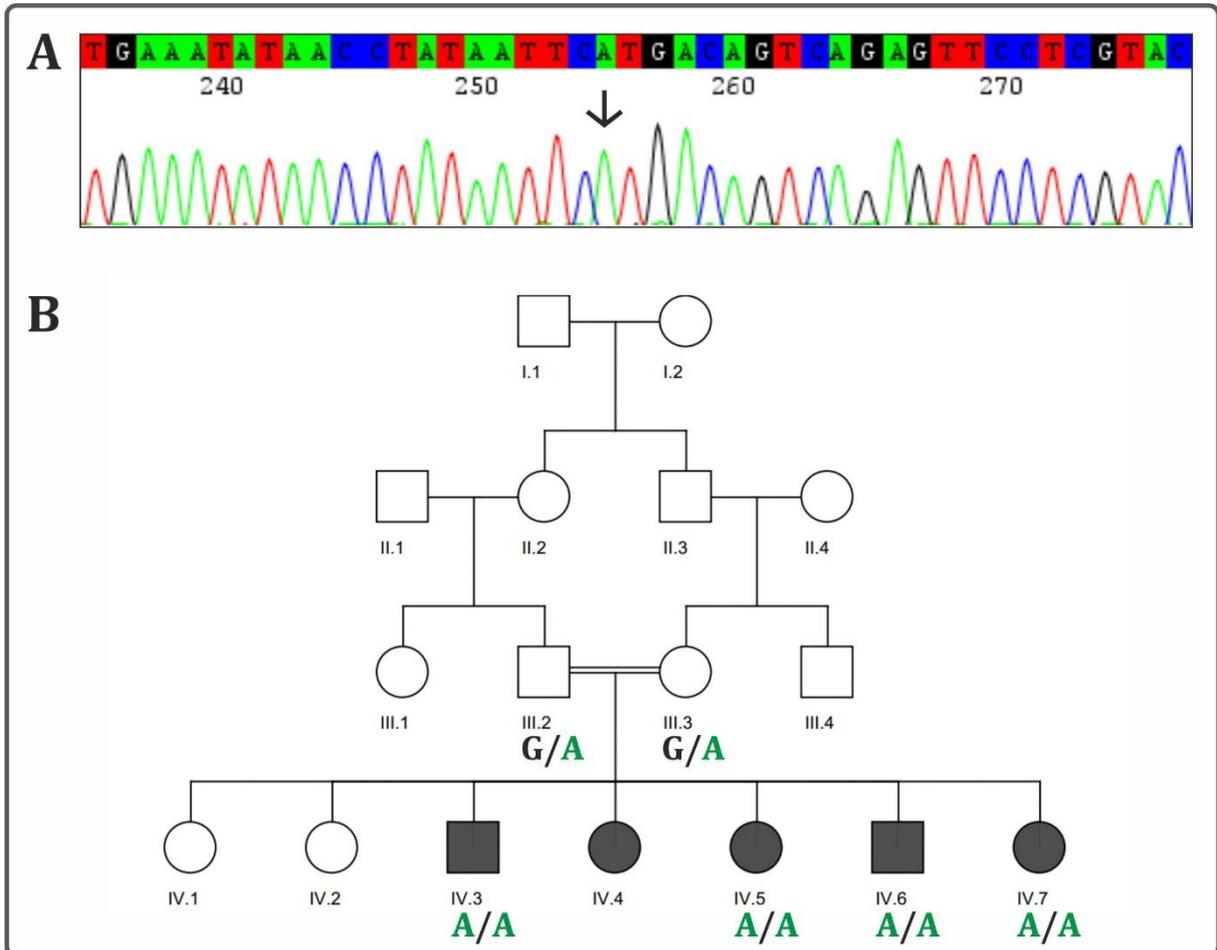


Abbildung 6.25: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_16. (A) Elektropherogramm der *MTMR2* Sanger-Sequenzierung von Patient IV.3 aus Familie PAK_16. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (B) Segregation der *MTMR2*-Mutation innerhalb der Familie PAK_16.

6.2.15. Familie PAK_18 | *GAN*

In Familie PAK_18 gibt es fünf betroffene Kinder (Abbildung 6.27C; IV.1, IV.2, IV.3, IV.5 und IV.6), von denen zum Zeitpunkt der Datenerhebung bereits drei verstorben waren. Eine klinische Beschreibung der Patienten lag nicht vor. Auf den Fotos der Betroffenen waren jedoch stark atrophe Extremitäten zu erkennen.



Abbildung 6.26: Patientin IV.5 (A) und Patient IV.6 (B, C) aus Familie PAK_18.

Durch die WES wurde bei Patient IV.6 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *GAN* (*gigaxonin*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.16.

Die nachgewiesene *GAN*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper innerhalb eines etwa 4,2 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 16 (Abbildung 6.27A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.27B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.27C).

Tabelle 6.16: Informationen zur identifizierten *GAN*-Mutation in Familie PAK_18.

MUTATIONSDetail	Information
Genname	<i>GAN</i> (<i>gigaxonin</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.81385202A>G
c.Position (Transkript)	c.182A>G (NM_022041.3)
p.Position	p.Tyr61Cys
Exon/Intron	Exon 2
Chromosom	16
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious</i> (score: 0)
MutationTaster	<i>Disease causing</i> (p-value: 1)
PolyPhen-2	<i>Probably damaging</i> (score: 0.998)
DANN Score	0.9978
RVIS Score	-0.6 (18.14%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Giant axonal neuropathy-1</i> (MIM# 256850)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

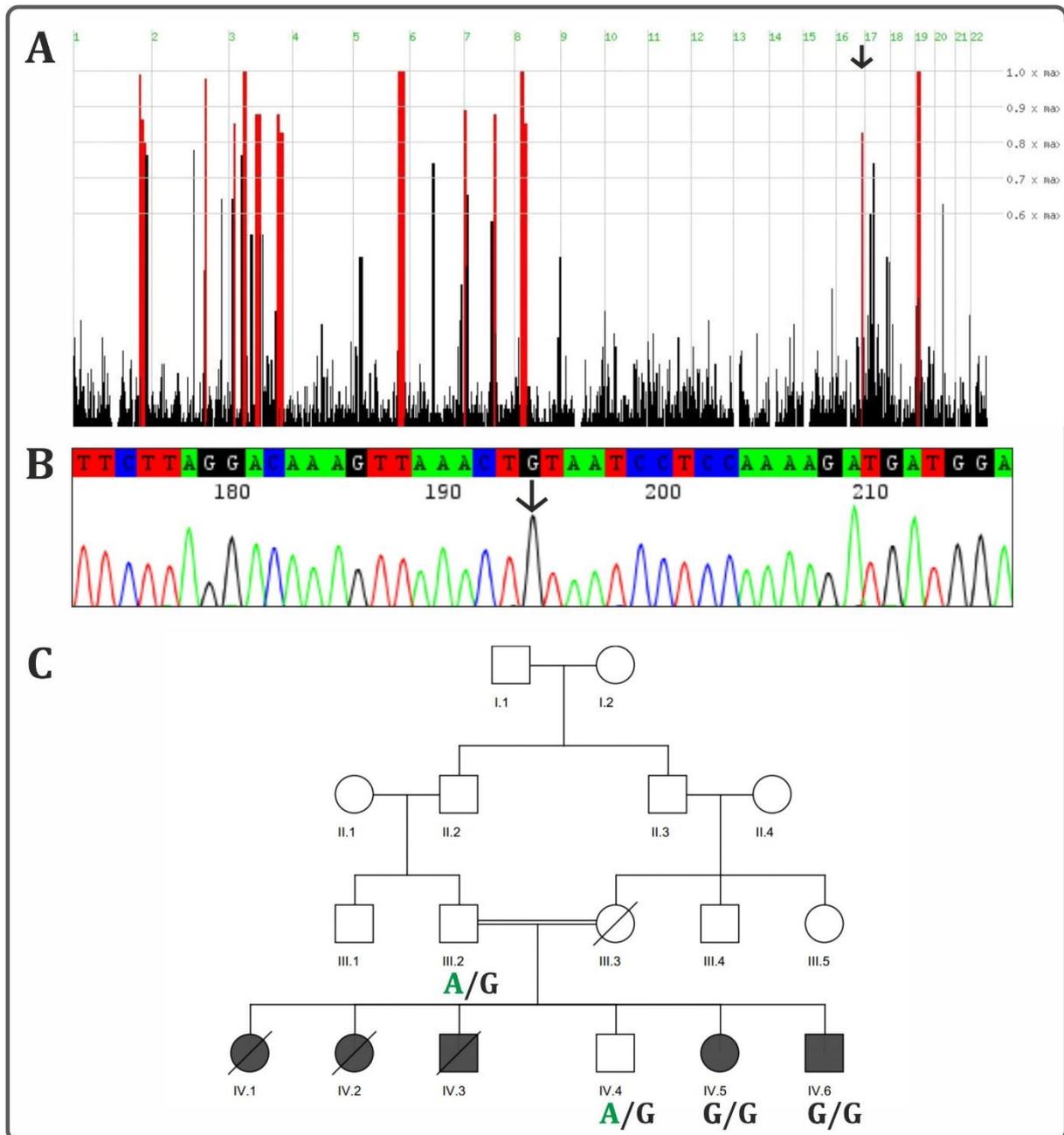


Abbildung 6.27: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_18. (A) Darstellung der bei Patient IV.6 detektierten homozygoten Intervalle. Die *GAN*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper innerhalb eines ~4,2 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 16 (schwarzer Pfeil). (B) Elektropherogramm der *GAN* Sanger-Sequenzierung von Patient IV.6 aus Familie PAK_18. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *GAN*-Mutation innerhalb der Familie PAK_18.

6.2.16. Familie PAK_20 | ATM

Für die sechs betroffenen Familienmitglieder (Abbildung 6.29C; IV.1, V.1, V.2, V.3, V.4, V.5) aus Familie PAK_20 lag keine klinische Beschreibung vor. Auch auf den Fotos waren keine klinischen Auffälligkeiten zu erkennen, die allen Betroffenen gemein sind.



Abbildung 6.28: Von links nach rechts: Nicht zugeordnetes Familienmitglied, Patient V.2, Patient V.1 und Patientin V.4 aus Familie PAK_20.

Durch die WES wurde bei Patient V.4 eine homozygote *stop gained* Mutation im Gen *ATM* (*ATM serine/threonine kinase*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.17.

Die nachgewiesene *ATM*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper zwischen zwei homozygoten Intervallen auf Chromosom 11 und etwa 500 kb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall entfernt (Abbildung 6.29A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.29B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.29C).

Tabelle 6.17: Informationen zur identifizierten *ATM*-Mutation in Familie PAK_20.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>ATM (ATM serine/threonine kinase)</i>
Mutationstyp	<i>stop gained</i>
g.Position	g.108183223C>T
c.Position (Transkript)	c.6004C>T (NM_001351834.1)
p.Position	p.Gln2002*
Exon/Intron	Exon 41
Chromosom	11
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	/
Aminosäure	/
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	/
MutationTaster	/
PolyPhen-2	/
DANN Score	0.9975
RVIS Score	1.53 (95.51%)

POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATION
OMIM	<i>Ataxia-telangiectasia</i> (MIM# 208900) und <i>Breast cancer, susceptibility to</i> (MIM# 114480)
HGMD	CM044575: <i>Ataxia telangiectasia</i>

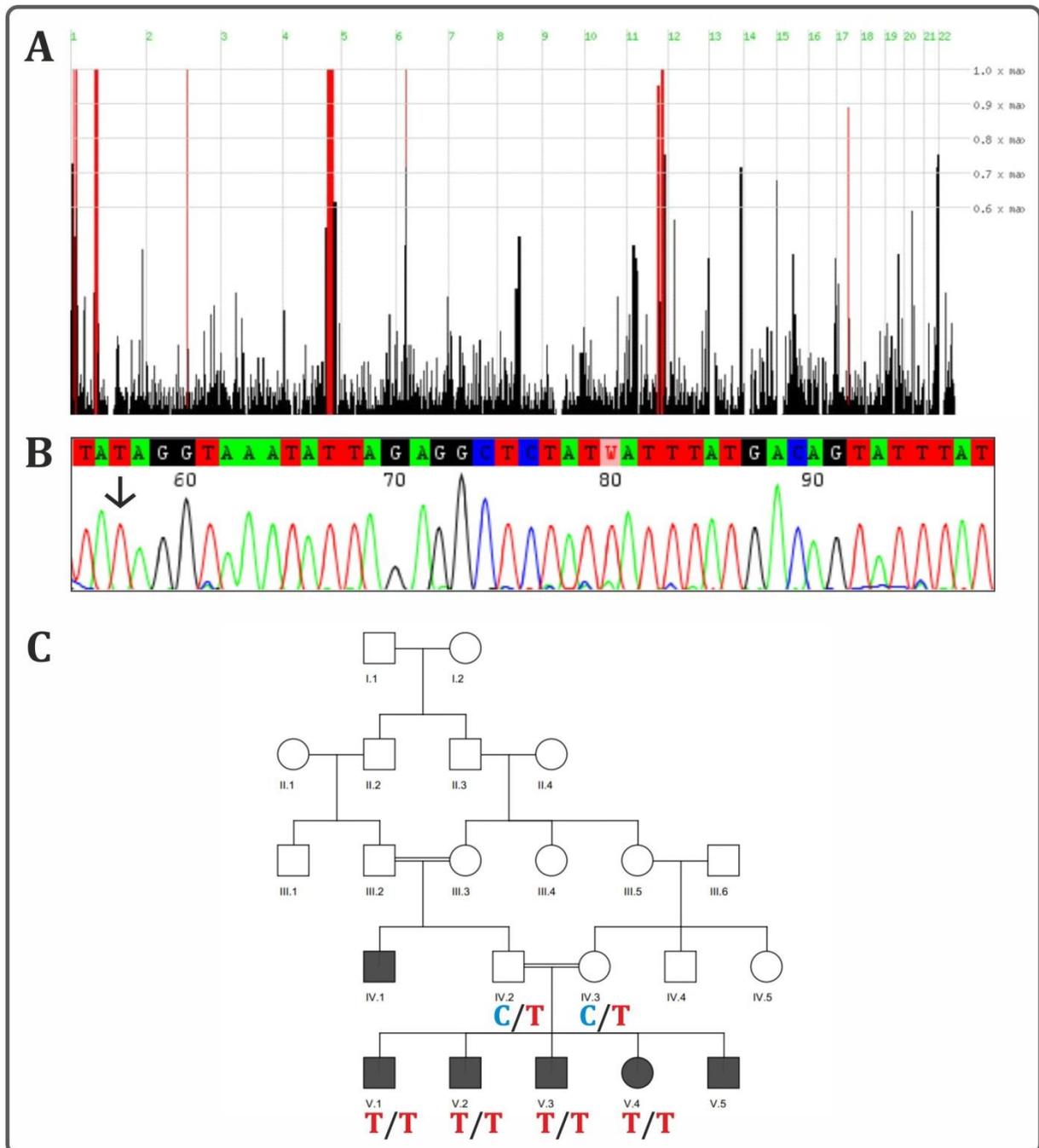


Abbildung 6.29: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_20. (A) Darstellung der bei Patient V.4 detektierten homozygoten Intervalle. Die *ATM*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper ~500 kb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall auf Chromosom 11 entfernt. (B) Elektropherogramm der *ATM* Sanger-Sequenzierung von Patient V.4 aus Familie PAK_20. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *ATM*-Mutation innerhalb der Familie PAK_20.

6.2.17. Familie PAK_21 | *GDAP1*

In Familie PAK_21 gibt es drei betroffene Brüder (Abbildung 6.31C; IV.1, IV.2, IV.3), die auf den Fotos atrophe Extremitäten und Fingergelenkkontrakturen aufweisen. Detaillierte klinische Informationen lagen nicht vor.



Abbildung 6.30: Patient IV.1 (A), IV.2 (B) und IV.3 (C) aus Familie PAK_21.

Durch die WES wurde bei Patient IV.2 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *GDAP1* (*ganglioside induced differentiation associated protein 1*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.18.

Die nachgewiesene *GDAP1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper innerhalb eines etwa 12,7 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 8 (Abbildung 6.31A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.31B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.31C).

Tabelle 6.18: Informationen zur identifizierten *GDAP1*-Mutation in Familie PAK_21.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>GDAP1</i> (<i>ganglioside induced differentiation associated protein 1</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.75276430C>A
c.Position (Transkript)	c.905C>A (NM_018972.2)
p.Position	p.Ser302Tyr
Exon/Intron	Exon 6
Chromosom	8
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious</i> (score: 0)
MutationTaster	<i>Disease causing</i> (p-value: 1)
PolyPhen-2	<i>Probably damaging</i> (score: 1.000)
DANN Score	0.9954
RVIS Score	-0.69 (14.97%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt

DATENBANK	ANNOATION
OMIM	<i>Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2K</i> (MIM# 607831), <i>Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, with vocal cord paresis</i> (MIM# 607706), <i>Charcot-Marie-Tooth disease, recessive intermediate, A</i> (MIM# 608340) und <i>Charcot-Marie-Tooth disease, type 4A</i> (MIM# 214400)
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

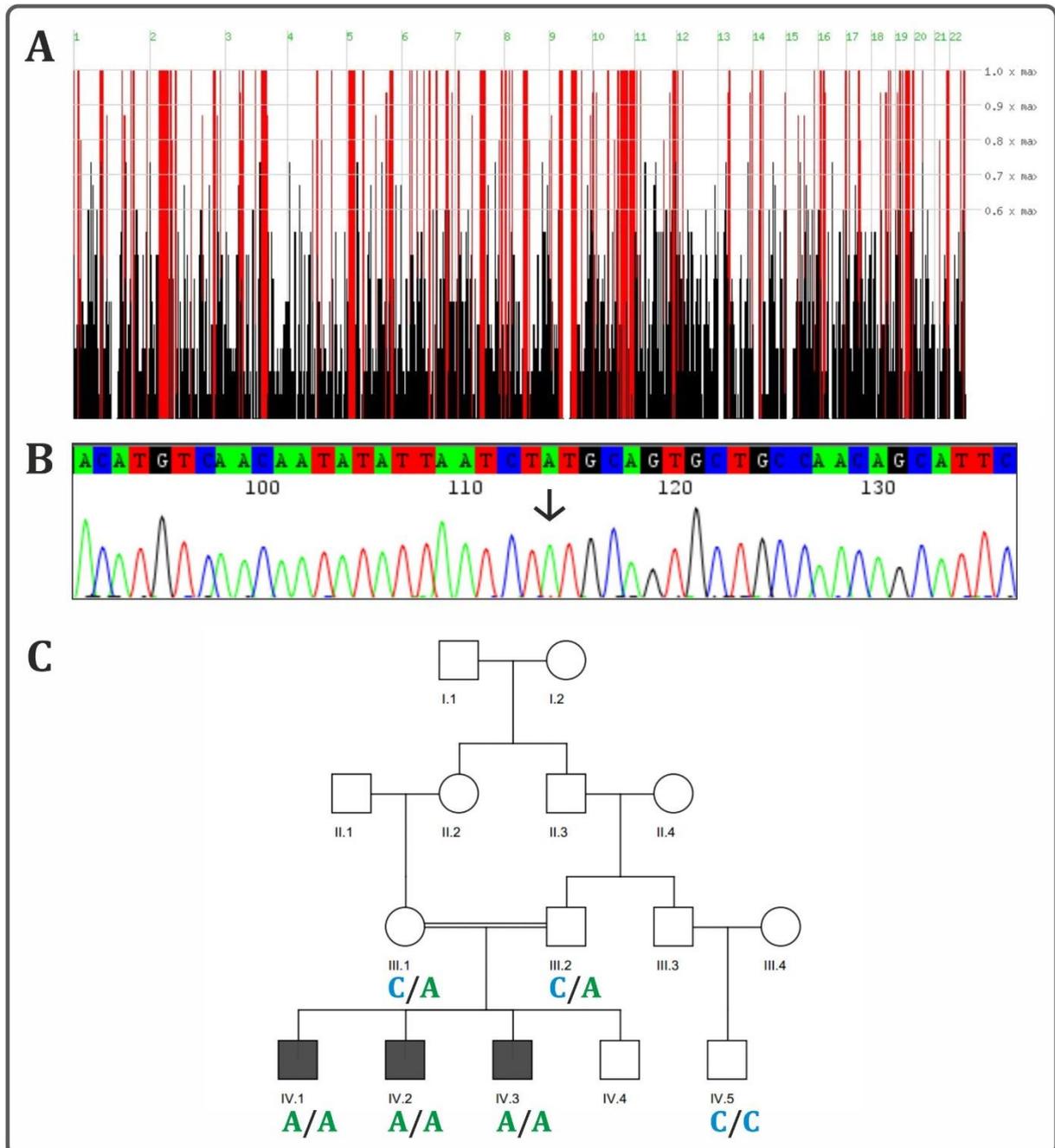


Abbildung 6.31: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_21. (A) Darstellung der bei Patient IV.2 detektierten homozygoten Intervalle. Die *GDAP1*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper innerhalb eines ~12,7 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 8. (B) Elektropherogramm der *GDAP1* Sanger-Sequenzierung von Patient IV.2 aus Familie PAK_21. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *GDAP1*-Mutation innerhalb der Familie PAK_21.

6.2.18. Familie PAK_23 | *FBN1*

In Familie PAK_23 gibt es zwei betroffene Geschwister (Abbildung 6.33B; IV.2 und IV.3), die laut Angaben Brustkorbfehlbildungen, Fingergelenkkontrakturen und eine Arachnodaktylie aufweisen. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.



Abbildung 6.32: Patient IV.3 (A, B, C) und die Hände von Patientin IV.2 (D) aus Familie PAK_23.

Durch die WES wurde bei Patientin IV.2 und Patient IV.3 eine heterozygote *missense* Mutation im Gen *FBN1* (*fibrillin 1*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.19.

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.33A), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.33B).

Tabelle 6.19: Informationen zur identifizierten *FBN1*-Mutation in Familie PAK_23.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>FBN1</i> (<i>fibrillin 1</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.48744873C>T
c.Position (Transkript)	c.5431G>A (NM_000138.4)
p.Position	p.Glu1811Lys
Exon/Intron	Exon 44
Chromosom	15
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Tolerated</i> (score: 0.08)
MutationTaster	<i>Disease causing</i> (p-value: 1)
PolyPhen-2	<i>Probably damaging</i> (score: 0.999)
DANN Score	0.9992
RVIS Score	-2.81 (0.64%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Allele Frequency: 0.000003981 Number of Homozygotes: 0
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt

DATENBANK	ANNOATION
OMIM	<i>Acromicric dysplasia</i> (MIM# 102370), <i>Ectopia lentis, familial</i> (MIM# 129600), <i>Geleophysic dysplasia 2</i> (MIM# 614185), <i>Marfan lipodystrophy syndrome</i> (MIM# 616914), <i>Marfan syndrome</i> (MIM# 154700), <i>MASS syndrome</i> (MIM# 604308), <i>Stiff skin syndrome</i> (MIM# 184900) und <i>Weill-Marchesani syndrome 2, dominant</i> (MIM# 608328)
HGMD	CM074812: <i>Marfan syndrome</i>

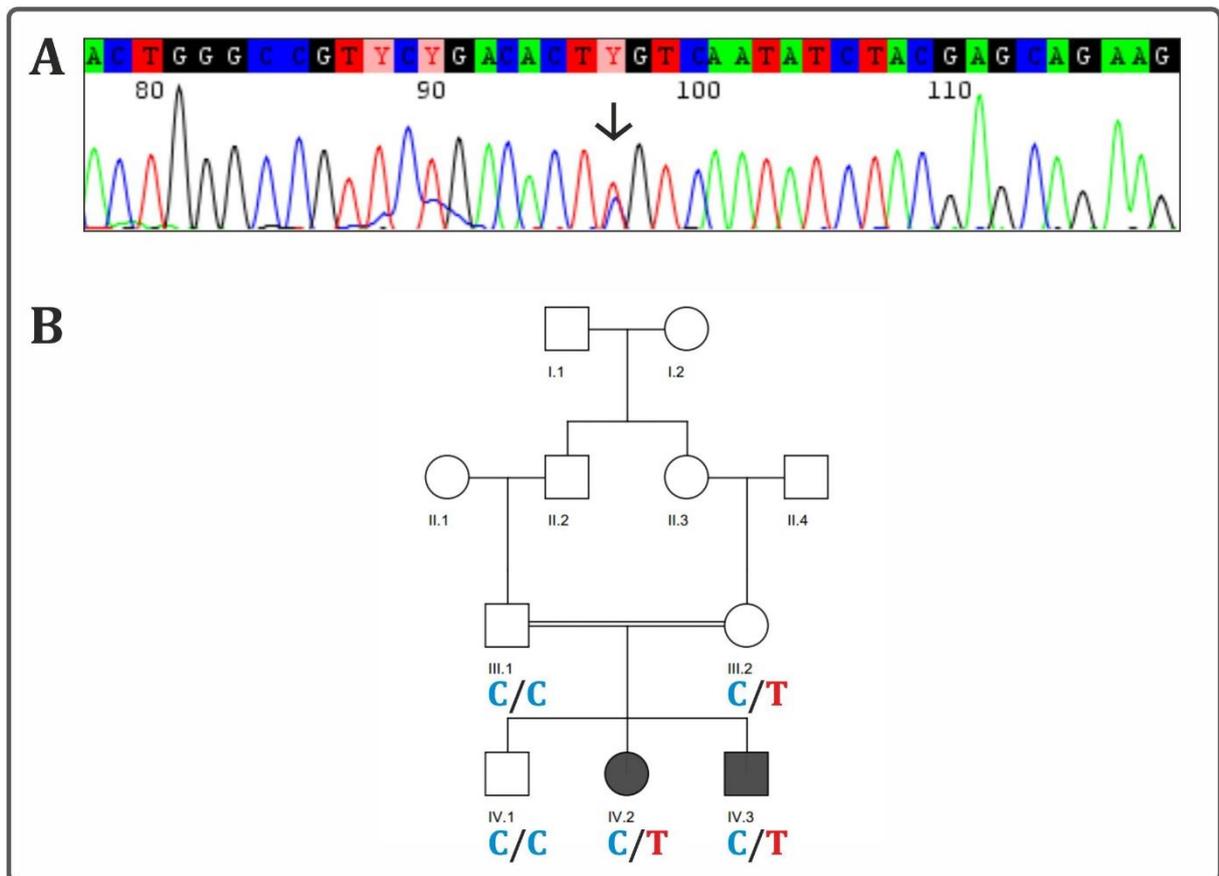


Abbildung 6.33: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_23. (A) Elektropherogramm der *FBN1* Sanger-Sequenzierung von Patientin IV.2 aus Familie PAK_23. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (B) Segregation der *FBN1*-Mutation innerhalb der Familie PAK_23.

6.2.19. Familie PAK_25 | *ATP7A*

In Familie PAK_25 sind laut Angaben zwei Brüder (Abbildung 6.35B; IV.2 und IV.3) von einer syndromalen Intelligenzminderung und einer Brustkorbfehlbildung betroffen. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

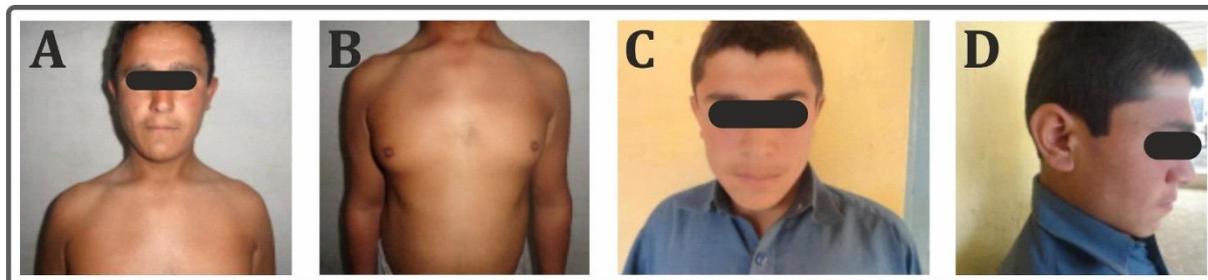


Abbildung 6.34: Patienten IV.2 (A, B) und IV.3 (C, D) aus Familie PAK_25.

Durch die WES wurde bei Patient IV.2 eine hemizygot *missense* Mutation im Gen *ATP7A* (*ATPase copper transporting alpha*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.20.

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.35A), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.35B).

Tabelle 6.20: Informationen zur identifizierten *ATP7A*-Mutation in Familie PAK_25.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gencode	<i>ATP7A (ATPase copper transporting alpha)</i>
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.77301792T>A
c.Position (Transkript)	c.4228T>A (NM_000052.4)
p.Position	p.Tyr1410Asn
Exon/Intron	Exon 23
Chromosom	X
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0)</i>
MutationTaster	/
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 1.000)</i>
DANN Score	0.9896
RVIS Score	0.41 (76.49%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Menkes disease (MIM# 309400), Occipital horn syndrome (MIM# 304150) und Spinal muscular atrophy, distal, X-linked 3 (MIM# 300489)</i>
HGMD	Mutation nicht aufgeführt

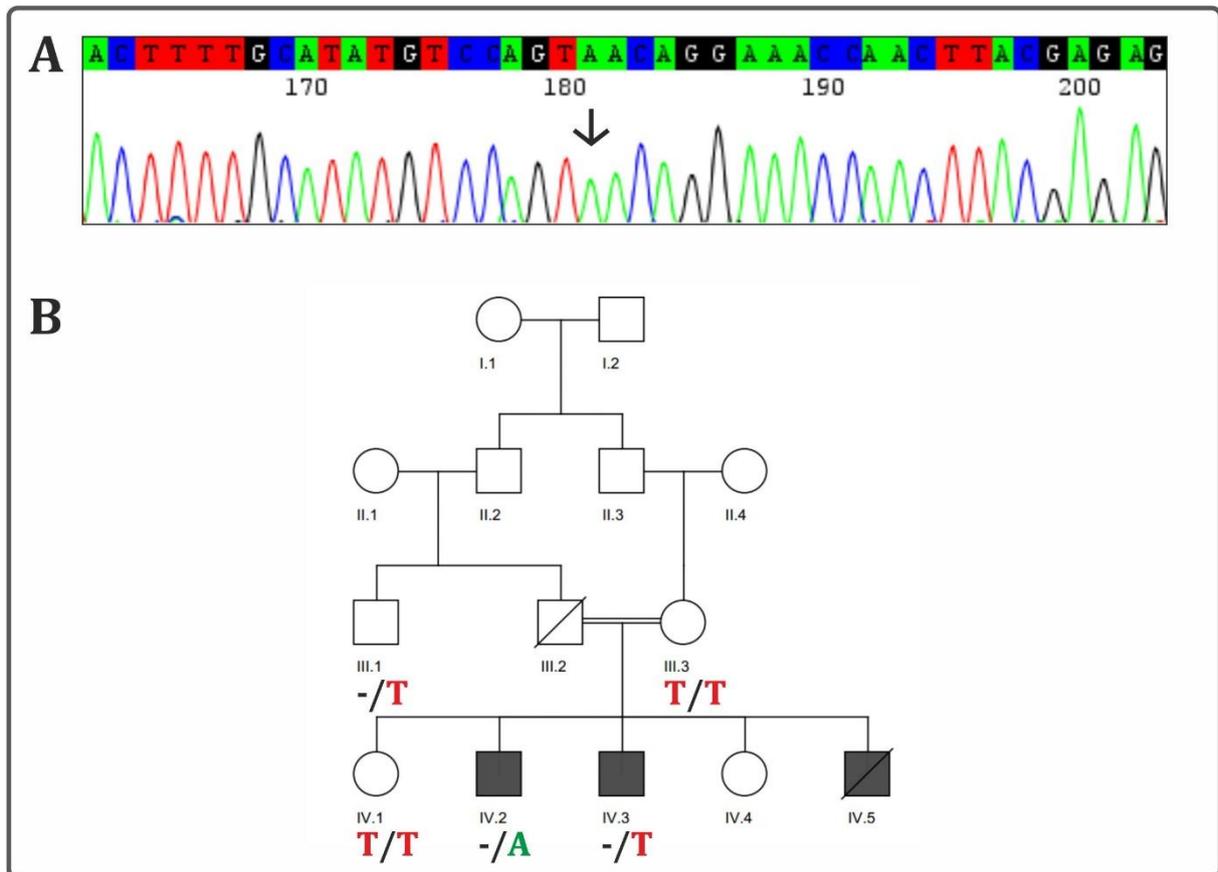


Abbildung 6.35: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_25. (A) Elektropherogramm der *ATP7A* Sanger-Sequenzierung von Patient IV.2 aus Familie PAK_25. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (B) Segregation der *ATP7A*-Mutation innerhalb der Familie PAK_25.

6.3. Fälle mit Mutationen in neuen krankheitsrelevanten Genen oder Kandidatengen

Im Folgenden werden die Fälle gelistet, bei denen Mutationen in neuen krankheitsrelevanten Genen oder Kandidatengen detektiert wurden. Die Relevanz der identifizierten Mutationen für den Phänotyp der entsprechenden Patienten wird in Kapitel 7.3 näher diskutiert.

6.3.1. Familie IRN_5 | *SLC10A7*

Anmerkung: Der hier vorgestellte Fall wurde bereits veröffentlicht in Nat Comm. 2018 Aug 6;9(1):3087.

Die erste Schwangerschaft des Paares I.1 und I.2 aus Familie IRN_5 (Abbildung 6.37C) resultierte in einem Spontanabort (Abbildung 6.37C; II.1). Danach bekam das Paar einen betroffenen Jungen (Abbildung 6.37C; II.2) und ein gesundes Mädchen (Abbildung 6.37C; II.3). Ein ebenfalls betroffener Junge (Abbildung 6.37C; II.5) verstarb kurz nach der Geburt. Bei zwei weiteren Schwangerschaften wurden bei den Föten (Abbildung 6.37C; II.4 und II.6) während einer Ultraschall-Untersuchung verkürzte Extremitäten festgestellt, woraufhin sich das Paar jeweils zu einer Interruptio entschied. Alle betroffenen Kinder bzw. Föten zeigten eine Mikromelie. Indexpatient II.2 (Abbildung 6.36) war zum Zeitpunkt der Untersuchung zehn Jahre alt. Er weist zusätzlich einen disproportionierten Minderwuchs, eine sensorineurale Hörstörung, eine Sehschwäche, eine Amelogenesis imperfecta sowie leichte faziale Dysmorphien (langes Philtrum, prominente Nase) auf. Zudem zeigt er eine milde Mikrognathie, Hyperlordose und Kyphoskoliose sowie eine Kniefehlstellung (Genu valgum).

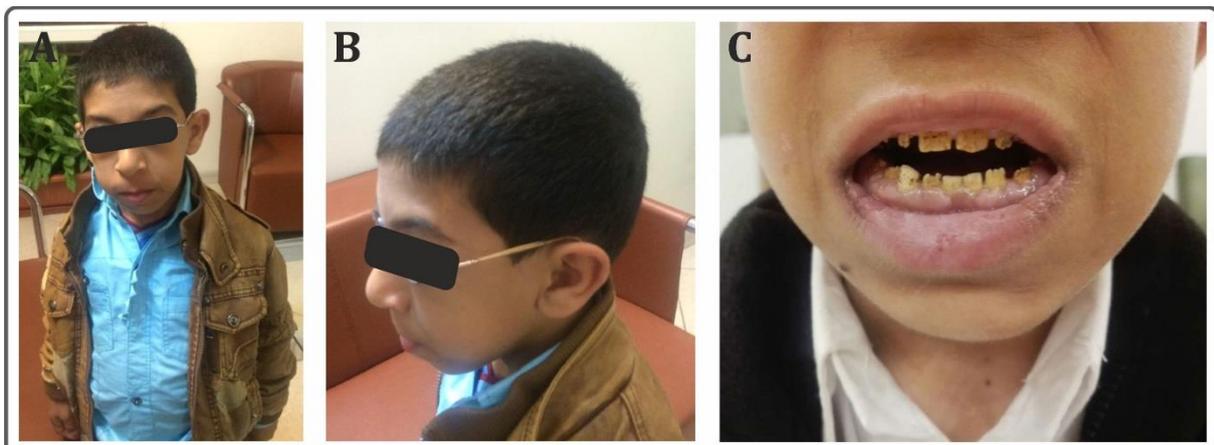


Abbildung 6.36: Patient II.2 aus Familie IRN_5. Frontal (A)- und Profil (B)-Aufnahme sowie Darstellung der Amelogenesis imperfecta (C).

Durch die WES wurde bei den Patienten II.2 und II.6 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *SLC10A7* (*solute carrier family 10 member 7*) detektiert, die bei beiden Eltern (I.1 und I.2) in heterozygotem Zustand vorlag. Weitere Details zur identifizierten

Mutation finden sich in Tabelle 6.21.

Die nachgewiesene *SLC10A7*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper innerhalb eines etwa 20,6 Mb großen homozygoten Intervalls, das sich beide betroffene Geschwister II.2 und II.6 teilen, jedoch nicht in der gesunden Schwester II.3 vorhanden ist (Abbildung 6.37A).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.37B), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.37C).

Tabelle 6.21: Informationen zur identifizierten *SLC10A7*-Mutation in Familie IRN_5.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>SLC10A7</i> (solute carrier family 10 member 7)
Mutationstyp	missense
g.Position	g.147425009C>T
c.Position (Transkript)	c.388G>A (NM_001300842.2)
p.Position	p.Gly130Arg
Exon/Intron	Exon 4
Chromosom	4
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	Deleterious (score: 0)
MutationTaster	/
PolyPhen-2	Probably damaging (score: 1.000)
DANN Score	0.9934
RVIS Score	0.28 (71.27%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	Short stature, amelogenesis imperfecta, and skeletal dysplasia with scoliosis (MIM# 618363)
HGMD	CM1812293: Skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta (Eintrag basiert auf unserer Publikation)
MGI	Phenotype observed in: craniofacial, growth/size/body, limbs/digits/tail, skeleton
ZFIN	Phenotype observed in: bone mineralization, cartilage development, ceratobranchial 4 cartilage, ceratobranchial 5 bone, ceratobranchial 5 cartilage, cleithrum, entopterygoid, eye, head, Meckel's cartilage, notochord, opercular flap, palate cartilage tissue, palate, trunk, whole organism

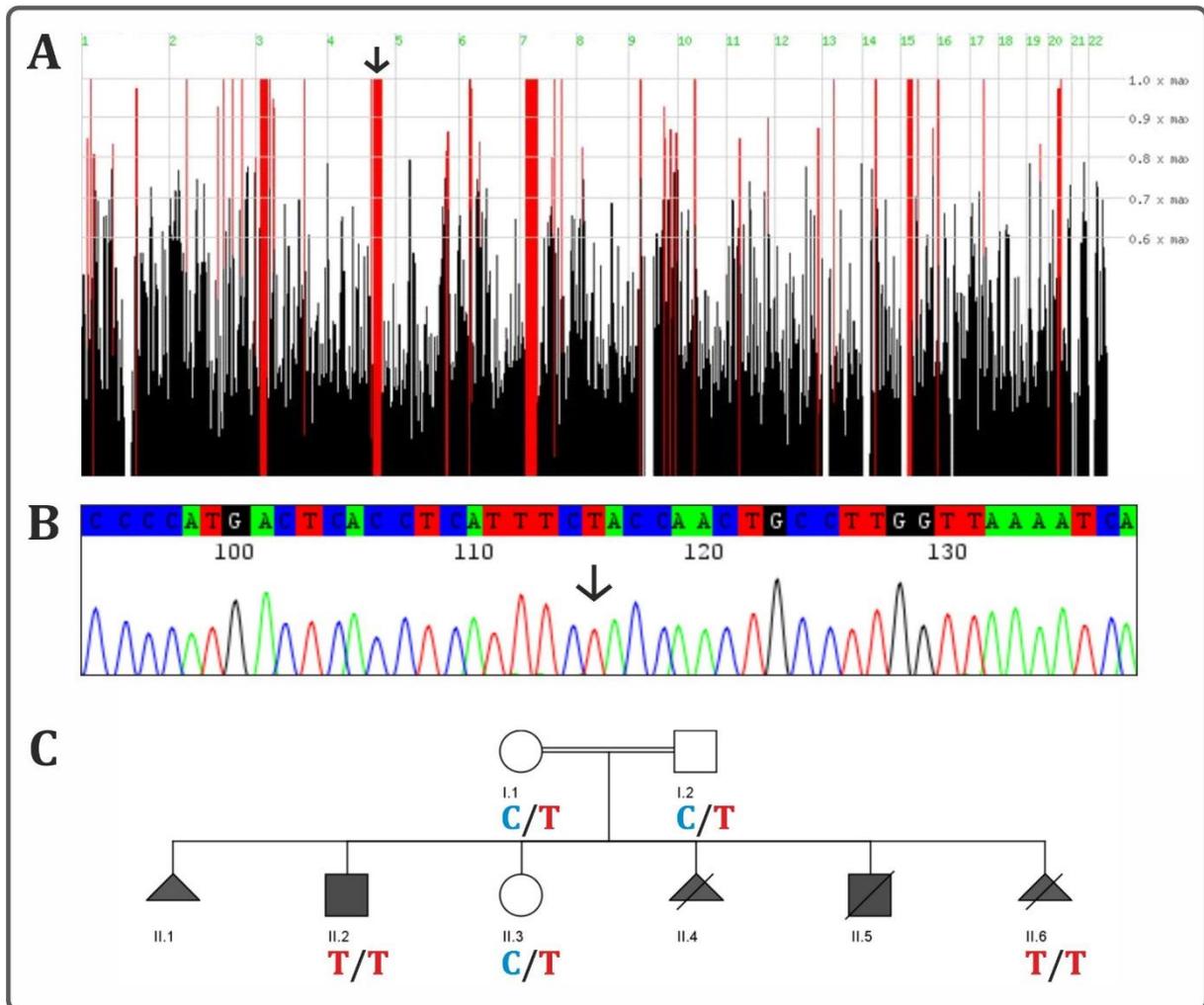


Abbildung 6.37: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_5. (A) Darstellung der homozygoten Intervalle, die sich die beiden Patienten II.2 und II.6 aus Familie IRN_5 teilen. Die *SLC10A7*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper innerhalb eines ~20,6 Mb großen, gemeinsamen homozygoten Intervalls auf Chromosom 4 (schwarzer Pfeil). (B) Elektropherogramm der *SLC10A7* Sanger-Sequenzierung von Patient II.2 aus Familie IRN_5. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *SLC10A7*-Mutation innerhalb der Familie IRN_5.

6.3.2. Familie IRN_8 | *TBX4*

Anmerkung: Der hier vorgestellte Fall wurde im Juli 2019 zur Veröffentlichung eingereicht.

Bei dem Paar I.1 und I.2 aus Familie IRN_8 (Abbildung 6.38B) wurde bei einem Fötus (Abbildung 6.38B; II.3) während einer Ultraschall-Untersuchung eine Aplasie der unteren Extremitäten festgestellt, woraufhin sich das Paar zu einer Interruptio entschied.

Durch die WES wurde bei beiden Eltern I.1 und I.2 eine heterozygote *missense* Mutation im Gen *TBX4* (*T-box 4*) detektiert, die in der gesunden Tochter (Abbildung 6.38B; II.1) nicht nachzuweisen war. Von dem betroffenen Fötus (II.3) stand keine DNA für genetische Analysen zur Verfügung. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.22.

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.38A, B). Beide Eltern wurden als heterozygote Träger der *TBX4*-Mutation bestätigt. Die gesunde Tochter (II.1) besitzt zwei wildtypische Allele des untersuchten Locus.

Tabelle 6.22: Informationen zur identifizierten *TBX4*-Mutation in Familie IRN_8.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>TBX4</i> (<i>T-box 4</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.59543277T>A
c.Position (Transkript)	c.379T>A (NM_001321120.1)
p.Position	p.Tyr127Asn
Exon/Intron	Exon 4
Chromosom	17
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0)</i>
MutationTaster	<i>Disease causing (p-value: 1)</i>
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 1.000)</i>
DANN Score	0.9895
RVIS Score	-0.58 (18.78%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	<i>Ischiocoxopodopatellar syndrome (MIM# 147891)</i>
HGMD	Mutation nicht aufgeführt
MGI	<i>Phenotype observed in: cardiovascular system, cellular, embryo, growth/size/body, homeostasis/metabolism, limbs/digits/tail, mortality/aging, nervous system, skeleton</i>
ZFIN	<i>Phenotype observed in: apical ectodermal ridge pelvic fin bud, embryonic hindlimb morphogenesis, embryonic pelvic fin morphogenesis, hindlimb morphogenesis, mesoderm pelvic fin bud, pelvic fin, pelvic fin bud apical ectodermal ridge formation, pelvic fin bud mesenchyme, pelvic fin bud, pelvic fin development, pelvic fin morphogenesis, pelvic fin skeleton, whole organism</i>

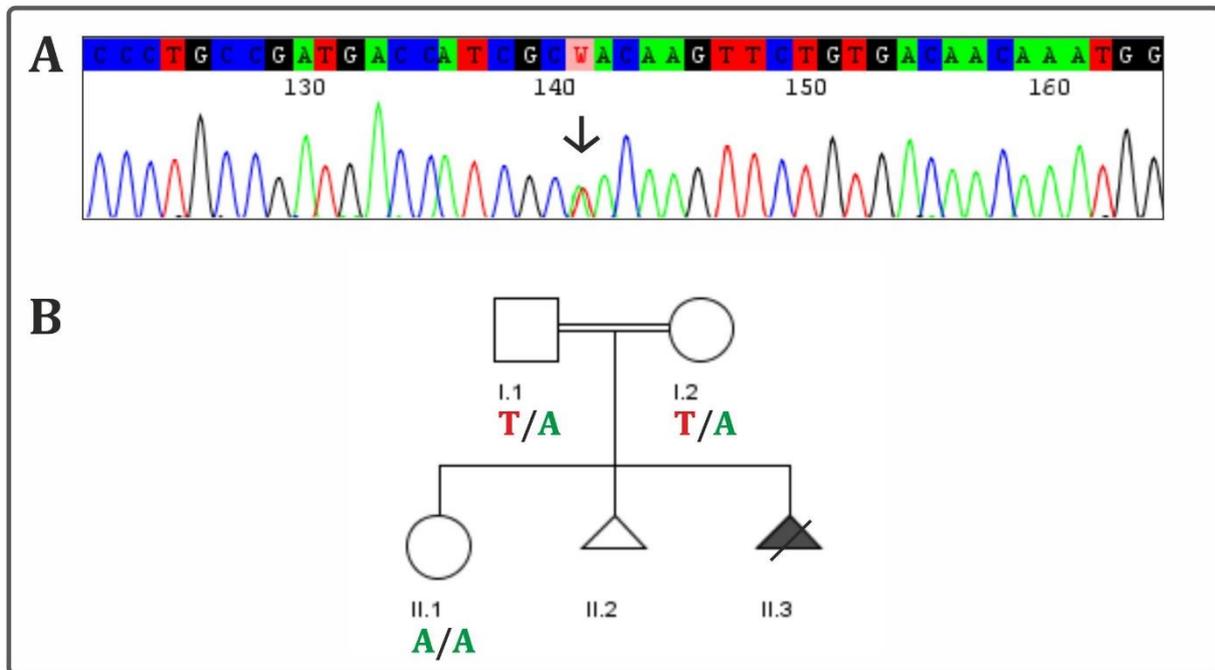


Abbildung 6.38: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_8. (A) Elektropherogramm der *TBX4* Sanger-Sequenzierung von Familienmitglied I.2 aus Familie IRN_8. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (B) Segregation der *TBX4*-Mutation innerhalb der Familie IRN_8.

6.3.3. Familie IRN_14 | *MSGN1*

Auf den Fotos von Patientin IV.1 aus Familie IRN_14 (Abbildung 6.39 und Abbildung 6.40C) fällt insbesondere die mesomale Verkürzung der Arme auf. Auch die Hals-/Thoraxregion erscheint dysplastisch mit einem prominent wirkenden Trapezmuskel und bogenförmigen Schlüsselbeinen (*Claviculae*). Auf den Röntgenbildern der Patientin werden eine humero-radiale sowie eine radio-ulnare Synostose deutlich. Die Radii sind stark verkürzt und hypoplastisch, die Ulnae sind nur rudimentär und nur ihr proximaler Teil vorhanden. Das Kahnbein (*Os scaphoideum*) ist auf der linken Seite nur als winziger Kern vorhanden, während es auf der rechten Seite verknöchert ist. Die Diaphysen der Femora sind sehr dünn, wodurch die Metaphysen relativ weit wirken. Die Fibulae sind deutlich verkürzt und zu dünn. Auch das Becken der Patientin erscheint auf den Röntgenbildern pathologisch. Die Darmbeine (*Ossa ilium*) sind etwas schmal, der untere Sitzbeinast (*Ramus inferior*) des Schambeins (*Os pubis*) fehlt und das Sitzbein (*Os ischium*) ist lediglich rudimentär vorhanden. Zudem zeigt sich eine deutliche Hyperlordose der Wirbelsäule.

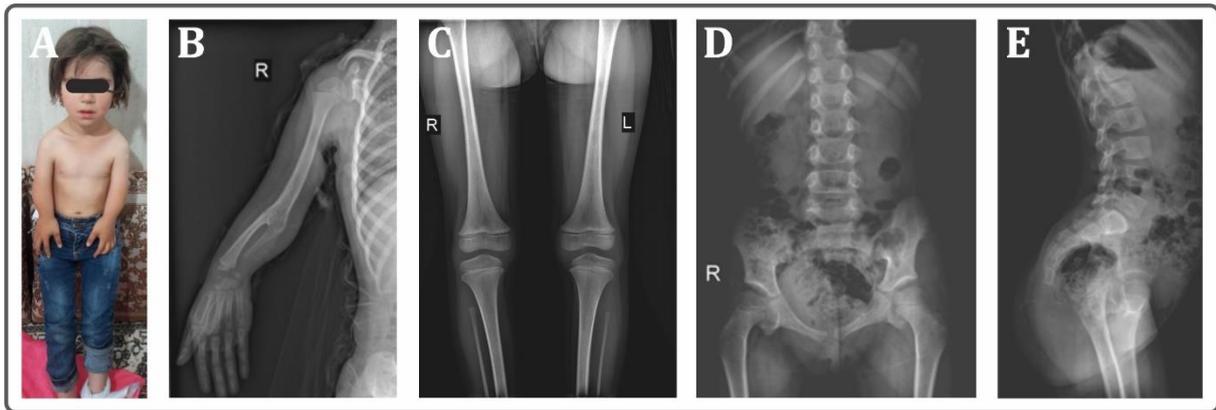


Abbildung 6.39: Patientin IV.1 aus Familie IRN_14. (A) Frontal-Aufnahme der Patientin. (B) Röntgenbild der rechten vorderen Extremität. (C) Röntgenbild eines Teils der unteren Extremitäten (Femur, Tibia, Fibula und Kniegelenk). (D) Röntgenbild der unteren Rippenbögen, der unteren Wirbelsäule und des Beckens. (E) Röntgenbild der unteren Wirbelsäule und des Beckens im Profil.

Durch die WES wurde bei Patientin IV.1 eine homozygote *missense* Mutation im Gen *MSGN1* (*mesogenin 1*) detektiert. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.23.

Die nachgewiesene *MSGN1*-Mutation liegt laut HomozygotyMapper innerhalb eines etwa 13,2 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 2 (Abbildung 6.40).

Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.40), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.40).

Tabelle 6.23: Informationen zur identifizierten *MSGN1*-Mutation in Familie IRN_14.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Gencode	<i>MSGN1</i> (<i>mesogenin 1</i>)
Mutationstyp	<i>missense</i>
g.Position	g.17998159G>T
c.Position (Transkript)	c.374G>T (NM_001105569.2)
p.Position	p.Arg125Leu
Exon/Intron	Exon 1
Chromosom	2
EBENE	KONSERVIERUNG
Nukleotid	hoch
Aminosäure	hoch
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	<i>Deleterious (score: 0)</i>
MutationTaster	<i>Disease causing (p-value: 1)</i>
PolyPhen-2	<i>Probably damaging (score: 1.000)</i>
DANN Score	0.9987
RVIS Score	0.17 (65.56%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	<i>Allele Frequency: 0.000008017</i> <i>Number of Homozygotes: 0</i>
GME	<i>Genotype Count: 991:1:0</i>
Iranome	Mutation nicht aufgeführt

DATENBANK	ANNOATION
OMIM	kein Phänotyp assoziiert
HGMD	Mutation nicht aufgeführt
MGI	<i>Phenotype observed in: cellular, embryo, growth/size/body, limbs/digits/tail, mortality/aging, muscle, nervous system, skeleton</i>
ZFIN	<i>Phenotype observed in: mesodermal cell migration, paraxial mesodermal cell differentiation, post-ventral region, segmental plate, somite, tail bud</i>

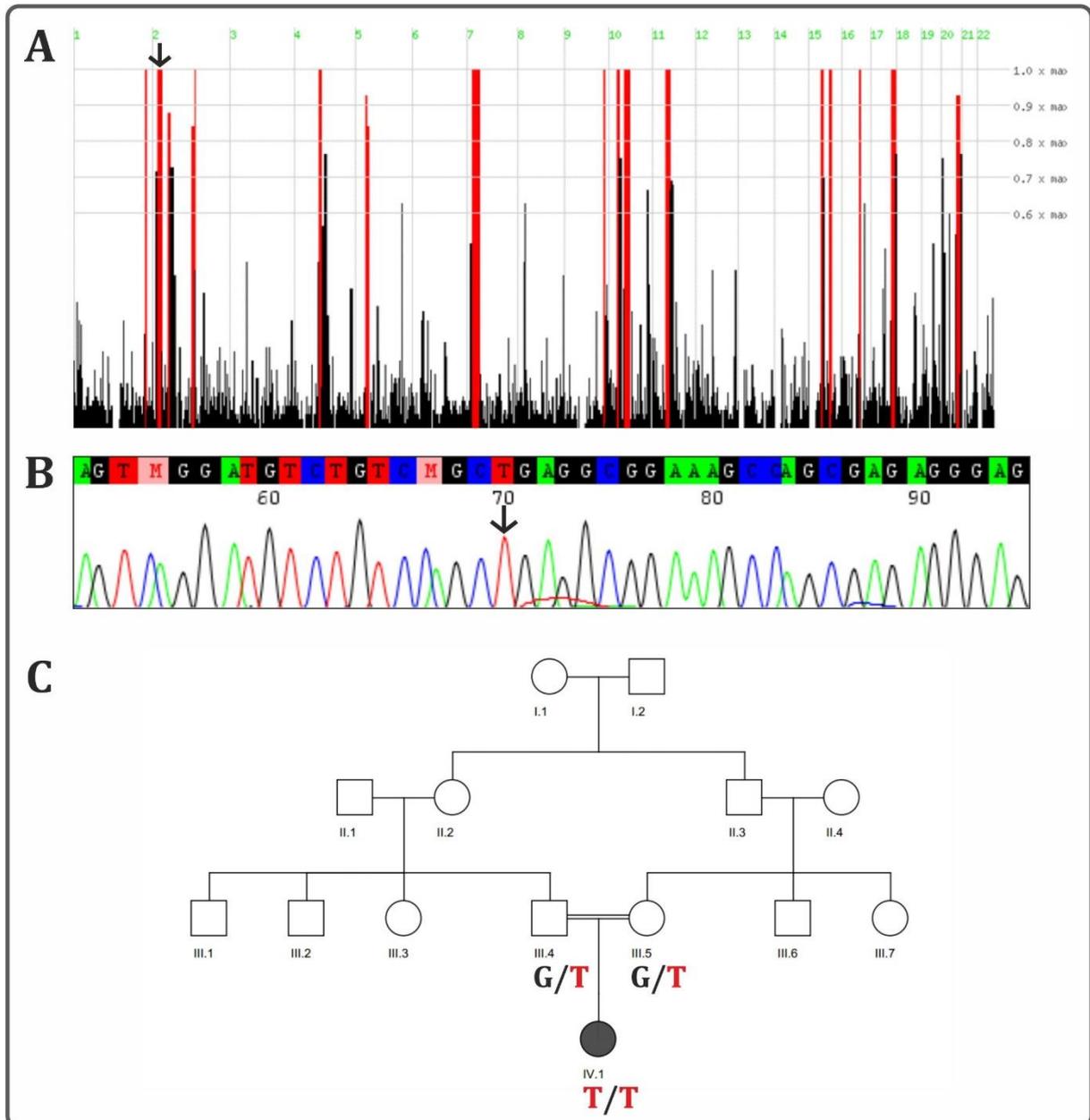


Abbildung 6.40: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_14. (A) Darstellung der bei Patientin IV.1 detektierten homozygoten Intervalle. Die *MSGN1*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper innerhalb eines ~13,2 Mb großen homozygoten Intervalls auf Chromosom 2 (schwarzer Pfeil). (B) Elektropherogramm der *MSGN1* Sanger-Sequenzierung von Patientin IV.1 aus Familie IRN_14. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *MSGN1*-Mutation innerhalb der Familie IRN_14.

6.3.4. Familie BEL_1 | MIA3

Anmerkung: Teilergebnisse des hier vorgestellten Falls wurden im September 2019 zur Veröffentlichung eingereicht.

Bei Familie BEL_1 handelt es sich um eine konsanguine Familie türkischer Herkunft. Das Paar I.1 und I.2 (Abbildung 6.43C), Cousin und Cousine 1. Grades, hat vier betroffene Kinder (Abbildung 6.43C; II.1, II.2, II.4, II.5). Das einzige gesunde Kind (Abbildung 6.43C; II.3) ist bei einem Haushaltsunfall gestorben.

Alle vier betroffenen Brüder (Abbildung 6.41) zeigen eine Kombination aus einem proportionierten Minderwuchs, einer Klinodaktylie des fünften Fingers, einer Brachydaktylie der Finger, einer Platyspondylie, einer sensorineuralen Hörstörung, einer Dentinogenesis imperfecta mit verzögertem Durchbruch der bleibenden Zähne, einem Diabetes mellitus aufgrund unzureichender Insulinsekretion, einer stark juckenden Haut (Pruritus), Asthma, sowie einer leichten Intelligenzminderung. Zu den zusätzlichen Symptomen, die nicht alle Betroffenen aufweisen, zählen eine Skoliose, eine Brachydaktylie der Zehen, eine Retrognathie, eine milde Retinopathie, Osteopenie, eine früh einsetzende Pubertät, eine juvenile Periodontitis, eine Hydronephrose und Mikroalbuminurie (siehe Tabelle 6.24).

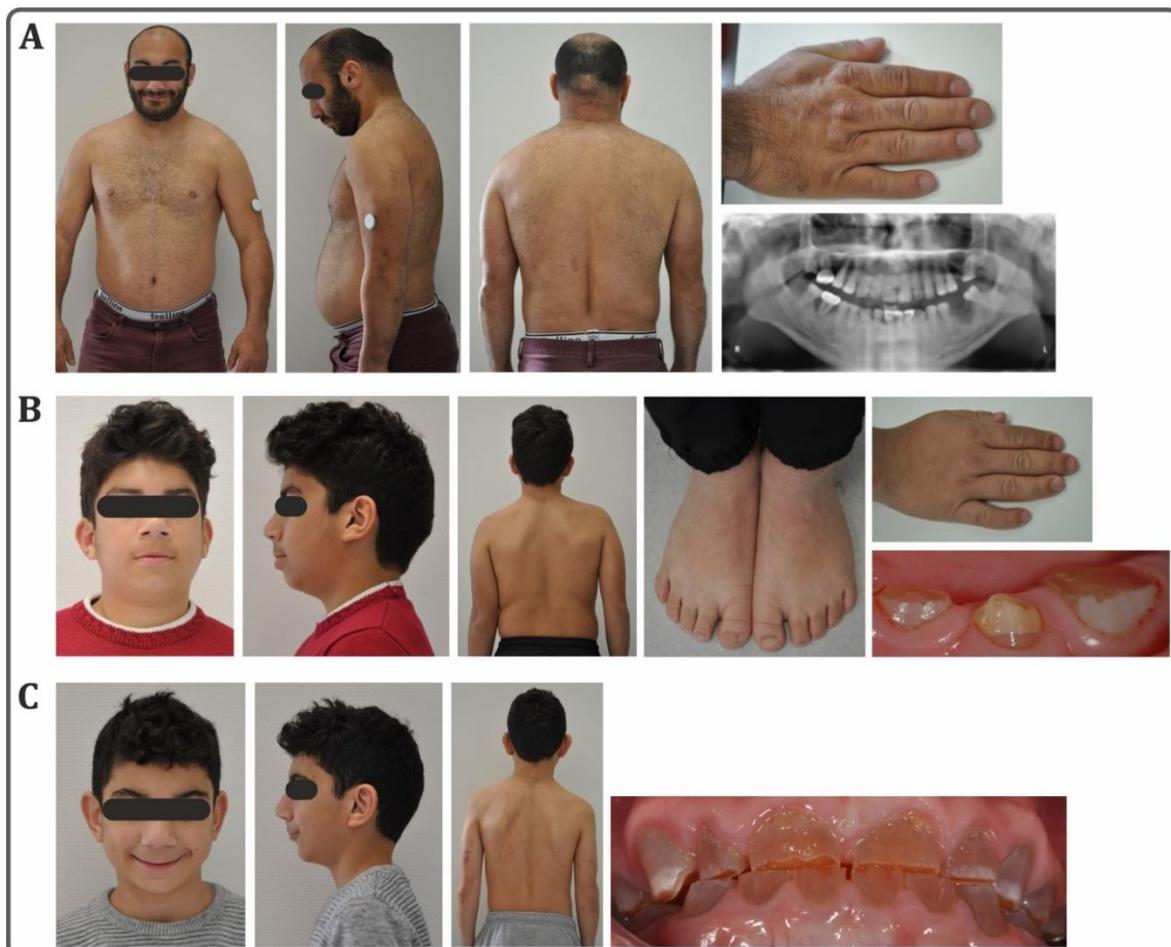


Abbildung 6.41: Patienten II.2 (A), II.4 (B) und II.5 (C) aus Familie BEL_1 mit erkennbarer Klinodaktylie des fünften Fingers, Brachydaktylie der Hände und Füße, Hautläsionen aufgrund des Pruritus, Dentinogenesis imperfecta, Skoliose bei Patienten II.4 und II.5, sowie Retrognathie bei Patient II.5.

Tabelle 6.24: Verteilung der Symptome bei den Patienten aus Familie BEL_1.

SYMPTOM	II.1	II.2	II.4	II.5
Dentinogenesis imperfecta	x	x	x	x
verzögerter Durchbruch der bleibenden Zähne	x	x	x	x
juvenile Periodontitis mit frühem Zahnverlust	x	x		
Wachstumsretardierung	x	x	x	x
proportionierter Minderwuchs	x	x	x	x
hoher Nasenrücken	x	x	x	x
Retrognathie				x
Brachydaktylie der Finger	x	x	x	x
Klinodaktylie der fünften Finger	x	x	x	x
kegelförmige Epiphysen in den Händen	x	x		x
Brachydaktylie der Zehen			x	x
Platyspondylie	x	x	x	x
Skoliose			x	x
auffällige Knie	x	x	x	x
milde Intelligenzminderung	x	x	x	x
sensorineurale Hörstörung	x	x	x	x
milde Retinopathie	x			x
milder Diabetes mellitus	x	x	x	x
primäre Adipositas	x	x	x	x
früh einsetzende Pubertät				x
Pruritus	x	x	x	x
Asthma	x	x	x	x
Osteopenie	x	x		
Hydronephrose			x	
Mikroalbuminurie		x		

Durch die WES wurde bei allen vier betroffenen Kindern eine homozygote synonyme Mutation im Gen *MIA3* (*MIA SH3 domain ER export factor 3*) detektiert, die bei beiden Eltern im heterozygoten Zustand vorlag. Weitere Details zur identifizierten Mutation finden sich in Tabelle 6.25.

Drei von fünf in Alamut® Visual eingebettete Vorhersageprogramme für Spleißregionen sagten eine durch die Mutation hervorgerufene erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer kryptischen Donor-Spleißregion inmitten des *MIA3* Exons 8 voraus (Abbildung 6.42A). Des Weiteren geht laut dem in Alamut® Visual integrierten Vorhersageprogrammen ESEfinder durch die identifizierte *MIA3*-Mutation die Konsensussequenz für das SR-Protein SC35 verloren (Abbildung 6.42B).

Die nachgewiesene *MIA3*-Mutation liegt laut HomozygosityMapper innerhalb eines etwa 19 Mb großen homozygoten Intervalls, das sich die Patienten II.1 und II.2 aus Familie BEL_1 teilen (Abbildung 6.43). Über eine Sanger-Sequenzierung wurden die WES Ergebnisse überprüft (Abbildung 6.43), sowie die Segregation der nachgewiesenen Sequenzvariante innerhalb der Familie ermittelt (Abbildung 6.43).

Tabelle 6.25: Informationen zur identifizierten *MIA3*-Mutation in Familie BEL_1.

MUTATIONSDETAIL	INFORMATION
Genname	<i>MIA3 (MIA SH3 domain ER export factor 3)</i>
Mutationstyp	<i>synonymous</i>
g.Position	g.222822182A>G
c.Position (Transkript)	c.3621A>G (NM_001324062.1)
p.Position	p.Arg1207=
Exon/Intron	Exon 8
Chromosom	1
VORHERSAGEPROGRAMM	EINSTUFUNG
SIFT	/
MutationTaster	/
PolyPhen-2	/
DANN Score	0.9248
RVIS Score	0.79 (87.34%)
POPULATIONSDATENBANK	VORKOMMEN
gnomAD	Mutation nicht aufgeführt
GME	Mutation nicht aufgeführt
Iranome	Mutation nicht aufgeführt
DATENBANK	ANNOATATION
OMIM	kein Phänotyp assoziiert
HGMD	Mutation nicht aufgeführt
MGI	<i>Phenotype observed in: cardiovascular, cellular, craniofacial, growth/size/body, homeostasis/metabolism, integument, limbs/digits/tail, mortality/aging, respiratory system, skeleton</i>
ZFIN	Keine Phänotyp-Daten verfügbar

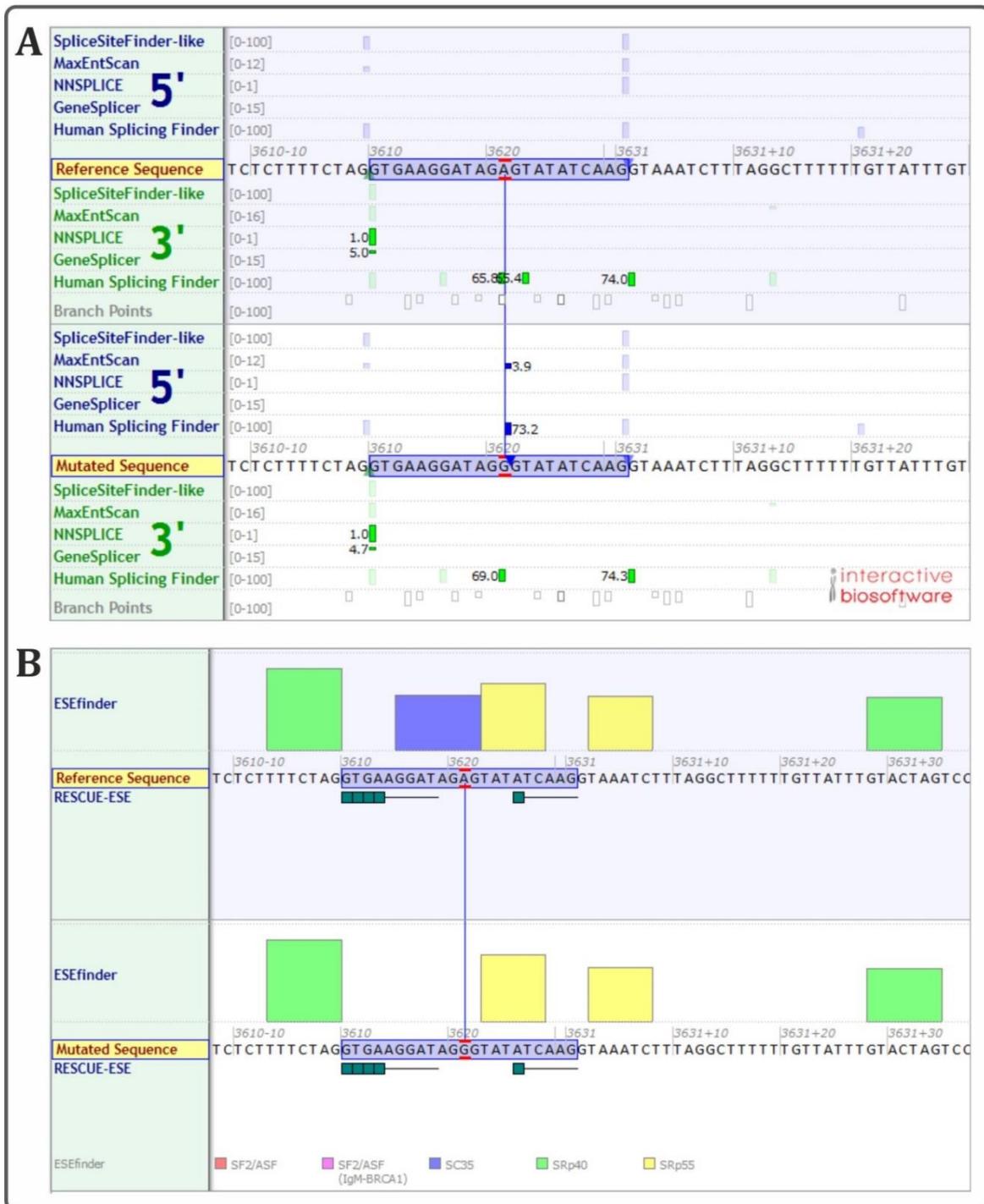


Abbildung 6.42: Auszüge aus dem Analyseprogramm Alamut® Visual. (A) Das Fenster zeigt Vorhersagen zu Änderungen von Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten einzelner Spleißregionen. In der oberen, blau hinterlegten Hälfte ist die wildtypische Sequenz mit den dazugehörigen Wahrscheinlichkeiten für Spleißregionen abgebildet. Darunter befindet sich die mutierte Sequenz mit den hierbei auftretenden Veränderungen. In Blau sind Spleißdonorregionen abgebildet, in Grün werden Spleißakzeptorregionen dargestellt. In der linken Spalte sind die einzelnen Spleißvorhersageprogramme aufgelistet, jede Zeile entspricht einem Vorhersageprogramm. Die Werte in den Klammern dahinter geben die Bandbreite der möglichen Werte für jedes einzelne Vorhersageprogramm an. Die Vorhersageprogramme MaxEntScan (3,9; 0-12) und Human Splicing Finder (73,2; 0-100) sagen für die *MIA3* c.3621A>G Mutation eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer neuen Spleißdonorregion voraus. (B) Das Fenster zeigt die Bindestellen und -Wahrscheinlichkeiten verschiedener SR Proteine, die für das korrekte Spleißen notwendig sind. Jede Farbe ist einem bestimmten SR Protein zugeordnet (siehe Legende). Die Höhe der Balken spiegelt die Wahrscheinlichkeit der Bindung wider. In der oberen, blau hinterlegten Hälfte ist die wildtypische Sequenz abgebildet, in der unteren Hälfte die mutierte Sequenz. Aufgrund der Mutation wird hier das Wegfallen der Konsensussequenz für das SR Protein SC35 vorausgesagt.

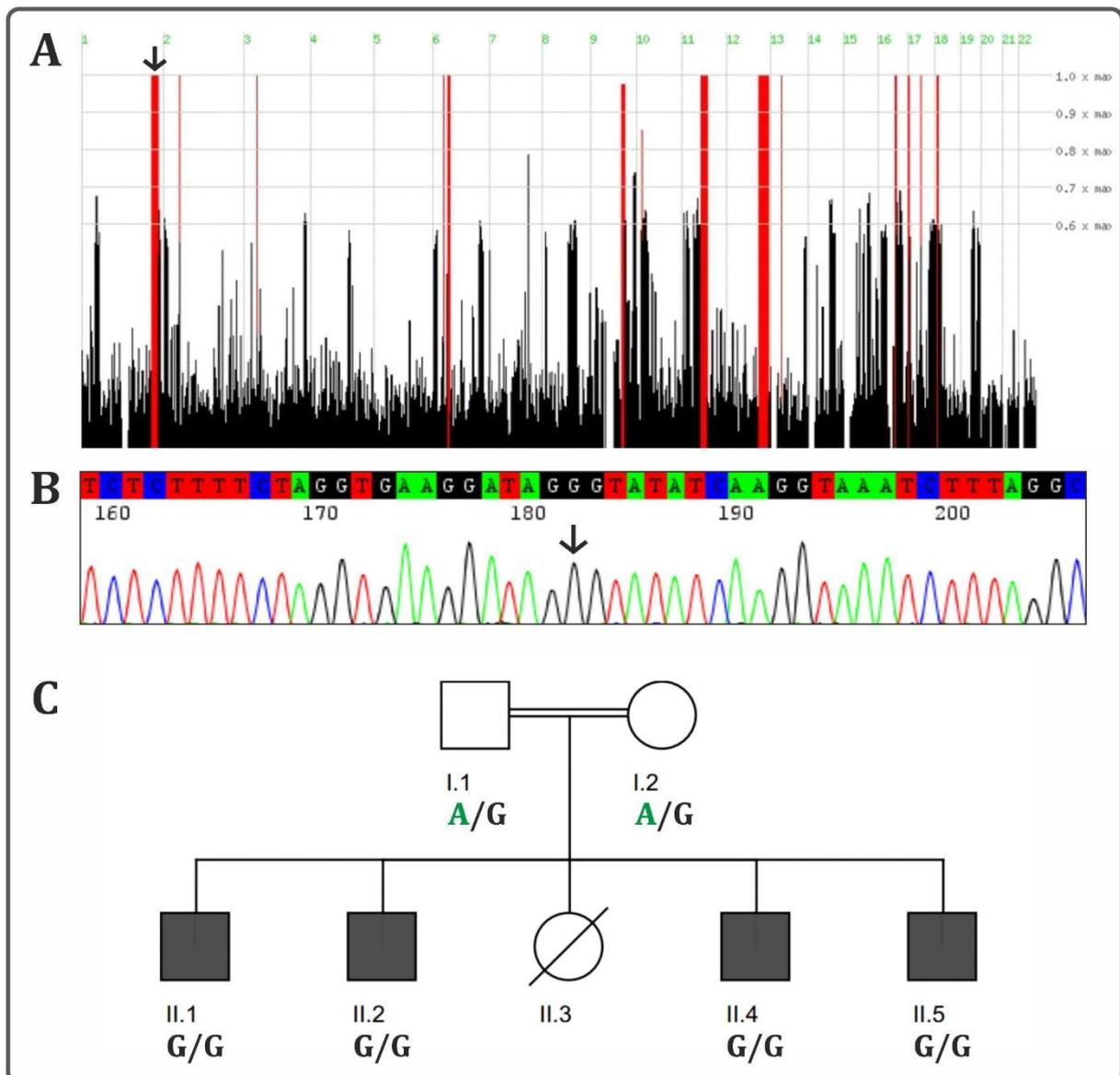


Abbildung 6.43: Analyse-Ergebnisse für Familie BEL_1. (A) Darstellung der homozygoten Intervalle, die sich die beiden Patienten II.1 und II.2 aus Familie BEL_1 teilen. Die *MIA3*-Mutation liegt laut HomozygotenMapper innerhalb eines ~19 Mb großen, gemeinsamen homozygoten Intervalls auf Chromosom 1 (schwarzer Pfeil). (B) Elektropherogramm der *MIA3* Sanger-Sequenzierung von Patient II.1 aus Familie BEL_1. Der schwarze Pfeil markiert die mutierte Base. (C) Segregation der *MIA3*-Mutation innerhalb der Familie BEL_1.

Auswirkungen der identifizierten *MIA3*-Mutation auf das prä-mRNA Spleißen *in vitro*

Da zum damaligen Zeitpunkt keine RNA der Patienten für Spleiß-Analysen vorlag, wurden etwaige Auswirkungen der identifizierten *MIA3*-Mutation mit Hilfe eines Minigen-Konstruktes (Abbildung 6.44; (A)) in einem artifiziiellen Setting ermittelt (siehe Kapitel 5.2.5). Die cDNA PCR-Produkte einer Vektor-Kontrolle ohne Insert (K), einer Kontrolle mit wildtypischem *MIA3* Exon 8 Insert (WT), eines Vektors mit einem *MIA3* Exon 8 Insert, das die in den Patienten identifizierte Mutation trägt (Mnt), sowie einer untransfizierten Kontrolle (UN) sind in Abbildung 6.44 (B) dargestellt.

Die Sanger-Sequenzierung der cDNA PCR-Produkte (Abbildung 6.44; (C)) ergab die erwartete Vektor-spezifische Sequenz für die Vektor-Kontrolle ohne Insert (K) und eine Vektor-spezifische Sequenz mit dem wildtypischen *MIA3* Exon 8 Insert für die

wildtypische Kontrolle (WT). Bei dem Vektor, der die mutierte *MIA3* Exon 8 Sequenz trug (Mnt), resultierte die cDNA Sequenzierung in zwei verschiedenen Sequenzen, die im Elektropherogramm ab der Stelle, wo das *MIA3* Exon 8 Insert zu erwarten wäre, unterschieden werden konnten. Den meisten sequenzierten cDNA-Molekülen fehlte das *MIA3* Exon 8 Insert komplett (repräsentiert durch die höheren Peaks im Elektropherogramm), in einigen wenigen sequenzierten cDNA-Molekülen war das mutierte *MIA3* Exon 8 Insert jedoch vorhanden (repräsentiert durch die niedrigeren Peaks im Elektropherogramm).

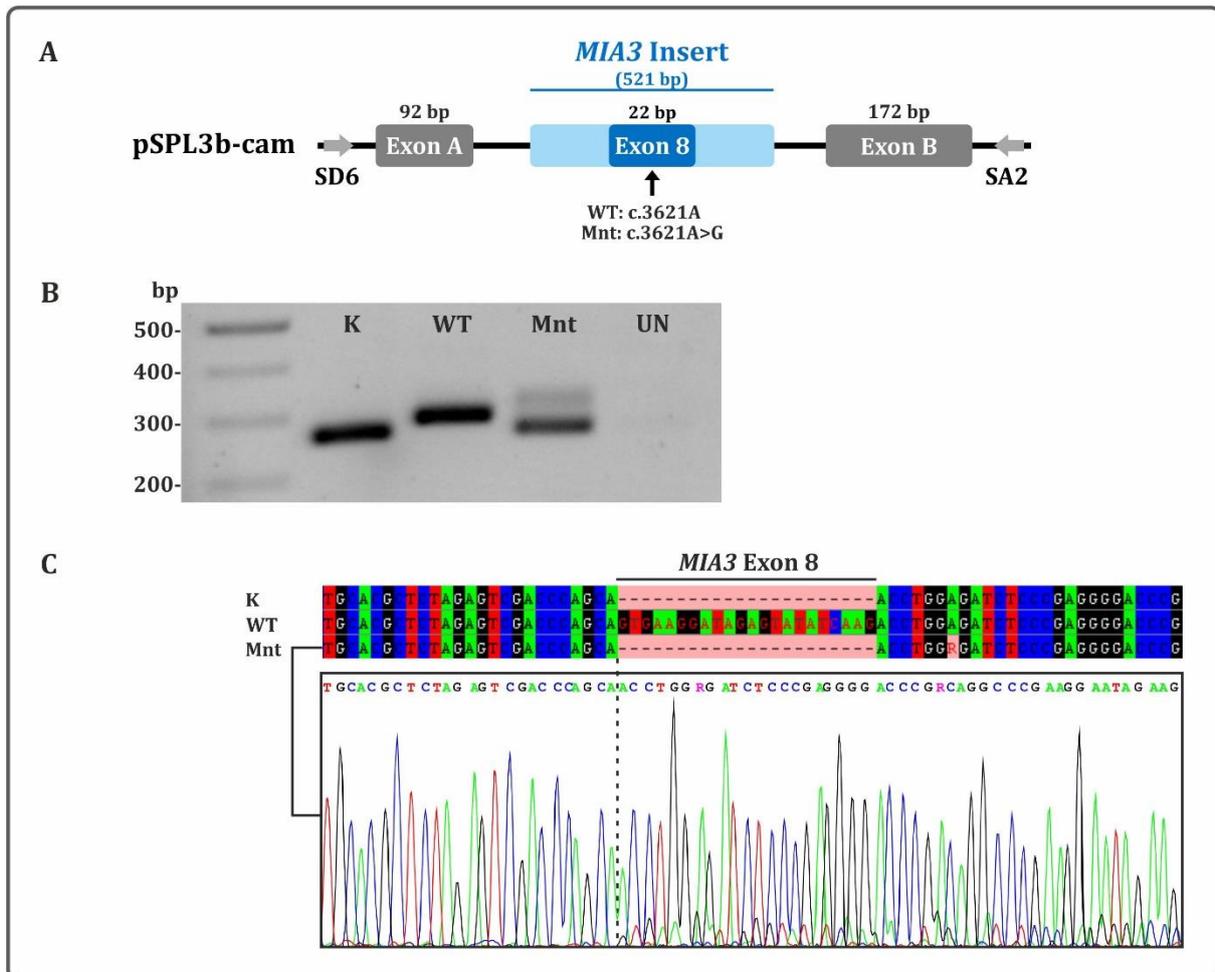


Abbildung 6.44: Konzeption und Ergebnisse des *in-vitro*-Spleißassays. (A) Für den Spleißassay kloniertes Vektorkonstrukt. Ein 521 bp großes *MIA3*-Amplikon, das Exon 8 und flankierende Intronsequenzen enthielt, wurde zwischen zwei Vektor-spezifische Exons in einen pSPL3b-cam-Vektor ligiert. Exon 8 enthielt entweder die wildtypische Sequenz (WT) oder die c.3621A>G Mutation (Mnt). (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der im Rahmen der Spleißanalysen entstandenen cDNA PCR-Produkte. K=Vektor-Kontrolle ohne Insert; WT=Vektor mit wildtypischem *MIA3* Exon 8 Insert; Mnt=Vektor mit mutiertem *MIA3* Exon 8 Insert; UN=untransfizierte Zellen. (C) cDNA-Sequenzen der jeweiligen PCR-Produkte. Bei den mit dem Mnt-Vektor transfizierten Zellen liefen zwei Sequenzen parallel, die sich ab der Stelle, wo das *MIA3* Exon 8 zu erwarten wäre, unterschieden. Nur eine der beiden Sequenzen wies tatsächlich Exon 8 auf (niedrigere Peaks, repräsentiert weniger Moleküle), das andere Molekül bestand nur aus Vektor-spezifischen Sequenzen (höhere Peaks, repräsentiert mehr Moleküle).

Um die beiden Spleißprodukte der Mutante separat voneinander zu sequenzieren, wurden diese in einen Vektor mit T-Überhang ligiert, die Konstrukte in Bakterien eingebracht, vervielfältigt und schließlich einzeln sequenziert (siehe Kapitel 5.2.5). Insgesamt wurden 22 Kolonien untersucht, von denen 15 (68%) kein *MIA3* Exon 8 Insert trugen, während 7 (32%) das Insert aufwiesen.

Auswirkungen der identifizierten *MIA3*-Mutation auf das prä-mRNA Spleißen *in vivo*

Nach Zusendung von Blutproben der gesamten Familie wurde RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und schließlich mit *MIA3*-spezifischen Primern von Exon 6 - Exon 11 amplifiziert (siehe Kapitel 5.2.6). Die cDNA PCR-Produkte der Familie, einer wildtypischen Negativkontrolle (WT) und eines Leerwerts (H₂O) sind in Abbildung 6.45 dargestellt. Bei allen vier Kindern (P1-P4) sowie bei den Eltern (E1, E2) erschienen drei Gelbanden nach elektrophoretischer Auftrennung, jedoch war bei den Kindern die kleinste Bande die am stärksten repräsentierte, während bei beiden Eltern die mittlere Bande das häufigste Spleißprodukt darstellte. Bei der wildtypischen Kontrolle (WT) war lediglich eine Gelbande zu erkennen (Abbildung 6.45A).

Die Sanger-Sequenzierung der cDNA PCR-Produkte ergab sowohl bei den vier Kindern, als auch bei den Eltern jeweils zwei Sequenzen, die sich ab der *MIA3* Exon 7/Exon 8 Grenze unterschieden (Abbildung 6.45B). Ab dieser Stelle zeigten sich im Elektropherogramm eine Sequenz, die Exon 8 enthielt, sowie eine zweite Sequenz, der Exon 8 fehlte und bei der auf Exon 7 direkt Exon 9 folgte. Bei der wildtypischen Kontrolle war lediglich eine einzige Sequenz zu beobachten, bei der auf Exon 7 auch Exon 8 folgte. Weder bei den Kindern, noch bei den Eltern ergab die Sanger-Sequenzierung der cDNA PCR-Produkte eine Sequenz, die die dritte Bande auf dem Agarosegel repräsentieren könnte.

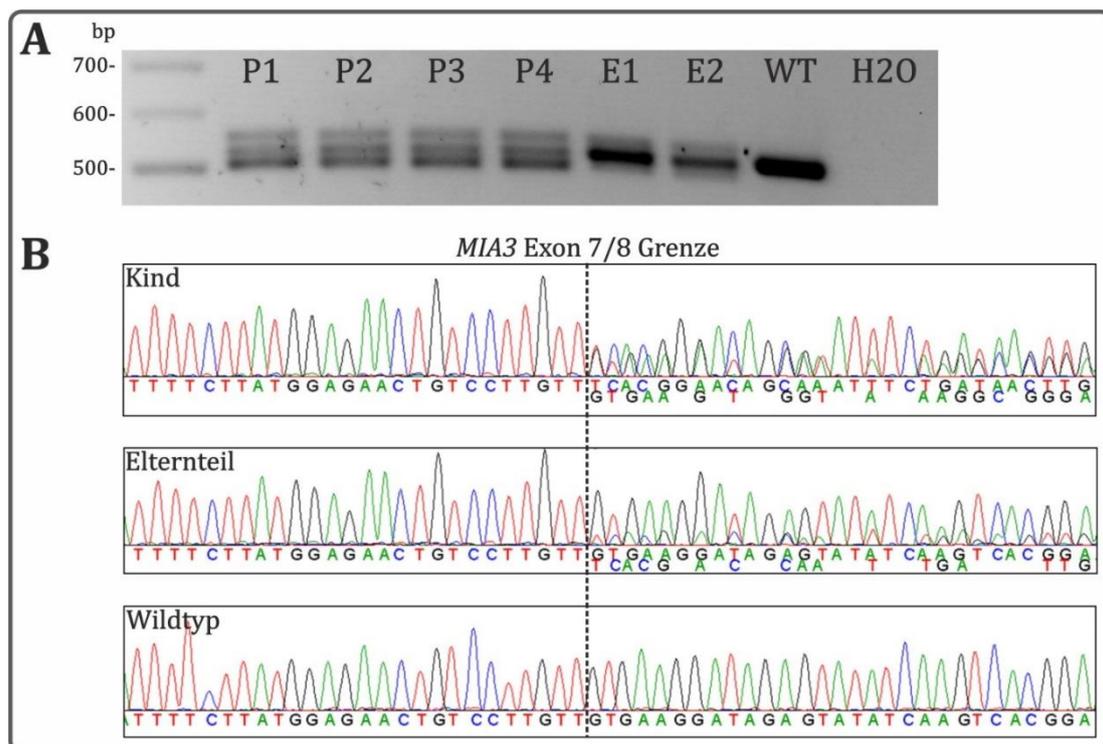


Abbildung 6.45: Ergebnisse der *in-vivo*-Spleißanalysen bei Familie BEL_1. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung der cDNA *MIA3* Exon 6-11 Amplikons aus peripherem Blut der vier betroffenen Kinder (P1-P4), beider Eltern (E1, E2), sowie einer wildtypischen Kontrolle (WT). (B) Elektropherogramme der dazugehörigen Sanger-Sequenzierungen. Bei den vier Kindern sowie bei beiden Eltern zeigten sich ab der *MIA3* Exon 7/8 Grenze zwei unterschiedliche Sequenzen, jeweils eine mit und eine ohne Exon 8. Die wildtypische Kontrolle wies lediglich die entsprechende Sequenz inklusive Exon 8 auf.

Individuelle Sequenzierung der einzelnen Spleißprodukte

Um die Sequenzabfolgen der drei verschiedenen, bei der PCR entstandenen Gelbanden separat ermitteln zu können, wurden diese wie in Kapitel 5.2.7 beschrieben einzeln aus dem Gel extrahiert und sequenziert (Abbildung 6.46). Hierbei wurden repräsentativ ein betroffenes Kind (P1), ein Elternteil (E1), sowie eine wildtypische Kontrolle (WT) untersucht. Bei der Sequenzierung zeigte sich, dass das kleinste cDNA PCR-Produkt (III) die *MIA3* cDNA-Sequenz repräsentierte, der das komplette Exon 8 fehlte. Bei der mittleren Gelbande (II) handelte es sich um eine Sequenz, bei der Exon 8 enthalten war. Die auf dem Agarosegel am langsamsten gewanderte Bande (I) zeigte wiederum sowohl eine Sequenz mit als auch eine Sequenz ohne Exon 8.

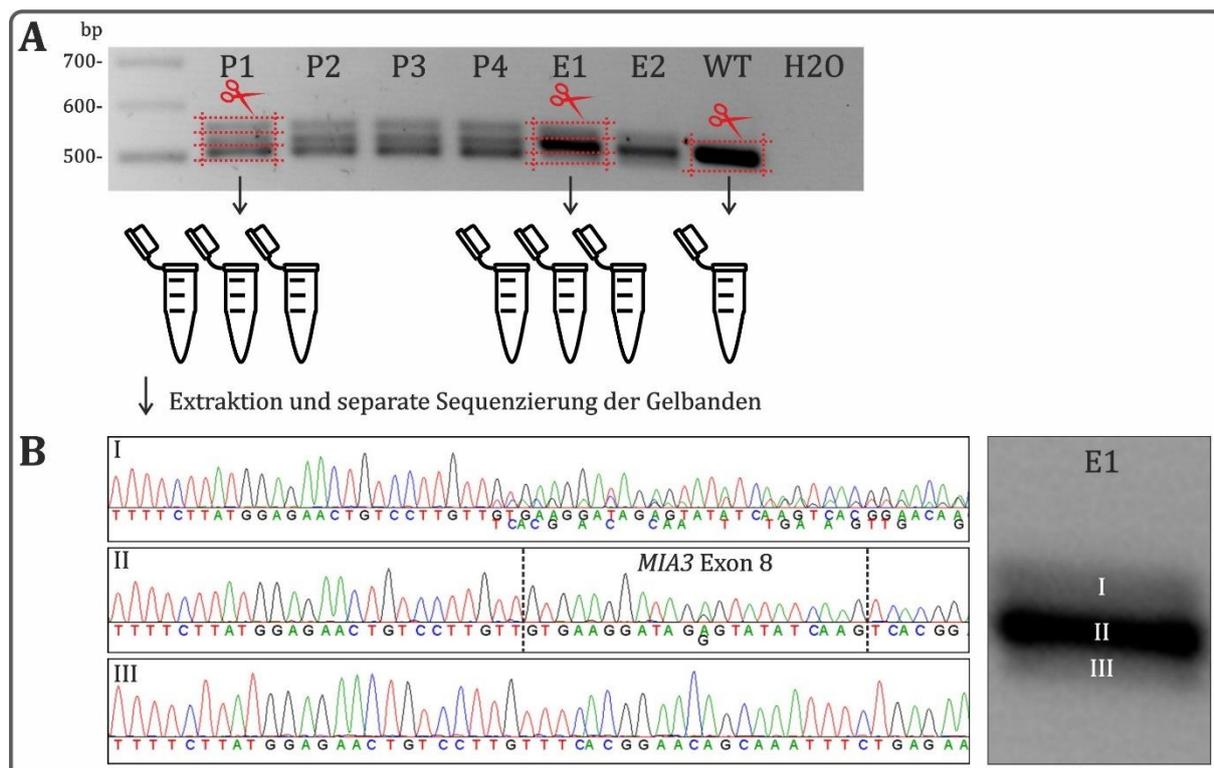


Abbildung 6.46: Ergebnisse der Gelextraktion und Sequenzierung der bei Familie BEL_1 entstandenen *MIA3*-Spleißprodukte. (A) Jeweils drei Gelbanden eines betroffenen Kindes (P1) und eines Elternteils (E1) sowie die Gelbande der wildtypischen Kontrolle (WT) wurden aus dem Gel herausgeschnitten und die enthaltenen PCR-Produkte einzeln extrahiert. (B) Die extrahierten Amplikons wurden schließlich separat sequenziert, um die individuelle Sequenz jeder einzelnen Gelbanden ermitteln zu können. Bei dem betroffenen Kind (P1) und dem Elternteil (E1) bestand die kleinste Bande (III) aus der *MIA3* Exon 6-11 Sequenz ohne Exon 8, die mittlere Bande (II) aus der *MIA3* Exon 6-11 Sequenz inklusive Exon 8 und die größte Bande (I) wieder aus einer Überlagerung der beiden anderen Sequenzen.

Relative Quantifizierung der beiden *MIA3*-Spleißprodukte bei den einzelnen Familienmitgliedern

Eine qRT-PCR mit den Spleißprodukten der einzelnen Familienmitglieder lieferte Auskunft über das relative Verhältnis des *MIA3* Spleißprodukts mit Exon 8 zu dem ohne Exon 8 innerhalb eines Individuums, zwischen den Familienmitgliedern und im Vergleich zu einer wildtypischen Kontrolle, die als Referenz diente (Abbildung 6.47). Als endogene Kontrolle wurde *HPRT1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) gewählt. Die vier betroffenen Kinder (II.1, II.2, II.4, II.5) zeigten die niedrigsten Werte für das normal gespleißte *MIA3* cDNA-Molekül (mittlerer RQ-Wert: 0,39). Die beiden Eltern (I.1, I.2)

wiesen größere Mengen auf (mittlerer RQ-Wert: 0,59), jedoch auch deutlich weniger als die wildtypische Kontrolle. Gleichzeitig war bei den vier Kindern die größte Menge an Spleißprodukt ohne Exon 8 festzustellen (mittlerer RQ-Wert: 4,58). Auch die Eltern zeigten erhebliche Anteile an falsch gespleißtem *MIA3* cDNA-Molekül (mittlerer RQ-Wert: 2,66) im Gegensatz zur wildtypischen Kontrolle.

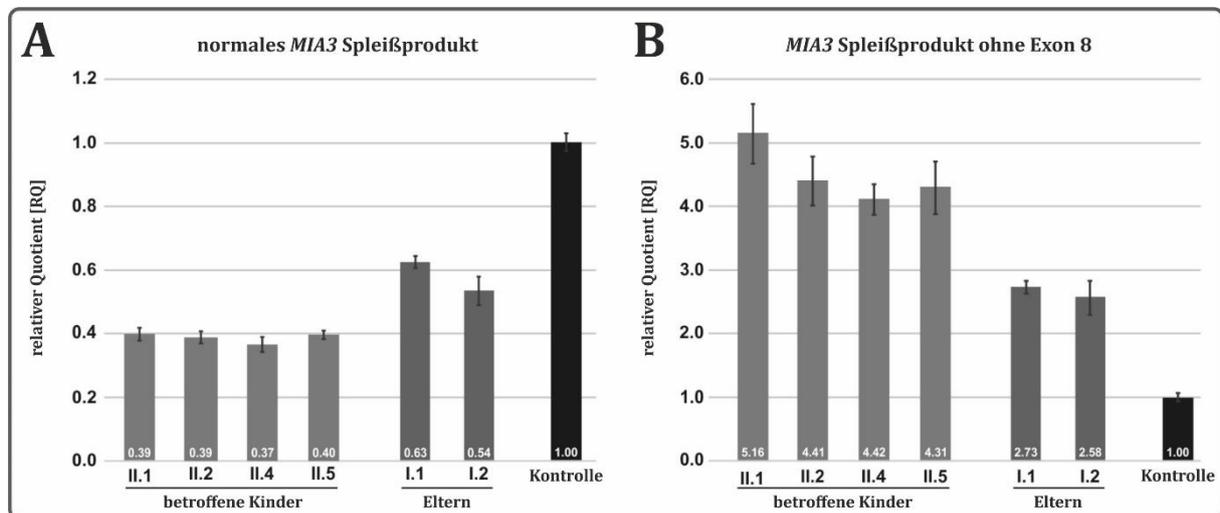


Abbildung 6.47: Relative Verhältnisse der beiden verschiedenen *MIA3*-Spleißprodukte der betroffenen Kinder (II.1, II.2, II.4, II.5) und beider Elternteile (I.1, I.2) aus Familie BEL_1, sowie einer wildtypischen Kontrolle. Die qRT-PCR-Analysen wurden an cDNA-Proben aus peripherem Blut durchgeführt. Alle betroffenen Kinder zeigten die niedrigsten Mengen des normal gespleißten Produkts (mittlerer RQ-Wert: 0,39). Die Eltern wiesen größere Mengen auf (mittlerer RQ-Wert: 0,59), jedoch immer noch weniger als die wildtypische Kontrolle. Gleichzeitig konnten bei allen betroffenen Kindern die größten Mengen des *MIA3* Spleißprodukts ohne Exon 8 beobachtet werden (mittlerer RQ-Wert: 4,58). Auch die Eltern wiesen das Spleißprodukt ohne Exon 8 auf, jedoch in geringerer Menge (mittlerer RQ-Wert: 2,66) als die vier betroffenen Kinder. Die wildtypische Kontrollprobe diente als Referenz, *HPRT1* als endogene Kontrolle.

Bestimmung des dem Fehlspleißen zugrunde liegenden Mechanismus

Um den Mechanismus, der zum beobachteten Wegfall des *MIA3* Exons 8 führt, genauer charakterisieren zu können, wurden antisense Oligonukleotide (Morpholinos) genutzt (siehe Kapitel 5.2.9). Zunächst wurde ermittelt, ob und inwiefern sich verschiedene *vivo* Morpholinos auf das *MIA3* prä-mRNA Spleißen in HeLa-Zellen auswirken (Abbildung 6.48; (A)). Hierzu wurde zu den sich in Kultur befindenden HeLa-Zellen entweder ein *MIA3* Exon 8 spezifischer *vivo* Morpholino (I), ein Standardkontrolle *vivo* Morpholino (II; sollte bei Personen ohne β -Thalassämie an keine prä-mRNA binden), oder gar kein *vivo* Morpholino gegeben (III). Nach RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation ergab die Sequenzierung der *MIA3* cDNA-Moleküle, dass die Zugabe des *MIA3* Exon 8 *vivo* Morpholinos zum Wegfall des Exons 8 führte, also auf Exon 7 direkt Exon 9 folgte. Die Zugabe des Standardkontrolle *vivo* Morpholinos hatte keine Auswirkung auf die untersuchte *MIA3* cDNA-Sequenz, hier folgte auf Exon 7 auch Exon 8 und schließlich Exon 9, genau wie bei den cDNA-Molekülen aus den unbehandelten HeLa-Zellen.

Daraufhin wurden die Auswirkungen des *MIA3* Exon 8 spezifischen *vivo* Morpholinos auf das *MIA3* prä-mRNA Spleißen der Mnt- und WT-Vektorkonstrukte in HeLa-Zellen über vier verschiedene Ansätze untersucht (Abbildung 6.48; (B)). Sich in Kultur befindende HeLa-Zellen wurden mit dem *MIA3* Exon 8 Mnt-Vektor aus Kapitel 5.2.5 transfiziert und zusätzlich entweder der *MIA3* Exon 8 spezifische *vivo* Morpholino hinzugegeben (IV) oder

nicht (V). Gleichzeitig wurden HeLa-Zellen aus derselben Kultur mit dem *MIA3* Exon 8 WT-Vektor aus Kapitel 5.2.5 transfiziert und zusätzlich entweder der *MIA3* Exon 8 spezifische *vivo* Morpholino hinzugegeben (VI) oder nicht (VII). Über die Differenzierung der Effekte des Morpholinos auf die entstandenen Spleißprodukte konnten Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Mechanismus gezogen werden (siehe Kapitel 7.3; Abbildung 7.2). Wie in Abbildung 6.48B dargestellt, ergab die Sanger-Sequenzierung, dass bei den cDNA-Molekülen aus Versuchsansatz IV und VI das *MIA3* Exon 8 komplett fehlte. Bei Versuchsansatz V gab es zwei Sequenzen, eine mit und eine ohne *MIA3* Exon 8. Die cDNA-Moleküle aus Versuchsansatz VII wiesen alle das Exon 8 auf.

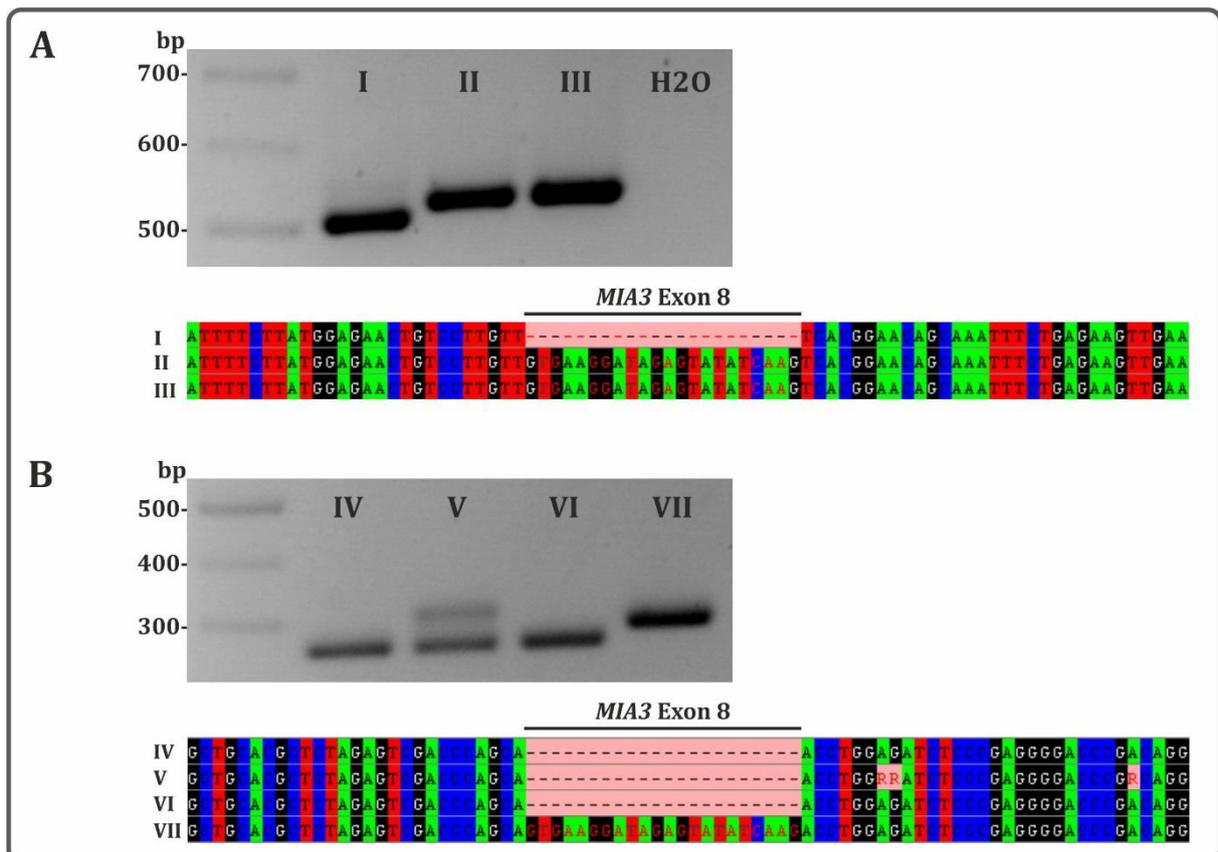


Abbildung 6.48: Ergebnisse der Effekte verschiedener *vivo* Morpholinos auf das *MIA3* prä-mRNA Spleißen. (A) Auswirkungen eines *MIA3* Exon 8 spezifischen *vivo* Morpholinos (I) und eines Standardkontrolle *vivo* Morpholinos (II) auf das *MIA3* prä-mRNA Spleißen in HeLa-Zellen. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Morpholino-Behandlung (III). Die Zugabe des *MIA3* Exon 8 spezifischen *vivo* Morpholinos resultierte im Wegfall des *MIA3* Exons 8 in den entsprechenden Spleißprodukten. Der Standardkontrolle *vivo* Morpholino hatte keine Auswirkungen auf das *MIA3* prä-mRNA Spleißen. (B) Auswirkungen des *MIA3* Exon 8 *vivo* Morpholinos (IV, VI) auf die *MIA3* mRNA-Moleküle von HeLa-Zellen, die zuvor mit einem Mnt (IV, V)- oder WT (VI, VII)-Vektorkonstrukt transfiziert wurden. Die Zugabe des *MIA3* Exon 8 *vivo* Morpholinos bewirkte sowohl in den Mnt- als auch in den WT-Zellen ein Exon 8 Skipping.

7. DISKUSSION

7.1. Aufklärungsrate

Die durch WES erzielten Aufklärungsraten schwanken in der Literatur stark, da sie von verschiedensten Faktoren abhängig sind. Die Aufklärungsrate wird maßgeblich durch die Zeitspanne beeinflusst, die jedem Fall bei der Analyse gewidmet werden kann. Die Analysen von homogenen Kohorten mit einem einheitlichen Krankheitsbild erzielen daher in der Regel höhere Aufklärungsraten als die von klinisch heterogenen Kohorten, da man sich bei der Konzentration auf eine klinische Entität in das entsprechende Krankheitsbild ausreichend einarbeiten, Kandidatengenlisten zusammenstellen und gezielte Analysestrategien entwickeln kann. Eine gute klinische Charakterisierung der zu untersuchenden Patienten lässt zudem bestimmte Gene bei der Analyse in den Fokus rücken und bringt somit eine enorme Zeitersparnis. Bei der Suche nach neuen krankheitsrelevanten Genen kann eine detaillierte klinische Beschreibung der Patienten eine bessere Vorstellung von potenziellen Pathomechanismen ermöglichen, was sich auf die Priorisierung einzelner Sequenzvarianten auswirken kann. Des Weiteren ist naheliegend, dass Studien an Patientenkohorten mit in der Regel genetisch bedingten Krankheitsbildern bessere Aufklärungsraten erzielen als solche an Patienten mit Erkrankungen, für die auch exogene Ursachen in Frage kommen. Ein umfangreicher Stammbaum erlaubt zudem Rückschlüsse auf den vorliegenden Erbgang, was das Filtern der Sequenzvarianten erleichtert. Aber auch der Zeitpunkt der WES-Analyse im Hinblick auf andere Diagnoseverfahren beeinflusst die Aufklärungsrate. Wurden vorher bereits andere Untersuchungsmethoden in Anspruch genommen und Mutationen in naheliegenden Genen ausgeschlossen, kann auch die WES in vielen Fällen zu keiner Diagnose führen. Grund hierfür können z.B. das Vorliegen einer Mutation in einem bis dahin unbekanntem Krankheitsgen, in nicht Protein-codierenden Bereichen der DNA, oder aber eine di-/oligo-/polygen verursachte oder durch *Modifier* beeinflusste Erkrankung sein. Des Weiteren kann in einigen Fällen bei der Aufklärung der genetischen Ursache einer Erkrankung davon profitiert werden, wenn mehrere Familienmitglieder gleichzeitig untersucht werden, z.B. im Rahmen von Trio-Analysen (Indexpatient und beide Eltern) bei Verdacht auf eine autosomal dominante Erkrankung, um Neumutationen schnell ausfindig machen zu können (Tarailo-Graovac, Shyr et al. 2016, Eldomery, Coban-Akdemir et al. 2017). Genetisch heterogene Krankheitsbilder, solche mit vielen potenziellen Differentialdiagnosen oder die atypische Ausprägung einer bekannten Erkrankung erschweren hingegen die genetische Analyse und wirken sich demnach negativ auf die Aufklärungsrate aus (Stark, Tan et al. 2016).

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Patienten bilden eine sehr heterogene Gruppe mit unterschiedlichsten Phänotypen und wurden durch die Kollaborationspartner zum Teil nur schlecht oder gar nicht klinisch beschrieben. Nichtsdestotrotz lag die Aufklärungsrate bei der klinisch besser charakterisierten iranischen Kohorte bei 63%, in der klinisch schlecht bis gar nicht charakterisierten pakistanischen Kohorte bei 46%. Die unterschiedlichen Aufklärungsraten der beiden

Kohorten verdeutlichen die Relevanz der phänotypischen Informationen für die Analyse. In anderen Studien an heterogenen Patientenkohorten werden häufig Aufklärungsraten von ~20-30% durch WES erzielt (Yang, Muzny et al. 2013, Lee, Deignan et al. 2014, Yang, Muzny et al. 2014, Retterer, Juusola et al. 2016, Trujillano, Bertoli-Avella et al. 2017), während bei Analysen an konsanguinen Familien in meist knapp über 50% der untersuchten Fälle die molekularen Krankheitsursachen ausfindig gemacht werden können (Charng, Karaca et al. 2016, Alfares, Alfadhel et al. 2017). Die gemeinsame Fortpflanzung eines blutsverwandten Paares birgt ein erhöhtes Risiko für die Manifestation autosomal rezessiver Erkrankungen in den Nachkommen (Sheridan, Wright et al. 2013), für das Auftreten von Fehlgeburten (Fareed, Ahmad et al. 2017, Najafi, Gholami et al. 2019) und peri-/neonatalen Todesfällen (Bittles, Grant et al. 1993, Kapurubandara, Melov et al. 2016), da die Eltern aufgrund ihrer gemeinsamen Abstammung zu einem vom Verwandtschaftsgrad abhängigen Anteil identisches Erbgut besitzen (Abbildung 7.1). Sofern beide Elternteile beispielsweise die gleiche pathogene Mutation in einem haploinsuffizienten Gen aufweisen, ist bei der Zeugung von Nachkommen die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Befruchtung zwei Gameten mit der gleichen nachteiligen Mutation verschmelzen höher, als wenn die Fortpflanzung mit einem nicht blutsverwandten Partner erfolgt. Dieses Wissen um die Risiken bei der Fortpflanzung von konsanguinen Paaren wurde in der vorliegenden Arbeit für die Filterstrategie von Sequenzvarianten genutzt, indem bei der Datenanalyse biallelische Sequenzvarianten in den Indexpatienten im Fokus standen. Trotz der oftmals schlechten klinischen Charakterisierung der Patienten konnten in der vorliegenden Arbeit dennoch vergleichsweise hohe Aufklärungsraten erzielt werden, was sehr wahrscheinlich durch die Konsanguinität der untersuchten Familien zu begründen ist.

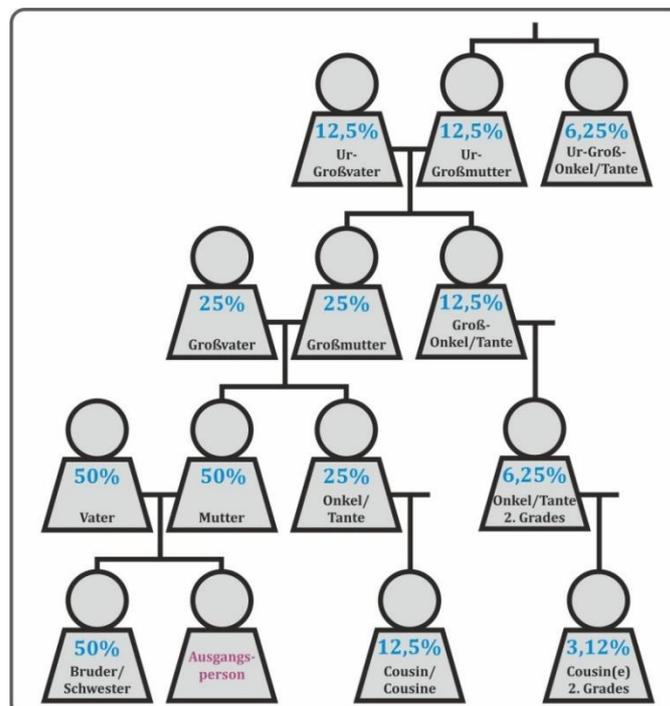


Abbildung 7.1: Genetische Übereinstimmung zwischen zwei Mitgliedern derselben Familie. Die Prozentzahl gibt die durchschnittlichen Werte für gemeinsame autosomale genomische Abschnitte mit der Ausgangsperson an.

7.2. Fälle mit pathogenen Mutationen in bekannten krankheitsassoziierten Genen

CPS1

Bei einem betroffenen Kind aus Familie IRN_1 wurde eine homozygote *missense* Mutation im Gen *CPS1* detektiert (p.Asp920His). *CPS1* codiert für ein wichtiges Enzym des Harnstoffzyklus, die Carbamoylphosphat-Synthetase I. Der Harnstoffzyklus dient bei Säugetieren der Umwandlung von stickstoffhaltigen Abbauprodukten, wie Ammonium, zu Harnstoff und findet vor allem in den Leber- und Dünndarmzellen statt. Pathogene *CPS1*-Mutationen sind mit einem Carbamoylphosphat-Synthetase I-Mangel (MIM# 237300) assoziiert, der einen Harnstoffzyklusdefekt zur Folge hat. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und tritt in einer neonatal letalen und in einer später einsetzenden, moderaten Form auf. Zu den Symptomen zählen u.a. eine Hyperammonämie, Abneigung gegen eiweißhaltige Nahrung, Erbrechen, Muskelhypotonie, Wachstumsverzögerung, Intelligenzminderung, zerebrale Ödeme, Krampfanfälle, hyperammonämisches Koma ggf. mit einer Ketoazidose und eine respiratorische Alkalose (OMIM, Orphanet). Die Diagnose erfolgt in der Regel durch die Messung der Enzymaktivität in einer Leber- oder Darmbiopsie und ggf. durch die molekulargenetische Analyse. Therapiemaßnahmen beinhalten eine spezielle eiweißreduzierte Diät, sowie die Gabe von Citrullin und Arginin.

In der HGMD-Datenbank sind bisher 272 krankheitsverursachende *CPS1*-Mutationen aufgeführt, darunter auch eine *missense* Variante, die eine von der in Familie IRN_1 detektierten Mutation nur zwei Positionen entfernte Aminosäure betrifft (p.Ser918Pro, CM042961). Beide Varianten liegen innerhalb der Oligomerisierungs-Domäne des Proteins. Die in Familie IRN_1 nachgewiesene Mutation ist äußerst selten (Allelfrequenz: 0,000007957), betrifft eine hochkonservierte Aminosäure und wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft. In den großen Poulationsdatenbanken wie ExAC oder gnomAD sind keine homozygoten Träger der Variante vermerkt. Zudem passen die bei den untersuchten Patienten beschriebenen Symptome (Nahrungsverweigerung, Verdauungsschwierigkeiten, Atemnot) ins klinische Bild der neonatal letalen Form des Carbamoylphosphat-Synthetase I-Mangels. Deshalb handelt es sich bei der hier identifizierten *CPS1*-Mutation sehr wahrscheinlich um die Krankheitsursache der betroffenen Kinder aus Familie IRN_1. Sofern in der Familie weitere Kinder mit dem hier beschriebenen Krankheitsbild zur Welt kommen, können somit nun entsprechende Therapiemaßnahmen in die Wege geleitet und betroffene Neugeborene adäquat medizinisch versorgt werden.

IMPAD1

In Familie IRN_9 wurde bei einem Patienten eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *missense* Mutation im Gen *IMPAD1* nachgewiesen (p.Asp110Glu). *IMPAD1* codiert für eine am Golgi-Apparat lokalisierte Inositol-Monophosphatase, die die Hydrolyse von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat zu Adenosinmonophosphat katalysiert (Frederick, Tafari et al. 2008). Pathogene *IMPAD1*-Mutationen gehen mit der

Chondrodysplasie mit Gelenkluxation des gPAPP-Typs einher. Die Gruppe der Chondrodysplasien mit Gelenkluxationen besteht aus vielen verschiedenen klinischen Entitäten, von denen die meisten autosomal rezessiv vererbt und durch Mutationen in Genen hervorgerufen werden, die der Synthese oder Sulfatierung von Proteoglykanen dienen, welche wichtig für den Aufbau der extrazellulären Matrix und die Signaltransduktion sind (Ranza, Huber et al. 2017). Die Chondrodysplasie mit Gelenkluxation des gPAPP-Typs ist eine sehr seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von 1:1000000 und klinisch durch einen pränatal einsetzenden disproportionierten Minderwuchs, verkürzte Extremitäten, angeborene Gelenkluxationen, Mikrognathie, Gaumenspalte, Brachydaktylie, kurze Mittelhandknochen und unregelmäßig große Epiphysen der Mittelhandknochen, überzählige Knochenkerne der Ossifikationszentren in den Händen und faciale Dismorphiezeichen gekennzeichnet (Orphanet). In einigen Fällen tritt auch eine Hörstörung oder psychomotorische Entwicklungsverzögerung in Erscheinung.

In der HGMD-Datenbank sind bisher lediglich fünf krankheitsverursachende *IMPAD1*-Mutationen hinterlegt. Die identifizierte Mutation betrifft eine hochkonservierte Aminosäure, wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft und liegt innerhalb der Inositol-Monophosphatase-Domäne des Proteins. Bis auf die pränatal festgestellten verkürzten Extremitäten lagen keine klinischen Informationen zu den Betroffenen aus Familie IRN_9 vor, deshalb ist ein phänotypischer Abgleich schwierig. Da jedoch keine weiteren vielversprechenden Mutationen in anderen Genen identifiziert werden konnten, insbesondere auch nicht innerhalb der homozygoten Intervalle, und die pränatale Mikromelie in das klinische Bild der Chondrodysplasie mit Gelenkluxation des gPAPP-Typs passt, kann die *IMPAD1*-Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit als Krankheitsursache in Familie IRN_9 betrachtet werden.

PYCR1

Bei den beiden betroffenen Kindern aus Familie IRN_10 wurde eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *missense* Mutation im Gen *PYCR1* detektiert (p.Ala216Val). *PYCR1* codiert für ein in den Mitochondrien lokalisiertes Enzym, das an der Biosynthese von Prolin beteiligt ist (De Ingeniis, Ratnikov et al. 2012). Pathogene Mutationen in *PYCR1* werden mit einer autosomal rezessiven Form von Cutis laxa (Typ IIB, auch bekannt als *PYCR1*-assoziiertes De Barsy-Syndrom; MIM# 179035) in Verbindung gebracht. „Cutis laxa“ ist ein Überbegriff für verschiedene Bindegewebserkrankungen, die sich alle in einer schlaffen, faltigen Haut äußern, jedoch anhand des Vererbungsmusters, des Schweregrades und weiterer Symptome unterschieden werden können. Es sind autosomal dominante (*ELN*, *FBLN5* und *ALDH18A1*), autosomal rezessive (*FBLN5*, *EFEMP2*, *LTBP4*, *ATP6VOA2*, *ATP6V1A*, *ATP6V1E1*, *ALDH18A1* und *PYCR1*) und X-chromosomal rezessive Formen (*ATP7A*) bekannt, die mit unterschiedlichen Prognosen einhergehen. Zu den Symptomen der autosomal rezessiven Cutis laxa Typ IIB zählen neben der schlaffen, faltigen Haut u.a. eine Wachstumsverzögerung, eine Mikrozephalie mit großer, breiter Stirn, eine dreieckige Gesichtsform, ein progeroides Erscheinungsbild mit hängenden Wangen, großen Ohren und auffälligen Venen, eine Gelenküberbeweglichkeit und Osteopenie. Therapiemaßnahmen umfassen lediglich

symptomatische Behandlungen.

In der HGMD-Datenbank sind bisher 39 krankheitsverursachende *PYCR1*-Mutationen aufgeführt. Die hier nachgewiesene Variante betrifft eine hochkonservierte Aminosäure und wird von fast allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft, zudem liegt sie innerhalb eines homozygoten Intervalls bei Patient II.1. Die gute klinische Übereinstimmung mit dem Krankheitsbild der Cutis laxa Typ IIB sowie die Tatsache, dass beide betroffene Geschwister homozygote Träger der Variante sind, lassen darauf schließen, dass es sich bei der identifizierten *PYCR1*-Mutation um die Krankheitsursache der Patienten aus Familie IRN_10 handelt.

DNMT3B

Das betroffene Kind aus Familie IRN_11 weist eine homozygote *missense* Mutation im Gen *DNMT3B* auf (p.Arg531His). *DNMT3B* codiert für eine *de novo* DNA Methyltransferase, welche unmethylierte und hemimethylierte DNA-Abschnitte mit Methylgruppen versehen kann. Pathogene *DNMT3B*-Mutationen werden mit einer autosomal rezessiven Immundefizienz assoziiert, die mit zentromerischer Instabilität und fazialen Auffälligkeiten einhergeht (*Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies (ICF) syndrome 1*; MIM# 242860). Zu den Symptomen zählen u.a. eine Körpergröße, ein Körpergewicht und ein Kopfumfang unterhalb der 3. Perzentile, Gedeihstörungen, Sinusitis, ein flaches Gesicht, Epicanthus, Hypertelorismus, tief sitzende Ohren, ein flacher Nasenrücken, Mikrognathie und Makroglossie, chronische Bronchitis, Pneumonien, gastrointestinale Probleme und Intelligenzminderung verschiedenen Schweregrades. Auch die Anzahl an T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Immunglobulinen (IgA und IgG) im Blut ist vermindert. Zudem lassen sich diverse zytogenetische Auffälligkeiten beobachten, wie eine erhöhte Instabilität der Chromosomen mit viel zentromerspezifischem Heterochromatin (Chromosomen 1, 9 und 16), eine gesteigerte somatische Rekombinationsrate und aberrante Chromosomenkonfigurationen.

In der HGMD-Datenbank finden sich 49 krankheitsverursachende *DNMT3B*-Mutationen. Die bei dem Patienten detektierte Mutation ist sehr selten (Allelfrequenz: 0,00006381) und es sind keine homozygoten Träger in den großen Poulationsdatenbanken wie ExAC oder gnomAD vermerkt. Die Mutation betrifft eine hochkonservierte Aminosäure und wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft, zudem befindet sie sich zwischen zwei homozygoten Intervallen des Patienten und lediglich 1,3 Mb vom nächstgelegenen homozygoten Intervall entfernt. Erfahrungsgemäß kann die Identifizierung homozygoter Intervalle durch das genutzte Programm (HomozygosityMapper) durch Artefakte oder Frequenzungenauigkeiten in der Variantenliste erschwert werden, weshalb die Intervallgrenzen nicht als starre Referenzwerte betrachtet werden sollten. Die Entwicklungsverzögerung sowie die fazialen Auffälligkeiten des untersuchten Patienten könnten durch das ICF-Syndrom erklärt werden, die Fehlbildungen des Harnleiters und des Herzens sind jedoch keine typischen Symptome der Erkrankung. Zu einer Sicherung der Diagnose könnten die oben genannten Blutparameter bestimmt und Metaphase-Chromosomen aus peripherem Blut nach Mitogen-Stimulation analysiert werden.

PEX7

In Familie IRN_12 wurde bei einer betroffenen Patientin eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *in-frame* Deletion im Gen *PEX7* detektiert (p.Gly124_Ser132del). *PEX7* codiert für einen Rezeptor, der eine wichtige Rolle beim Proteinimport der Peroxisomen spielt. Pathogene *PEX7*-Mutationen können den autosomal rezessiven Defekt der Peroxisomen-Biogenese Typ 9B (MIM# 614879) oder den autosomal rezessiven rhizomelen Typ der Chondrodysplasia punctata (MIM# 215100) verursachen. Für die Gruppe der Chondrodysplasia punctata sind punktförmige Kalzifizierungen von Knorpelgewebe an Gelenken namensgebend. Der rhizomele Typ der Chondrodysplasia punctata ist u.a. gekennzeichnet durch eine Verkürzung der Oberarm- und Oberschenkelknochen, Katarakte, Hautläsionen wie Ichthyosis, eine Mikrozephalie, eine eingeschränkte Gelenkbeweglichkeit, eine Alopezie, Wirbelsäulenveränderungen wie Skoliose oder Kyphose, respiratorische Insuffizienz, eine Wachstumsretardierung und Intelligenzminderung, Spastiken, Krampfanfälle und eine kortikale Atrophie. Die Diagnose erfolgt in der Regel über klinische und radiologische Befunde sowie eine molekulargenetische Analyse. Die Prognose für Patienten mit dem rhizomelen Typ der Chondrodysplasia punctata ist sehr schlecht, die meisten Betroffenen versterben in den ersten Lebensjahren.

Der Defekt der Peroxisomen-Biogenese Typ 9B dagegen führt zu einem mildereren Phänotyp mit weniger neurologischen Symptomen, ohne rhizomele Extremitätenverkürzung und einer längeren Lebenserwartung. Zu den Symptomen zählen hier u.a. eine Hörstörung, Katarakt und Retinitis pigmentosa, Kardiomyopathien, ein Hohlfuß (*Pes cavus*), verkürzte Mittelhand- und Mittelfußknochen des fünften Strahls, Ichthyosis, Muskelschwäche, eine Ataxie und eine sensomotorische Polyneuropathie.

In der HGMD-Datenbank sind bisher 52 krankheitsverursachende *PEX7*-Mutationen gelistet, darunter auch kleinere *in-frame* Deletionen. Die hier identifizierte Deletion liegt inmitten einer WD40-Repeat-Domäne des Proteins. WD40-Repeat-Domänen sind wichtig für die Koordination von Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen und spielen bei verschiedensten zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle. Nicht alle der bei der untersuchten Patientin aus Familie IRN_12 beschriebenen Symptome passen ins klinische Bild der *PEX7*-assoziierten Erkrankungen. Die steifen Gelenke seit der Geburt, das bilaterale Katarakt und die Krampfanfälle decken sich zwar mit den Symptomen des rhizomelen Typs der Chondrodysplasia punctata, die identifizierte *PEX7*-Deletion erklärt jedoch nicht alle bei der Patientin beobachteten Symptome. Insbesondere wurde auch keine rhizomele Verkürzung der Extremitäten bei der Patientin beschrieben. Die Mutation liegt in keinem homozygoten Intervall, allerdings weist ein ebenfalls betroffener Onkel 2. Grades der Indexpatientin auch die *PEX7*-Deletion auf. Diese Tatsache ist ein starker Hinweis darauf, dass die Mutation den Phänotyp der Patienten zumindest beeinflusst. Daneben könnte sich eine zusätzliche Mutation in einem weiteren Krankheitsgen modulierend auswirken. Denkbar wäre auch, dass die Deletion gravierendere Auswirkungen auf die Proteinfunktion hat und somit zusätzliche, bisher noch nicht beschriebene Symptome hervorruft.

INPPL1

Bei einem kurz nach der Geburt verstorbenen Kind mit verkürzten Extremitäten aus Familie IRN_13 wurde eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *missense* Mutation im Gen *INPPL1* nachgewiesen (p.Trp688Arg). *INPPL1* gehört zur Familie der Inositol-1,4,5-Trisphosphat 5'-Phosphatasen, die als signalmodulierende Enzyme an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind. Pathogene *INPPL1*-Mutationen sind mit der autosomal rezessiven Opsismodysplasie assoziiert, einer schweren Skelettdysplasie, die mit verkürzten Extremitäten, kleinen Händen und Füßen, sowie kraniofazialen Auffälligkeiten wie Makrozephalie mit großer anteriorer Fontanelle, prominenten Augenbrauen, flachem Nasenrücken mit kleiner Nase, antevierten Nasenlöchern und langem Philtrum einhergeht (Below, Earl et al. 2013, Huber, Faqeih et al. 2013). Zu den radiologischen Auffälligkeiten zählen u.a. verkürzte Röhrenknochen mit verzögerter Mineralisierung der Epiphysen, kurze Mittelhand- und Fingerknochen und schwere Platyspondylie. Die Opsismodysplasie kann bereits *in utero* oder innerhalb der ersten Lebensjahre aufgrund von Atemnot zum Tod führen. Des Weiteren identifizierten Lee, Nevarez et al. (2015) eine *INPPL1*-Mutation als Krankheitsursache bei einem totgeborenen Feten mit Schneckenbecken-Dysplasie.

Die Opsismodysplasie ist mit einer Prävalenz von <1:1000000 sehr selten, in der HGMD-Datenbank sind bisher 29 krankheitsverursachende *INPPL1*-Mutationen beschrieben, darunter auch die Mutation Trp688Cys (CM130302), die dieselbe Aminosäure betrifft wie die bei dem untersuchten Kind aus Familie IRN_13 detektierte Mutation (Trp688Arg). Tryptophan und Arginin unterscheiden sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften. Bei Tryptophan handelt es sich um eine aromatische, unpolare, neutrale Aminosäure, wohingegen Arginin aliphatisch, polar und stark basisch ist. Tryptophan an Position 688 des Proteins liegt innerhalb der 5'-Phosphatase-Domäne und ist hochkonserviert innerhalb der Familie der Inositol-5'-Phosphatasen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass ihr Austausch gravierende Folgen für die Proteinfunktion haben könnte. Daher handelt es sich bei der hier identifizierten *INPPL1*-Mutation sehr wahrscheinlich um die Krankheitsursache bei dem untersuchten Kind aus Familie IRN_13.

TRAF3IP1

In Familie IRN_15 wurde bei einem betroffenen Kind eine homozygote *missense* Mutation im Gen *TRAF3IP1* detektiert (p.Glu57Lys). *TRAF3IP1* codiert für eine Untereinheit des IFT (*intraflagellar transport*)-B Komplexes und beeinflusst den anterograden Zilientransport (Taschner, Bhogaraju et al. 2012, Taschner, Weber et al. 2016). Pathogene Mutationen in *TRAF3IP1* verursachen das Senior-Loken-Syndrom 9, eine autosomal rezessive Ziliopathie mit vor allem okulo-renaler Manifestation. Zhang, Taylor et al. (2018) konnten *TRAF3IP1*-Mutationen zudem mit dem Kurzrippen-Polydaktylie-Syndrom Typ Majewski (*short-rib polydactyly syndrome type II*, SRPS Typ II) und der Asphyxierenden Thoraxdysplasie in Verbindung bringen. Bei einem SRPS Typ II Patienten identifizierten die Autoren *compound* heterozygote Mutationen in *TRAF3IP1* als Krankheitsursache, c.988-1G>C und c.169G>A (p.Glu57Lys). Der Patient zeigte neben einer ausgeprägten Mikromelie und Polydaktylie aller Extremitäten vergrößerte Nieren, ein mildes

Oligohydramnion, ein generalisiertes Hautödem sowie eine vergrößerte Nackentransparenz.

In der HGMD-Datenbank sind bisher erst zehn krankheitsverursachende *TRAF3IP1*-Mutationen gelistet, darunter c.988-1G>C (CS182287) und c.169G>A (p.Glu57Lys; CM182286) als die beiden einzigen in Verbindung mit dem SRPS Typ II. Bei der p.Glu57Lys Mutation handelt es sich um die gleiche Mutation, die hier auch bei der Patientin aus Familie IRN_15 nachgewiesen wurde. Obwohl für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patientin kaum klinische Informationen vorlagen, passen die verkürzten Extremitäten ins klinische Bild des SRPS Typ II, was die Pathogenität der p.Glu57Lys Mutation im Zusammenhang mit dieser Erkrankung untermauert.

GCH1

Bei zwei betroffenen Kindern aus Familie PAK_1 wurde eine homozygote *missense* Mutation im Gen *GCH1* gefunden (p.Arg198Trp). *GCH1* spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese von Tetrahydrobiopterin (BH4), einem Cofaktor für diverse Monoxygenasen, die am Abbau von Phenylalanin beteiligt sind. Des Weiteren wird BH4 für die Synthese verschiedener Neurotransmitter und für die Produktion von Stickstoffmonoxid benötigt. Pathogene *GCH1*-Mutationen werden mit einer DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin)-responsiven Dystonie (DRD) und mit einer Hyperphenylalaninämie assoziiert. Die DRD wird autosomal dominant, in seltenen Fällen aber auch autosomal rezessiv vererbt. Die rezessive Form (MIM# 233910) beginnt im Kindesalter und äußert sich u.a. in auffälligen Augenbewegungen, Hypersalivation (vermehrtem Speichelfluss), Schluckbeschwerden und verschiedenen neurologischen Problemen wie verzögerter psychomotorischer Entwicklung, Intelligenzminderung, Hypertonie der Extremitäten, Ataxie, Tremor, Dystonie, Muskelstarre, Hyperkinesie, Krampfanfälle, Choreoathetose und Lethargie. Der Schweregrad der Erkrankung unterscheidet sich zwischen den Patienten, zudem sind die Symptome am Abend ausgeprägter als am Morgen. Die Patienten sprechen dramatisch auf die orale Gabe von niedrigdosiertem Levodopa (L-DOPA) an. Sofern mit der Behandlung früh begonnen wird, können die neurologischen Symptome stark reduziert werden. Wird keine Therapie in die Wege geleitet, verläuft die Erkrankung progressiv.

In der HGMD-Datenbank sind bisher 236 krankheitsverursachende *GCH1*-Mutationen gelistet, darunter auch die bei den betroffenen Kindern aus Familie PAK_1 identifizierte Variante (CM086712), die bereits von Kim, Choi et al. (2008) mit der autosomal rezessiven Form der DRD in Verbindung gebracht wurde. Die Autoren konnten nachweisen, dass die p.Arg198Trp Mutation die Expression des Gens auf die Hälfte reduziert. Die Mutter der betroffenen Kinder ist heterozygote Trägerin der pathogenen Mutation, der Vater konnte nicht getestet werden. Für beide Elternteile wurden jedoch keine klinischen Auffälligkeiten berichtet. Sehr wahrscheinlich ist deshalb das Vorliegen der Mutation in homozygotem Zustand bei beiden betroffenen Kindern für eine autosomal rezessive Form der DRD verantwortlich. Die Detektion der hier vorgestellten *GCH1*-Mutation als Krankheitsursache der betroffenen Kinder könnte somit eine erhebliche Verbesserung des Krankheitsbilds ermöglichen, sofern den Patienten vor Ort die entsprechenden Medikamente zur Verfügung gestellt werden können.

CHST3

In Familie PAK_4 wurde bei den beiden betroffenen Schwestern eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *frameshift* Insertion im Gen *CHST3* nachgewiesen (p.Ala127Thrfs*194). *CHST3* codiert für eine Sulfotransferase, die an der Synthese von Chondroitinsulfat beteiligt ist. Chondroitinsulfat wird von den Chondroblasten gebildet und ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Vor allem im Knorpelgewebe leistet es einen Beitrag zum Widerstand gegen Kompression und ist mitverantwortlich für die Mobilität und Flexibilität von Gelenken (Baeurle, Kiselev et al. 2009). Pathogene *CHST3*-Mutationen verursachen eine schwere autosomal rezessive Skelettdysplasie, die mit multiplen Gelenkdislokationen (vor allem Knie, Hüfte, Schulter) einhergeht (MIM# 143095). Zu den weiteren Symptomen zählen u.a. Kleinwuchs, eine breite Stirn, ein langes Philtrum, ein hoher Gaumen, Mikrodontie und später Zahndurchbruch, Hypertelorismus, Hörstörungen, kleine Ohren, ein kurzer Hals, Herzfehlbildungen, Dysplasie der Ellenbogengelenke mit Subluxation und eingeschränkter Mobilität, sowie verschiedenste Fehlbildungen der Hände, der Füße, des Beckens und der Wirbelsäule (OMIM). Nachdem für *CHST3*-bedingte Skelettdysplasien viele verschiedene Krankheitsbegriffe genutzt wurden, wie autosomal rezessives Larsen-Syndrom, Chondrodysplasie mit multiplen Dislokationen und Spondyloepiphysäre Dysplasie mit kongenitalen Gelenkdislokationen, wurde nun vorgeschlagen, all diese Erkrankungen unter dem Überbegriff der *CHST3*-assoziierten Skelettdysplasie zusammenzufassen.

In der HGMD-Datenbank sind bisher 22 krankheitsverursachende *CHST3*-Mutationen gelistet. Die bei den Patientinnen aus Familie PAK_4 detektierte Insertion von vier Basenpaaren in Exon 3 des Gens (c.373_374insGACC) führt zu einer Verschiebung des Leserasters (*frameshift*) und damit zu einem vorzeitigen Stopcodon. Sofern die mRNA mit dem vorzeitigen Stopcodon in ein Protein translatiert wird, ist das hieraus entstehende trunkierte Enzym sehr wahrscheinlich stark in seiner Funktion eingeschränkt, was sich in der auf den Fotos deutlich abzeichnenden Extremitätenfehlbildung äußert.

MAP3K20 / NEB

Bei der betroffenen Patientin aus Familie PAK_9 wurden jeweils homozygote *missense* Mutationen in zwei verschiedenen krankheitsrelevanten Genen gefunden, zum einen in *MAP3K20* (p.Leu16Ser) und zum anderen in *NEB* (p.Arg6177Cys).

MAP3K20 codiert für eine Serin/Threonin-Kinase, die an der Regulierung der Zellzyklus-Checkpoints sowie an der Einleitung von Zellzyklusarrest und Apoptose beteiligt ist. Pathogene *MAP3K20*-Mutationen können die Zentronukleäre Myopathie 6 (MIM# 617760) und die Spaltfuß-Fehlbildung mit mesoaxialer Polydaktylie (MIM# 616890) hervorrufen, die beide autosomal rezessiv vererbt werden. Die Zentronukleäre Myopathie 6 ist klinisch u.a. durch eine Scapula alata, proximale Kontrakturen, Hyperlordose und Skoliose, Muskelhypotonie, Muskelschwäche und -atrophie der proximalen und distalen Extremitäten, leichte Ermüdbarkeit, eine verzögerte motorische Entwicklung und Gehbeeinträchtigungen gekennzeichnet. Histologisch lassen sich im Muskelgewebe vor allem zentral lokalisierte Nuklei, Variationen der Fasergröße und ein Überwiegen von Typ 1-Fasern erkennen. Die

Erkrankung tritt meist im frühen Kindesalter in Erscheinung und verläuft langsam progressiv. In der HGMD-Datenbank sind bisher erst sieben krankheitsverursachende *MAP3K20*-Mutationen aufgeführt, darunter lediglich vier in Verbindung mit der Zentronukleären Myopathie 6.

NEB codiert für Nebulin, ein Protein des Zytoskeletts in Sarkomeren der Skelettmuskulatur. Pathogene *NEB*-Mutationen werden mit der Nemalin-Myopathie 2 (MIM# 256030) assoziiert. Die Nemalin-Myopathie 2 äußert sich insbesondere durch Muskelschwäche des Gesichts, des Halsbeugers, der proximalen Extremitäten und der Atemmuskulatur. Daneben zählen u.a. Brustkorbfehlbildungen, Gelenkkontrakturen und -deformationen, Hyperlordose und Skoliose, Gehbeeinträchtigungen, eine verzögerte motorische Entwicklung und schwache bzw. fehlende tiefe Sehnenreflexe zu den Symptomen. In einer Muskelbiopsie zeigen sich faden- und stäbchenförmige Strukturen, sogenannte *nemaline bodies*, die durch Ablagerung von Proteinen des Sarkomers entstehen. Der Schweregrad der Erkrankung variiert zwischen perinataler Letalität und moderaten Formen. Auch die Nemalin-Myopathie 2 tritt meist im Kindesalter in Erscheinung, nimmt jedoch wenn überhaupt nur einen langsam progressiven Verlauf. In der HGMD-Datenbank sind bereits 295 krankheitsverursachende *NEB*-Mutationen hinterlegt.

Auf den Fotos der betroffenen Geschwister lassen sich zumindest bei Patient IV.1 deutlich eine Skoliose, Scapulae alatae, eine Trichterbrust und atrophe Extremitäten erkennen. Klinisch lassen sich die Symptome nicht eindeutig einer der beiden oben genannten Erkrankungen zuordnen, wobei die Scapulae alatae vor allem für die Zentronukleäre Myopathie 6 bezeichnend sind. Weder die hier identifizierte *MAP3K20*- noch die *NEB*-Mutation ist in den großen Populationsdatenbanken im homozygoten Zustand aufgeführt. Für die genetische Analyse stand lediglich DNA von Patientin IV.2 und den Eltern zur Verfügung, über die Segregation lässt sich daher weder die *MAP3K20*- noch die *NEB*-Mutation ausschließen. Welche der beiden Mutationen letztendlich für den Phänotyp der Patienten verantwortlich ist, oder ob es sich um ein Zusammenspiel beider Varianten handelt, könnte über eine Muskelbiopsie und deren histopathologische Untersuchung ermittelt werden. Solche Überlagerungen zweier oder mehrerer Krankheitsbilder sind in konsanguinen Familien nicht selten, da die Wahrscheinlichkeit für das Aufeinandertreffen der gleichen rezessiven Mutation bei der Fortpflanzung von blutsverwandten Partnern viel höher ist, als bei nicht blutsverwandten Partnern (siehe Kapitel 7.1). Die molekulargenetische Analyse von Patienten aus konsanguinen Familien erfordert daher die sorgfältige Prüfung, ob eine identifizierte pathogene Mutation bereits das volle Symptomenspektrum des Patienten erklären kann oder nicht, insbesondere bei Fällen, wo der Phänotyp von vornherein keinem eindeutigen Krankheitsbild zugeordnet werden kann.

UROC1

In Familie PAK_11 wurde bei beiden betroffenen Kindern eine homozygote *missense* Mutation im Gen *UROC1* (p.Val199Ile) detektiert. *UROC1* codiert für das Enzym Urocanase, das am Abbau von Histidin beteiligt ist. Die Rolle von pathogenen *UROC1*-Mutationen bei der Entstehung der vorgeschlagenen klinischen Symptome des autosomal rezessiven

Urocanase-Mangels (MIM# 276880) ist in der Literatur umstritten. Urocanase-Mangel wurde in Verbindung mit Kleinwuchs, Intelligenzminderung, Ataxie, Tremor und Verhaltensauffälligkeiten (episodische Aggressionen und Zuneigungssuche) beschrieben (Kalafatic, Lipovac et al. 1980, Espinós, Pineda et al. 2009). Andere Studien wiederum berichten von klinisch unauffälligen Individuen mit nachgewiesenem Mangel des Enzyms (Glinton, Levy et al. 2019). Dieser Umstand könnte darauf hindeuten, dass zusätzliche *Modifier* für die Manifestation eines pathologischen Phänotyps verantwortlich sein könnten.

In der HGMD-Datenbank sind fünf krankheitsverursachende *UROC1*-Mutationen zu finden. Die bei den beiden Patientinnen aus Familie PAK_11 nachgewiesene Variante ist sehr selten (Allelfrequenz: 0,00001988) und in den großen Populationsdatenbanken nicht im homozygoten Zustand aufgeführt. Die klinische Beschreibung der untersuchten Patientinnen (Intelligenzminderung und ruckartiger Gang) könnte zu den Symptomen des Urocanase-Mangels passen. Ob es sich bei der identifizierten homozygoten *UROC1*-Mutation allerdings um die Ursache für die Erkrankung der beiden Schwestern handelt, sie nur ein *Modifier* ist oder sie nicht mit dem Phänotyp in Verbindung steht, kann aufgrund der unzureichenden Informationslage zurzeit nicht abschließend beurteilt werden.

SGCA

Bei zwei Patienten aus Familie PAK_14 wurde eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *missense* Mutation im Gen *SGCA* nachgewiesen (p.Leu66His). *SGCA* codiert für Sarcoglycan Alpha, ein Transmembranprotein, das in Zellen der quergestreiften Muskulatur als Bestandteil des Dystrophin-Glycoprotein-Komplexes das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbindet. Pathogene Mutationen in *SGCA* verursachen die autosomal rezessive Gliedergürteldystrophie 3 (MIM# 608099). Die Erkrankung setzt im Kindesalter ein und äußert sich in einer proximalen Muskelschwäche des Schulter- und Beckengürtels mit Gehbeeinträchtigungen. Zu den weiteren Symptomen zählen u.a. Scapula alata, Pseudohypertrophie der Waden und Kardiomyopathien. Kontrakturen der Achillessehne führen häufig zu einem Zehenspitzengang. Bei der Gliedergürteldystrophie 3 handelt es sich um eine progressive Erkrankung mit unterschiedlich starker Ausprägung unter den Patienten.

Die in Familie PAK_14 detektierte *SGCA*-Mutation betrifft eine hochkonservierte Aminosäure und wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft. In der HGMD-Datenbank sind bisher 113 krankheitsverursachende Mutationen gelistet, darunter auch zwei *missense* Mutationen (Ala64Thr; CM1814904 und Gly68Glu; CM951151), die jeweils nur zwei Positionen entfernte Aminosäuren von der bei Familie PAK_14 detektierten Variante betreffen. Aufgrund der nicht vorhandenen klinischen Beschreibung der Betroffenen und den wenig aussagekräftigen Fotos ist es schwierig zu beurteilen, ob die Gliedergürteldystrophie 3 zum Phänotyp der untersuchten Patienten passt. Bei dem den Fotos nach zu urteilen ältesten Betroffenen aus der Familie ist eine Fußfehlbildung zu erkennen, die eventuell durch eine starke Kontraktur der Achillessehne zu erklären sein könnte. Im Stammbaum der Familie sind mehrere Kinder in verschiedenen Familienzweigen als betroffen markiert. Die Geschwister IV.7 und IV.8

sind beide homozygote Träger der *SGCA*-Mutation, während ihr ebenfalls erkrankter Cousin (IV.5) zwei wildtypische Allele aufweist. Da jedoch nicht klar ist, woran die Patienten genau leiden und ob alle die gleichen Symptome aufweisen oder nicht, ist die hier identifizierte *SGCA*-Mutation als Krankheitsursache zumindest für die Patienten IV.7 und IV.8 nicht auszuschließen.

CAPN3

In Familie PAK_15 weisen zwei betroffene Brüder eine homozygote *missense* Mutation im Gen *CAPN3* auf (p.Thr232Ile). *CAPN3* codiert für ein im Zytosol von Zellen der Skelettmuskulatur lokalisiertes Protein aus der Familie der Calpaine, bei denen es sich um Calcium-abhängige, nicht-lysosomale Cystein-Proteasen handelt, die an Zellproliferation, -motilität und Apoptose beteiligt sind. Pathogene *CAPN3*-Mutationen werden sowohl mit einer autosomal dominanten (Typ 4; MIM# 618129), als auch mit einer autosomal rezessiven (Typ 1; MIM# 253600) Form der Gliedergürteldystrophie assoziiert. Die autosomal rezessive Gliedergürteldystrophie Typ 1 ist klinisch durch eine proximale Muskelschwäche und -atrophie im Schulter-, Rumpf- und Beckenbereich charakterisiert, die zu Gehbeeinträchtigungen führt. Weiterhin können Kontrakturen, faziale Muskelschwäche und eine Pseudohypertrophie der Waden auftreten. Die Erkrankung tritt früher in Erscheinung (häufig vor dem 15. Lebensjahr) und nimmt meist einen schwereren Verlauf als die autosomal dominante Form, die Patienten sind in der Regel ab der zweiten oder dritten Lebensdekade an einen Rollstuhl gebunden.

In der HGMD-Datenbank sind bisher 432 Krankheitsverursachende *CAPN3*-Mutationen beschrieben, darunter auch die bei den Patienten aus Familie PAK_15 detektierte Variante (CM990307). Die auf den Fotos der Patienten zu erahnenden Gehbeeinträchtigungen passen ins klinische Bild der autosomal rezessiven Gliedergürteldystrophie Typ 1. Somit handelt es sich bei der *CAPN3*-Mutation sehr wahrscheinlich um die Krankheitsursache der Betroffenen aus Familie PAK_15.

MTMR2

Bei vier zur Verfügung stehenden betroffenen Geschwistern aus Familie PAK_16 wurde eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *missense* Mutation im Gen *MTMR2* identifiziert (p.Thr108Met). *MTMR2* codiert für ein Protein aus der Myotubularin-Familie, zu denen verschiedene katalytisch aktive und inaktive Phosphatasen gehören. Pathogene *MTMR2*-Mutationen werden mit einer autosomal rezessiven Form der Charcot-Marie-Tooth (CMT) Erkrankung (Typ 4B1; MIM# 601382) assoziiert. Hierbei handelt es sich um eine periphere Neuropathie mit einem schweren klinischen Verlauf, die Patienten versterben meist in der vierten oder fünften Lebensdekade aufgrund von Atemkomplikationen. Klinisch manifestiert sich die Krankheit durch eine verzögerte motorische Entwicklung, Muskelschwäche und -atrophie, sensorische Beeinträchtigungen der distalen Extremitäten, faziale Muskelschwäche, Fußfehlbildungen wie *Talipes equinovarus* (Klumpfuß), Kontrakturen und Skoliose. Eine Behandlung kann gegenwärtig nur symptomatisch erfolgen und schließt u.a. physiotherapeutische, orthopädische und schmerztherapeutische Maßnahmen ein.

Die bei den Betroffenen aus Familie PAK_16 nachgewiesene Variante

(p.Thr108Met) betrifft eine hochkonservierte Aminosäure, liegt innerhalb der GRAM (*Glucosyltransferase, Rab-like GTPase Activator and Myotubularins*)-Domäne des Proteins und wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft. MTMR2 bindet u.a. über seine PH (pleckstrin homology)-GRAM-Domäne in der Zellmembran verankertes Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat und Phosphatidylinositol-3-phosphat (Berger, Schaffitzel et al. 2003). In der HGMD-Datenbank sind bisher 22 krankheitsverursachende *MTMR2*-Mutationen aufgeführt, darunter auch eine *missense* Mutation (Gly103Glu), die nur fünf Aminosäuren entfernt von der bei Familie PAK_16 detektierten Variante liegt und ebenfalls die GRAM-Domäne betrifft (CM013411). Aufgrund der Kleidung der Patienten auf den Fotos lassen sich etwaige Muskelatrophien nicht feststellen, jedoch zeigen die Patienten IV.3 und IV.6 deutlich Fußfehlbildungen und bei allen Betroffenen aus Familie PAK_16 sind Kontrakturen der Fingergelenke zu erkennen. Aufgrund der Einstufung durch die Vorhersageprogramme und der auf den Fotos zu erkennenden Symptome der Patienten kann sehr wahrscheinlich von einer pathologischen Relevanz der hier identifizierten *MTMR2*-Mutation ausgegangen werden.

GAN

In Familie PAK_18 wurde bei zwei betroffenen Kindern eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *missense* Mutation im Gen *GAN* nachgewiesen (p.Tyr61Cys). *GAN* codiert für Gigaxonin aus der BTB/Kelch-Protein-Superfamilie, das in die Bildung von Neurofilamenten involviert ist und bei der Ubiquitinierung und dem Abbau einiger Proteine eine Rolle spielt. Pathogene *GAN*-Mutationen verursachen die Riesenaxon-Neuropathie (MIM# 256850), eine autosomal rezessive neurodegenerative Erkrankung, die sowohl das periphere, als auch das zentrale Nervensystem betrifft. Zu den Symptomen zählen u.a. Kleinhirn- und Pyramidenbahnzeichen, Dysarthrie, spastische Paraplegie, Intelligenzminderung, Muskelschwäche und -atrophie, Hypo- oder Areflexie der Extremitäten, Gehbeeinträchtigungen, faziale Muskelschwäche, Nystagmus, sowie Hand- und Fußfehlbildungen. In einer peripheren Nervenbiopsie zeigen sich mikroskopisch die namensgebenden Riesen-Axone aus dichten Bündeln von Neurofilamenten. Die Erkrankung tritt im frühen Kindesalter in Erscheinung, verläuft langsam progressiv und führt meist in der späten Adoleszenz zum Tod.

Die in Familie PAK_18 detektierte *GAN*-Mutation betrifft eine hochkonservierte Aminosäure, liegt innerhalb der BTB (*BR-C, ttk and bab*)/POZ (*Pox virus and Zinc finger*)- und der Kelch-Domänen des Proteins und wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft. In der HGMD-Datenbank sind bisher 76 krankheitsverursachende *GAN*-Mutationen gelistet, darunter auch eine *missense* Mutation (Leu75His), die nur 15 Aminosäuren entfernt von der bei Familie PAK_18 detektierten Variante liegt (CM091594) und dieselben Protein-Domänen betrifft. Auf den Fotos der Betroffenen ist eine schwere Muskelatrophie der Extremitäten zu erkennen, zudem sind laut Stammbaum die drei ältesten der fünf betroffenen Kinder bereits verstorben. Bei der hier identifizierten *GAN*-Mutation handelt es sich deshalb sehr wahrscheinlich um die Krankheitsursache der Patienten aus Familie PAK_18.

ATM

Bei vier betroffenen Kindern aus Familie PAK_20 wurde eine homozygote *stop gained* Mutation im Gen *ATM* detektiert (p.Gln2002*). *ATM* codiert für ein Protein aus der Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen, das an der DNA-Schadensreparatur beteiligt ist. Pathogene *ATM*-Mutationen werden mit der Ataxia-Teleangiectasia (AT; MIM# 208900) und mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs (MIM# 114480) in Verbindung gebracht. Die AT wird autosomal rezessiv vererbt und geht u.a. mit einer zerebellären Ataxie, motorischen Auffälligkeiten, Teleangiektasien, progeroiden Haut- und Haarveränderungen, häufiger Sinusitis (Nasennebenhöhlenentzündung), Hypogonadismus, Immundefekten und einer Prädisposition für Neoplasien einher. Die Erkrankung tritt meist innerhalb der ersten Lebensjahre in Erscheinung, die Prognose ist u.a. aufgrund des erhöhten Krebsrisikos ungünstig, etwa 35% der Patienten weisen im Alter von 20 bereits ein Malignom auf (Orphanet). Eine Therapie erfolgt lediglich symptomatisch, da die Zellen der Patienten jedoch besonders sensibel gegenüber ionisierender Strahlung sind, können nicht alle Krebstherapien problemlos angewendet werden.

In der HGMD-Datenbank sind bisher 921 krankheitsverursachende *ATM*-Mutationen aufgeführt, 655 davon als Ursache für AT und darunter auch die bei Familie PAK_20 detektierte Mutation (CM044575). An lymphoblastoiden Zellen konnte bereits ein negativer Effekt der hier identifizierten Variante auf *ATM* mRNA- und Proteinlevel, auf die Überlebensrate der Zellen, sowie auf die Bildung von Mikronuklei nach Bestrahlung belegt werden (Fernet, Moullan et al. 2004, Gutiérrez-Enríquez, Fernet et al. 2004). Somit hat die bei Familie PAK_20 nachgewiesene *ATM*-Mutation sehr wahrscheinlich pathogene Auswirkungen. Da für die Patienten jedoch keine klinische Beschreibung vorlag und auch die Fotos nicht informativ waren, sollten phänotypische Übereinstimmungen mit der AT mit dem/r behandelnden Arzt/Ärztin abgeklärt werden.

GDAP1

In Familie PAK_21 wurde bei drei betroffenen Kindern eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *missense* Mutation im Gen *GDAP1* detektiert (p.Ser302Tyr). *GDAP1* codiert für ein integrales Membranprotein der Mitochondrien, das in den Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, vor allem in den Schwann-Zellen, exprimiert wird (Niemann, Ruegg et al. 2005). Pathogene *GDAP1*-Mutationen führen zu verschiedenen Formen der Charcot-Marie-Tooth (CMT) Erkrankung, die meist autosomal rezessiv, in einigen Fällen aber auch autosomal dominant vererbt werden (MIM# 607831, 607706, 608340, 214400). CMT zählt zu den häufigsten peripheren Neuropathien beim Menschen mit einer Prävalenz von etwa 1:2500 und kann durch Mutationen in über 80 verschiedenen Genen verursacht werden (Berger, Young et al. 2002, Stojkovic 2016). Die Gruppe der CMT-Erkrankungen ist charakterisiert durch das Zugrundegehen motorischer und sensorischer Neuronen, was sich in einer symmetrischen, langsam progressiven motorischen Neuropathie der Arme und Beine, distaler Muskelschwäche und -atrophie der Extremitäten, Fußfehlbildungen wie einem Hohlfuß (*Pes cavus*), Fingergelenkkontrakturen und sensorischen Beeinträchtigungen (auch sensorineuraler Hörstörung) äußern kann (Bird 2018). Die Erkrankung tritt meist innerhalb der ersten

drei Lebensdekaden in Erscheinung, die Diagnosestellung erfolgt nach eingehenden neurologischen Tests, Befragung zur Familienanamnese und ggf. genetischer Analyse. Therapiemaßnahmen beschränken sich auf eine symptomatische Behandlung durch ein multidisziplinäres Team aus Neurologen, Physiotherapeuten und Orthopäden (Bird 2018).

In der HGMD-Datenbank sind bisher 100 krankheitsverursachende *GDAP1*-Mutationen vermerkt. Die hier identifizierte Variante betrifft eine hochkonservierte Aminosäure, wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft und befindet sich innerhalb eines homozygoten Intervalls bei Patient IV.2. Aufgrund der Tatsache, dass die auf den Fotos der Patienten erkennbaren Symptome wie Fingergelenkkontraktionen und distale Muskelatrophie der Extremitäten ins klinische Bild des CMT-Spektrums passen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der nachgewiesenen *GDAP1*-Mutation sehr wahrscheinlich um die Krankheitsursache der drei betroffenen Kinder aus Familie PAK_21 handelt.

FBN1

Bei den beiden Patienten aus Familie PAK_23 wurde eine heterozygote *missense* Mutation im Gen *FBN1* detektiert (p.Glu1811Lys). *FBN1* codiert für eine Komponente der extrazellulären Mikrofibrillen, die wichtige Bestandteile des Bindegewebes darstellen. Pathogene *FBN1*-Mutationen können verschiedene autosomal dominante Fibrillinopathien hervorrufen (MIM# 102370, 129600, 614185, 616914, 604308, 184900, 608328), darunter auch das Marfan-Syndrom (MIM# 154700). Bei dem Marfan-Syndrom handelt es sich um eine klinisch und genetisch heterogene Bindegewebserkrankung, die vor allem das Skelett-, das okulare und das kardiovaskuläre System betrifft (McKusick 1972, Pyeritz and McKusick 1979, Royce and Steinmann 2003). Zu den Symptomen zählen u.a. ein disproportionierter Großwuchs, lange Extremitäten und Arachnodaktylie, Brustkorbfehlbildungen, Gelenküberbeweglichkeit, Wirbelsäulenfehlbildungen, ein hoher, schmaler Gaumenbogen mit Zahnengstand, Linsenluxation, früh auftretende Glaukome und Katarakte, sowie Fehlbildungen und Fehlfunktionen des Herzens und der Herzgefäße.

In der HGMD-Datenbank finden sich derzeit 2509 krankheitsverursachende *FBN1*-Mutationen, darunter auch die bei den Betroffenen aus Familie PAK_23 detektierte Variante (CM074812) in Verbindung mit dem Marfan-Syndrom. Comeglio, Johnson et al. (2007) detektierten eine heterozygote p.Glu1811Lys Mutation im *FBN1*-Gen bei einem Patienten mit der Diagnose Marfan-Syndrom, der u.a. Beeinträchtigungen bzw. Auffälligkeiten des Skelettsystems, des okularen und kardiovaskulären Systems, der Lungenfunktion und der Haut aufwies. Trotz der Bekleidung lassen sich bei Patient IV.3 aus Familie PAK_23 lange Extremitäten, eine Brustkorb- und eventuell auch Wirbelsäulenfehlbildung erahnen. Die ebenfalls betroffene Schwester (IV.2) zeigt eine Arachnodaktylie. Diese Symptome treten auch bei Marfan-Syndrom Patienten auf. Der gesunde Bruder (IV.1) sowie der gesunde Vater (III.1) der Patienten weisen jeweils zwei wildtypische Allele des entsprechenden Locus auf. Die im Stammbaum als nicht betroffen abgebildete Mutter (III.2) ist heterozygote Trägerin der *FBN1*-Mutation. Dies könnte durch eine unvollständige Penetranz, wie sie auch schon für andere *FBN1*-Mutationen

beschrieben wurde (Buoni, Zannolli et al. 2004, Zhang, Lai et al. 2015), oder durch variable intrafamiliäre Expression zu erklären sein, die bei *FBN1*-Mutationen oft beobachtet wird und von der Expression des wildtypischen Allels abhängig zu sein scheint (Hutchinson, Furger et al. 2003, Aubart, Gross et al. 2015). Auch zusätzliche, begünstigende *Modifier*-Mutationen bei der Mutter oder eine Fehlinformation im Stammbaum wären denkbar.

ATP7A

In Familie PAK_25 wurde bei einem betroffenen Patienten eine bisher noch nicht beschriebene hemizygot *missense* Mutation im Gen *ATP7A* detektiert (p.Tyr1410Asn). *ATP7A* codiert für ein Transmembranprotein, das im *trans*-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist und an der Sekretion von Kupferionen beteiligt ist (Vulpe, Levinson et al. 1993). Pathogene *ATP7A*-Mutationen werden mit drei X-chromosomal rezessiven Erkrankungen assoziiert, dem Menkes-Syndrom (MIM# 309400), dem Okzipitalhorn-Syndrom (MIM# 304150) und der Spinalen Muskelatrophie Typ 3 (MIM# 300489). Das Menkes-Syndrom ist eine schwere systemische Erkrankung und wird durch Störungen im Kupferstoffwechsel verursacht. Es geht mit einer progredienten Neurodegeneration, Beeinträchtigungen des Bindegewebes und schütterem, hypo- oder depigmentiertem Kopfhaar einher. Die Behandlung erfolgt symptomatisch, die Prognose ist jedoch schlecht. Meist versterben die Patienten im frühen Kindesalter. Bei dem Okzipitalhorn-Syndrom handelt es sich um eine mildere Form des Menkes-Syndroms. Betroffene zeigen häufig schon nach der Geburt eine schlaffe, faltige Haut, Nabel- oder Leistenhernien, Gelbsucht, Hypothermie und Muskelhypotonie. Zu den weiteren Symptomen zählen u.a. unkontrollierbare Diarrhöen, Blasendivertikel, rezidivierende Harnwegsinfektionen, motorische Entwicklungsverzögerung, Intelligenzminderung, ein schmaler Thorax und enge Schultern, Fehlbildungen der Wirbelsäule und/oder des Brustkorbs, Gelenküberbeweglichkeit und faziale Dysmorpohiezeichen wie ein langes Gesicht, eine hohe Stirn, abfallende Lidspalten, große Ohren, ein langes Philtrum und ein hoher Gaumenbogen. Haarform und -farbe sind im Gegensatz zum Menkes-Syndrom in der Regel nicht auffällig. Im Röntgenbild lassen sich knöcherne, nach unten gerichtete Exostosen am Hinterhauptbein erkennen, die der Erkrankung den Namen geben. Auch hier kann eine Behandlung nur symptomatisch erfolgen, die Prognose ist allerdings wesentlich besser als beim Menkes-Syndrom. Durch parenterale Supplementation von Kupfer-Histidin kann die Progredienz beider Erkrankungen ggf. verzögert werden.

In der HGMD-Datenbank sind bisher 352 krankheitsverursachende *ATP7A*-Mutationen aufgeführt, darunter auch eine *missense* Variante (Pro1413Arg, CM1111619), die eine von der in Familie PAK_25 detektierten Mutation nur drei Positionen entfernte Aminosäure betrifft und mit dem Menkes-Syndrom einhergeht. Zu den Patienten aus Familie PAK_25 lagen neben einer Intelligenzminderung und Brustkorbfehlbildung keine detaillierten klinischen Informationen vor, auch sind die Fotos der Betroffenen wenig aussagekräftig. Unklar ist zudem, ob die beiden Brüder (IV.2 und IV.3) den gleichen Phänotyp aufweisen. Die bei Patient IV.2 detektierte *ATP7A*-Mutation betrifft eine hochkonservierte Aminosäure und wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft, jedoch besitzt der ebenfalls als betroffen markierte Bruder (IV.3)

das entsprechende wildtypische X-chromosomale Allel. Aufgrund der unzureichenden Informationslage sollte ein Einfluss der identifizierten *ATP7A*-Mutation als Ursache oder Modulator für den Phänotyp von Patient IV.2 allerdings nicht ausgeschlossen werden.

7.3. Fälle mit Mutationen in neuen krankheitsrelevanten Genen oder Kandidatengen

SLC10A7

Anmerkung: Der hier vorgestellte Fall wurde bereits veröffentlicht in Nat Comm. 2018 Aug 6;9(1):3087.

In Familie IRN_5 wurde bei einem betroffenen Kind und einem betroffenen Fötus eine bisher noch nicht beschriebene homozygote *missense* Mutation im Gen *SLC10A7* identifiziert (p.Gly130Arg). *SLC10A7* enthält 12 Exons und codiert für einen 340 Aminosäuren umfassenden Transporter aus der Familie der *solute carrier* (SLC), der in der Plasmamembran verankert ist (Godoy, Fernandes et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden über das Online-Tool GeneMatcher (Sobreira, Schiettecatte et al. 2015) weitere Patienten mit homozygoten *SLC10A7*-Mutationen ausfindig gemacht. In Kollaboration mit den entsprechenden Wissenschaftlern konnte schließlich gezeigt werden, dass homozygote pathogene *SLC10A7*-Mutationen beim Menschen eine Skelettdysplasie mit Amelogenesis imperfecta (MIM# 618363) verursachen (Dubail, Huber et al. 2018). Die genaue Funktion und das Substrat von *SLC10A7* sind zwar noch nicht abschließend erforscht, Studien an Hefe und an Mäusen, sowie an Gewebe von Patienten mit *SLC10A7*-Mutationen deuten jedoch auf eine mögliche Rolle des Transporters bei der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase hin (Alber, Jiang et al. 2013, Zhao, Yan et al. 2016, Dubail, Huber et al. 2018).

Die untersuchten Patienten mit pathogenen Mutationen in *SLC10A7* zeigen einen komplexen Phänotyp aus prä- und postnatalem Kleinwuchs, Dislokation der großen Gelenke, vorzeitiger Ossifikation der Handwurzelknochen, Rohrzangen-ähnlicher Erscheinung des proximalen Femur in den ersten Lebensmonaten, Auffälligkeiten der Wirbelkörper, Genua valga, Hyperlordose und/oder Kyphoskoliose, kleinen Epiphysen, sowie hypomineralisierter Amelogenesis imperfecta. Zudem wurden unter den bisher sechs beschriebenen Patienten vereinzelt eine Mikrognathie, eine Pierre-Robin-Sequenz (Mikrognathie, Gaumenspalte und Glossoptosis), ein flaches Gesicht, eine Herzfehlbildung, Hörstörungen und Übergewicht beobachtet. *Slc10a7*^{-/-} Mäuse rekapitulieren zum größten Teil den Phänotyp der Patienten (Dubail, Huber et al. 2018).

In-situ-Hybridisierungen an Mäusen haben ergeben, dass *SLC10A7* mRNA ubiquitär exprimiert wird, vor allem aber im Knorpelgewebe, aus dem die Röhrenknochen hervorgehen, in den Wachstumsfugen, in den Zahnanlagen, in der Lunge und im sich entwickelnden Herzen (Dubail, Huber et al. 2018). Messungen des Glykosaminoglykan (GAG)-Gehalts in Knorpelextrakten von *Slc10a7*^{-/-} Mäusen sowie in Fibroblasten von Patienten mit pathogenen *SLC10A7*-Mutationen haben gezeigt, dass sich

zwar der Gesamtgehalt an GAG nicht zu dem von normalen Kontrollproben unterscheidet, bei den *Slc10a7*^{-/-} Mäusen und den Patienten-Fibroblasten jedoch der Gehalt an Heparansulfat, einem GAG, deutlich reduziert ist (Dubail, Huber et al. 2018). GAG-Ketten sind Bestandteile von Proteoglykanen, die als besonders stark glykosilierte Glykoproteine Komponenten der extrazellulären Matrix oder von Zelloberflächen darstellen und dort verschiedenste Funktionen übernehmen. Beispielsweise dienen Proteoglykane als Modulatoren von Signalmolekül-Gradienten, die eine wichtige Rolle bei der Knochenbildung und -entwicklung spielen (Koziel, Kunath et al. 2004, Cortes, Baria et al. 2009). Die GAG-Synthese wird an den *exit sites* des endoplasmatischen Retikulums (*endoplasmic reticulum exit sites*, ERES) initiiert und findet hauptsächlich am Golgi-Apparat statt, dessen korrekte Organisation im Hinblick auf Enzymgehalt, pH-Wert und Konzentration von Ionen wie Ca²⁺ Voraussetzung für eine ordnungsgemäße Glykosylierung und Sekretion der Proteoglykane ist (Porat and Elazar 2000, Prydz 2015). Pathogene *SLC10A7*-Mutationen könnten demnach eventuell die Ionen-Homöostase des Golgi-Apparats und damit die Proteoglykan-Synthese beeinträchtigen. Die in der Studie von Dubail, Huber et al. (2018) beobachtete reduzierte Anzahl an HS-Ketten in Knorpelgewebe von *Slc10a7*^{-/-} Mäusen deutet auf Fehler des initialen Schrittes der HS-Synthese hin. Eine kompensatorische Chondroitinsulfat (CS)-Synthese könnte zu einem Ungleichgewicht des Verhältnisses von HS- und CS-Proteoglykanen führen, das wiederum für Störungen in der Knochenbildung und -entwicklung verantwortlich sein könnte (Dubail, Huber et al. 2018).

Mutationen in Genen, die für die GAG-Synthese benötigt werden, führen zu verschiedenen Erkrankungen aus der Gruppe der Chondrodysplasien mit Gelenkluxationen, zu denen nun auch die *SLC10A7*-assoziierte Skelettdysplasie mit Amelogenesis imperfecta zählt. Dabei stellt der Zahnschmelz-Defekt ein für die *SLC10A7*-assoziierte Skelettdysplasie spezifisches Symptom in der Gruppe der Chondrodysplasien mit Gelenkluxationen dar. Während der Bildung des Zahnschmelzes lagern die Ameloblasten verstärkt Calcium ein. Mutationen in Genen, die für Ca²⁺-Transporter codieren, wurden bereits mit dem klinischen Bild der Amelogenesis imperfecta in Verbindung gebracht (Herzog, Reid et al. 2015), was die Hypothese von Dubail, Huber et al. (2018) bekräftigt, dass *SLC10A7* für die zelluläre Ca²⁺-Homöostase vonnöten sein könnte.

Bei *SLC10A7* handelt es sich also um ein neues Krankheitsgen, an dessen erstmaliger Beschreibung in Verbindung mit einem klinischen Phänotyp im Menschen die hier geleistete Analyse beteiligt war.

TBX4

Anmerkung: Der hier vorgestellte Fall wurde im Juli 2019 zur Veröffentlichung eingereicht.

Bei einem konsanguinen Paar, das sich für den induzierten Abort eines Fötus mit Aplasie der unteren Extremitäten entschieden hatte, wurde jeweils eine bisher noch nicht beschriebene heterozygote *missense* Mutation im Gen *TBX4* nachgewiesen (p.Tyr127Asn). *TBX4* gehört zu einer hochkonservierten Familie von Transkriptionsfaktoren, die alle eine DNA-bindende T-Box-Domäne aufweisen und während der embryonalen Entwicklung

wichtige Rollen bei der Organogenese spielen. Da *TBX4* haploinsuffizient ist, führen pathogene heterozygote Mutationen zum Syndrom der kleinen Patella (*Small Patella Syndrome*; SPS; MIM# 147891), welches vor allem die unteren Extremitäten und das Becken betrifft (Bongers, Duijf et al. 2004). Zu den Symptomen zählen u.a. eine Hypo- oder Aplasie der Patella (Kniescheibe), fehlende, verzögerte oder unregelmäßige Ossifikation der Scham- und Sitzbeinäste, infra-azetabuläre Kerben, Fußanomalien wie ein weiter Abstand zwischen der ersten und zweiten Zehe, ein verkürzter vierter und fünfter Strahl des Fußskeletts, Plattfüße (*Pes planus*), aber auch faziale Auffälligkeiten wie eine Gaumenspalte, Mikrogenie, eine flache Nase und prominente Stirn (Bongers, Van Bokhoven et al. 2001). Die phänotypischen Ausprägungen variieren jedoch zwischen den Patienten und sogar unter den Betroffenen innerhalb einer Familie und reichen von im Kindesalter einsetzenden Beeinträchtigungen bis hin zur völligen Beschwerdefreiheit im Alltag. Die Diagnose erfolgt mit Hilfe von Röntgenaufnahmen, Behandlungsmaßnahmen können chirurgische Eingriffe und schmerztherapeutische Unterstützung beinhalten. Aufgrund der hier nachgewiesenen heterozygoten *TBX4*-Mutation wurde das Paar sorgfältig klinisch untersucht, wobei bei beiden mehr oder weniger stark ausgeprägte Symptome des SPS beobachtet werden konnten. Die Frau zeigte eine unregelmäßige Ossifikation der Scham- und Sitzbeinäste, hypoplastische Patellae, einen großen Abstand zwischen den ersten und zweiten Zehen, sowie verkürzte vierte und fünfte Zehen. Der Mann wies dagegen nur den vergrößerten Abstand zwischen den ersten und zweiten Zehen auf.

In der Literatur wurden bislang keine homozygoten pathogenen *TBX4*-Mutationen im Menschen beschrieben. Auch hier wurde im Kontext der vorliegenden Arbeit jedoch wieder ein weiterer Fall mit Hilfe des Online-Tools GeneMatcher auffindig gemacht. In Kollaboration mit den entsprechenden Wissenschaftlern konnte gezeigt werden, dass homozygote pathogene *TBX4*-Mutationen im Menschen zu einer letalen posterioren Amelie mit Becken- und Lungenhypoplasie führen (Kariminejad, Szenker-Ravi, Lekszas et al., submitted). Studien an Mäusen und Hühnchen hatten bereits die Bedeutung von *Tbx4* bei der Entwicklung der unteren Extremitäten belegt (Rodriguez-Esteban, Tsukui et al. 1999, Naiche and Papaioannou 2003, Takeuchi, Koshiba-Takeuchi et al. 2003). Durch Experimente in der Maus konnte nachgewiesen werden, dass *Tbx4* für die Bildung der hinteren Extremitätenknospe mitverantwortlich ist, jedoch im späteren Verlauf keine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Extremitäten-Auswuchses spielt (Naiche and Papaioannou 2007). Dieser wird durch den positiven Fgf10/Fgf8 Feedback-Loop zwischen Mesenchym und der apikalen ektodermalen Randleiste angetrieben, der zwar zunächst von *Tbx4* und *Tbx5* initiiert wird, hiernach aber autark arbeitet (Papaioannou 2014). Der homozygote Funktionsverlust von *Tbx4* in Mäusen wirkt sich zudem aufgrund unzureichender Fusion zwischen Chorion und Allantois und daher fehlender Bildung von Nabelschnurblutgefäßen noch *in utero* letal aus (Naiche and Papaioannou 2003). Takeuchi, Koshiba-Takeuchi et al. (2003) konnten zeigen, dass die Expression eines dominant-negativen *Tbx4*-Moleküls im Bereich der unteren Extremitäten im Hühnchen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu einer Aplasie (frühe Expression) oder Dysplasie (späte Expression) der unteren Extremitäten, sowie zu Fehlbildungen des Beckens führt. Dieser Umstand verdeutlicht, dass die Effekte einer *Tbx4*-Inaktivierung

vom Zeitpunkt abhängen, zu dem sie auftritt.

Unter Berücksichtigung des hier vorgestellten Fallbeitrags konnten am Beispiel von zwei konsanguinen Familien aus dem Iran nun erstmalig zwei *TBX4*-Keimbahnmutationen (p.Tyr113* und p.Tyr127Asn) als Ursache für die Fehlbildungen der unteren Extremitäten, des Beckens und der Lunge von homozygot betroffenen Feten ausfindig gemacht werden (Kariminejad, Szenker-Ravi, Lekszas et al., submitted). Die jeweiligen Eltern wiesen als heterozygote Mutationsträger unterschiedlich stark ausgeprägte Symptome des SPS auf. Eine CRISPR/Cas9-vermittelte Deletion von *TBX4* in *Xenopus tropicalis* Embryonen führte zu drastischen Fehlbildungen der posterioren Extremitäten (Kariminejad, Szenker-Ravi, Lekszas et al., submitted). Von dem betroffenen Fötus aus Familie IRN_8 stand zwar kein Material für humangenetische Analysen zur Verfügung, jedoch betrifft die hier identifizierte *TBX4*-Mutation (p.Tyr127Asn) eine hochkonservierte Aminosäure innerhalb der DNA-bindenden Domäne des Proteins und wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft. Aufgrund der phänotypischen Auswirkungen der heterozygoten *TBX4*-Mutation beider Eltern sowie den Erkenntnissen aus der Literatur und der durch GeneMatcher ermittelten zusätzlichen Familie ist jedoch anzunehmen, dass bei dem abortierten Fötus aus Familie IRN_8 die nachgewiesene *TBX4*-Mutation im homozygoten Zustand für die Aplasie der unteren Extremitäten verantwortlich gewesen ist.

Kariminejad, Szenker-Ravi, Lekszas et al., submitted schlagen für den durch pathogene homozygote *TBX4*-Mutationen hervorgerufenen neuen Phänotyp den Namen PAPPASyndrom (*Posterior Amelia with Pelvis and Pulmonary hypoplasia*) vor.

MSGN1

In Familie IRN_14 wurde bei einem betroffenen Kind eine homozygote *missense* Mutation im Gen *MSGN1* identifiziert (p.Arg125Leu). *MSGN1* ist ein Transkriptionsfaktor mit einer *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Domäne und ist in die Formierung des paraxialen Mesoderms involviert (Saga, Hata et al. 1996, Saga, Hata et al. 1997, Yoon, Moon et al. 2000). Während der menschlichen Embryonalentwicklung entstehen bei der Gastrulation die drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm, aus denen im späteren Verlauf verschiedene Strukturen und Organe hervorgehen. Das intraembryonale Mesoderm gliedert sich in axiales, paraxiales und intermediäres Mesoderm sowie in das Seitenplattenmesoderm (laterales Mesoderm). Durch Segmentierung des paraxialen Mesoderms entlang des Neuralrohrs von rostral nach caudal entstehen die Somiten durch oszillierende Aktivierung verschiedener Gene und Signalwege (Palmeirim, Henrique et al. 1997, Forsberg, Crozet et al. 1998, Jiang, Smithers et al. 1998, McGrew, Dale et al. 1998, Aulehla and Johnson 1999, Pourquié 1999, Dale and Pourquié 2000). Die Somiten differenzieren sich wiederum in unterschiedliche Abschnitte, aus denen sich u.a. die Skelettmuskulatur des Rumpfes und der Extremitäten, das Rumpfskelett (Wirbelkörper und -bögen, Rippen) und Teile der Haut und der Gefäße im Rumpf formieren. Knochen- und Knorpelgewebe der Extremitäten entstehen dagegen dadurch, dass Zellen aus dem Seitenplattenmesoderm in das sogenannte Extremitätenfeld migrieren, wo sie proliferieren und die Extremitätenknospe bilden. Durch die Sekretion von Fibroblasten-

Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factor*; FGF) induzieren die Zellen des Seitenplattenmesoderms die Bildung der apikalen ektodemalen Randleiste aus oberhalb liegendem ektodermalem Gewebe, welche das Wachstum der Extremitätenknospe steuert.

Yoon, Moon et al. (2000) haben Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung untersucht, die nach homologer Rekombination kein funktionales pMsn1 besaßen. Homozygot betroffenen Versuchstieren fehlten alle Strukturen, die aus dem paraxialen Mesoderm des Rumpfes hervorgehen, darunter die Skelettmuskulatur, die Wirbelkörper und die Rippen. Neben einer vergrößerten Schwanzknospe konnte im Bereich zwischen den Vorder- und Hinterextremitäten zudem eine reduzierte Gewebemasse beobachtet werden, den wenigen 14,5 dpc (*days post coitum*; Tage nach Begattung) alten, homozygot mutierten Feten fehlte der Schwanz komplett. Als Grund für dieses Phänomen schlugen die Autoren eine trophische Funktion von pMsn1 für Zellen der Schwanzknospe vor. Während die Strukturen des Kopf- und Nackenbereiches sowie die Extremitäten normal entwickelt waren, zeigten sich die Somiten in der Nähe der Vorderextremitäten deutlich kleiner, einige Halswirbel fusioniert und dysplastisch (Yoon, Moon et al. 2000). Bei heterozygot betroffenen Mäusen konnten dagegen keine auffälligen Fehlbildungen beobachtet werden. Expressionsstudien legten nahe, dass pMesogenin1 die Expression von Genen des somitischen Oszillators beeinflusst und ein Masterregulator des *Notch/Delta*-Signalwegs darstellt, welcher eine wichtige Rolle bei der Somitogenese und Segmentierung spielt (Yoon and Wold). Des Weiteren konnte anhand von *animal cap assays* gezeigt werden, dass pMesogenin1 die Expression von T-Box-Genen induzieren kann, die u.a. an der Extremitätenbildung beteiligt sind (Yoon, Moon et al. 2000).

Die in Familie IRN_14 nachgewiesene *MSGN1*-Mutation ist äußerst selten (Allelfrequenz: 0,000008017) und in den großen Populationsdatenbanken bisher nicht im homozygoten Zustand aufgeführt. Sie wird von allen genutzten Vorhersageprogrammen als gravierend eingestuft, betrifft eine hoch konservierte Aminosäure und liegt innerhalb der bHLH-Domäne des Proteins. Die bei Patientin IV.1 beobachteten Fehlbildungen betreffen insbesondere die vorderen Extremitäten sowie das Becken und decken sich daher nicht mit denen der homozygot betroffenen Mäuse aus der Studie von Yoon, Moon et al. (2000). Allerdings handelt es sich bei der nachgewiesenen Mutation auch nicht um einen funktionellen Knockout des Proteins, daher könnten die Effekte je nach Konsequenz der identifizierten Mutation auf die Proteinfunktion von denen in den mutanten Mäusen abweichen. Denkbar wären zum einen Auswirkungen der *MSGN1*-Mutation auf die Expression von T-Box-Genen wie *TBX5*, das für die Entwicklung der vorderen Extremitäten eine essenzielle Rolle spielt, oder auf die von anderen beteiligten Genen. Zum anderen wäre vorstellbar, dass durch die Mutation ein Zellreservoir beeinträchtigt wird, das normalerweise die Extremitätenknospe speist, ähnlich wie es für die Schwanzknospe der mutanten Mäuse vorgeschlagen wurde (Yoon, Moon et al. 2000). Da bei der Patientin jedoch nicht nur eine bilaterale humero-radiale und radio-ulnare Synostose, sondern auch Anomalien des Schulter- und Beckengürtels mit Fibulahypoplasie vorliegen, scheint die gesuchte Mutation nicht nur Auswirkungen auf die Extremitätenbildung, sondern auf die Entwicklung mehrerer Knochenstrukturen zu haben, weshalb *MSGN1* als

Masterregulator während der Embryonalentwicklung, auch bei mangelhafter phänotypischer Deckungsgleichheit zwischen Patientin und Tiermodell, nicht ausgeschlossen werden sollte. Um eine mögliche pathologische Relevanz der nachgewiesenen *MSGN1*-Mutation sicher bestätigen oder ausschließen zu können, müsste die entsprechende Mutation in einen geeigneten Modellorganismus eingebracht werden. Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass Genmutationen bei Tieren nicht immer die gleichen phänotypischen Auswirkungen haben wie im Menschen.

MIA3 (TANGO1)

Anmerkung: Teilergebnisse des hier vorgestellten Falls wurden im September 2019 zur Veröffentlichung eingereicht.

Bei den vier betroffenen Kindern aus Familie BEL_1 wurde eine homozygote synonyme Variante im Gen *MIA3* detektiert (c.3621A>G; p.Arg1207=), die beide Eltern in heterozygotem Zustand aufweisen. Der Basenaustausch führt zwar zu keiner anderen Aminosäure an entsprechender Stelle, jedoch wurden von den genutzten Vorhersageprogrammen potenzielle Auswirkungen auf das Spleißen vorausgesagt. Die identifizierte Mutation liegt relativ mittig in Exon 8 des Transkripts NM_001324062.1. Laut verschiedenen, in Alamut inkorporierten Vorhersageprogrammen könnte durch den Basenaustausch ein neuer Spleißdonor entstehen (Abbildung 6.42A). Zudem wurde von EX-SKIP eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für ein Exon Skipping vorhergesagt, da die Konsensussequenz für das SR Protein SC35 verloren gehen könnte (Abbildung 6.42B). SR Proteine enthalten Repeats von Serin (S) und Arginin (R) und werden für das korrekte Spleißen benötigt.

Die identifizierte *MIA3*-Mutation führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einem Exon 8 Skipping während des prä-mRNA Spleißens

Um etwaige Auswirkungen der nachgewiesenen homozygoten *MIA3*-Mutation auf das Spleißen zu ermitteln, wurde zunächst eine *in-vitro*-Spleißanalyse mit Hilfe von Minigen-Konstrukten durchgeführt, da kein Patientenmaterial für eine RNA-Isolierung zur Verfügung stand. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Effekt der homozygoten *MIA3*-Mutation im Sinne eines Exon 8 Skippings in einem Großteil der cDNA-Moleküle, welches bei der wildtypischen Kontrolle nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 6.44). Zur Validierung der Ergebnisse der *in-vitro*-Spleißanalyse wurde Patientenmaterial für eine RNA-Isolierung und cDNA-Sequenzierung nachgefordert. Auch *in vivo* zeigte sich bei allen betroffenen Kindern sowie bei beiden Eltern ein zusätzliches, verkürztes *MIA3* Spleißprodukt, dem Exon 8 fehlte. Der Stärke der Gelbanden und der Peakhöhe in den Elektropherogrammen nach zu urteilen, schien bei den Patienten das Exon 8 geskippte Spleißprodukt das häufigere zu sein, während die Eltern mehr von dem normal gespleißten Molekül aufwiesen (Abbildung 6.45). Dieser Eindruck konnte durch qRT-PCR-Analysen bestätigt werden (Abbildung 6.47). Bei der untersuchten Familie zeigten sich jeweils drei Gelbanden der *MIA3* cDNA PCR-Produkte. Eine Sanger-Sequenzierung der einzelnen Amplikons nach Gelextraktion ergab für die zusätzliche, fragliche Gelbande eine Überlagerungssequenz aus normalem und Exon 8 geskipptem Spleißprodukt. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass die fragliche Gelbande sehr wahrscheinlich durch ein

Chimären-Molekül aus einem cDNA-Strang mit und einem ohne Exon 8 verursacht wird, bei dem die 22 überschüssigen Nukleotide des einen Stranges möglicherweise eine sterisch blockierende Formation bilden, die das Chimären-Molekül bei der Gelelektrophorese langsamer wandern lassen.

Durch die identifizierte *MIA3*-Mutation wird sehr wahrscheinlich ein *exon splice enhancer* beeinträchtigt

Die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus des Exon Skippings warf zunächst zwei Hypothesen auf. Zum einen könnte, wie durch ESEfinder vorhergesagt, durch die Mutation die Konsensussequenz (*exon splice enhancer*; ESE) für das SR Protein SC35 verloren gehen bzw. abgeschwächt werden. Somit könnte das Protein nicht mehr bzw. schlechter an die prä-mRNA binden, was sich auf das Spleißen auswirken könnte (Abbildung 7.2, Hypothese I). Zum anderen entsteht durch den Basenaustausch eine Konsensussequenz [UAGGGU] für den Spleißrepressor hnRNP A1, der für das fehlerhafte Spleißen verantwortlich sein könnte (Abbildung 7.2, Hypothese II). Um diese beiden Hypothesen zu überprüfen, wurden Morpholinos genutzt. Morpholinos sind *antisense* Oligonukleotide, die an die prä-mRNA binden und somit das Spleißen beeinflussen können. Für den Fall, dass durch die Mutation das SR Protein SC35 nicht mehr bzw. schlechter an die prä-mRNA binden kann, würde die Zugabe eines Exon 8-spezifischen Morpholinos dies auch in wildtypischen HeLa-Zellen verhindern, wodurch ein Exon Skipping künstlich induziert werden würde. Ist bei den Patienten dagegen die Entstehung einer Konsensussequenz für einen Spleißrepressor für das Exon Skipping verantwortlich, würde die Zugabe des Morpholinos zu wildtypischen Zellen keinen Einfluss auf das Spleißen haben. Bei Zellen, die die nachgewiesene *MIA3*-Mutation innerhalb eines Vektorkonstrukts tragen, würde der Morpholino allerdings das Binden des Spleißrepressors verhindern, wodurch der Effekt des Exon Skippings unterbunden werden würde und es zu einem normalen Spleißprodukt inklusive Exon 8 käme.

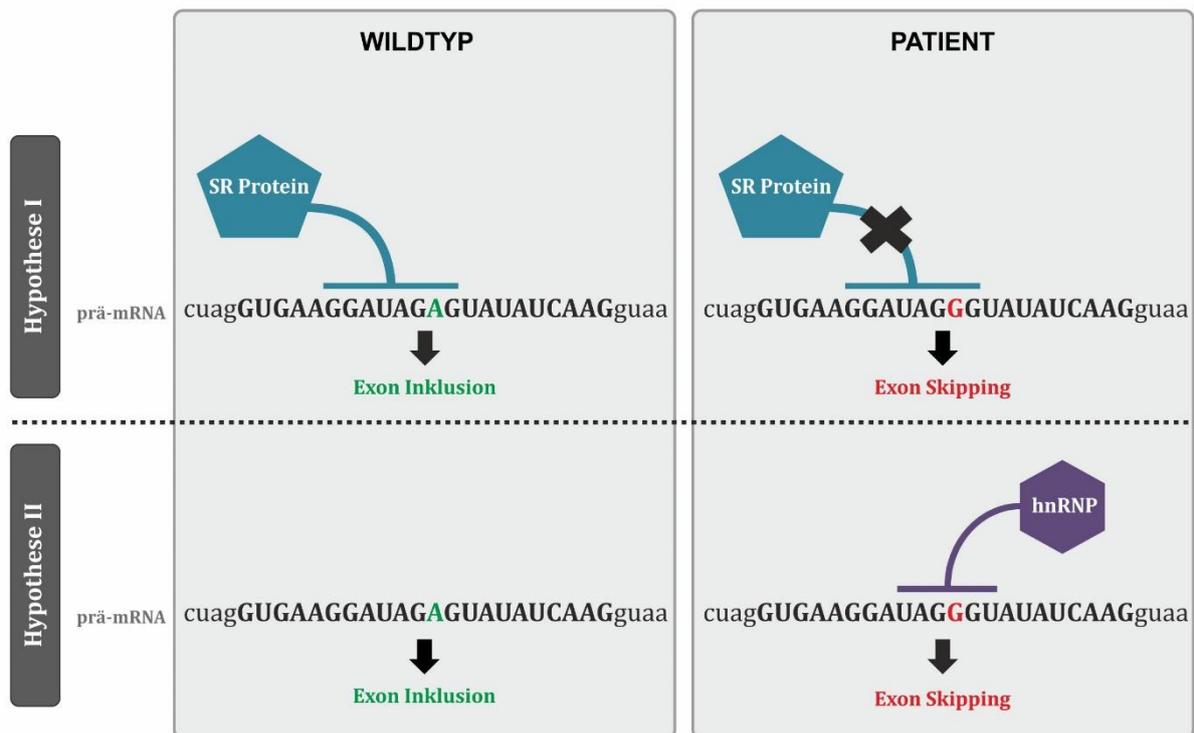


Abbildung 7.2: Hypothesen für den zugrunde liegenden Mechanismus des bei Familie BEL_1 beobachteten *MIA3* Exon 8 Skippings. Die identifizierte *MIA3*-Mutation könnte entweder einen ESE beeinträchtigen, wodurch das für das korrekte Spleißen notwendige SR Protein SC35 am Binden gehindert wird (Hypothese I). Oder aber die durch die Mutation entstehende Konsensussequenz [UAGGGU] für den Spleißrepressor hnRNP A1 verhindert die Integration des Exons 8 in die reife mRNA (Hypothese II).

Da sich bei den hier durchgeführten Experimenten ein Exon 8 Skipping bei Morpholino-behandelten wildtypischen HeLa-Zellen zeigte und keine Veränderung des Spleißens durch Zugabe des Morpholinos in Zellen mit mutiertem Vektor zu beobachten war, handelt es sich bei dem zugrunde liegenden Mechanismus sehr wahrscheinlich um eine durch die Mutation bedingte Abschwächung der Bindestelle von SC35, welches für ein korrektes Spleißen vonnöten wäre. Normalerweise werden Morpholinos, die das Spleißen beeinflussen sollen, so designt, dass sie die Bindestellen für snRNPs (*small nuclear ribonucleoprotein particles*) des Spleißosoms sterisch blockieren. Diese Bindestellen liegen meist in den Introns, nahe der Spleißdonor/-akzeptor-Grenzen. Der für diese Arbeit verwendete Morpholino enthielt jedoch nicht genügend Intronsequenzen, als dass er diesen Effekt erzielen würde. Nichtsdestotrotz kann ein sterischer Einfluss des Morpholinos auf das Spleißosom nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die Proteine der TANGO1-Familie

Bei *MIA3*, auch bekannt unter dem Namen *TANGO1*, für *Transport and Golgi organization protein 1*, handelt es sich um ein Transmembranprotein, das an den *exit sites* des endoplasmatischen Retikulums (*endoplasmic reticulum exit sites*, ERES) lokalisiert ist (Saito, Chen et al. 2009). *MIA3/TANGO1* ist in Metazoen hochkonserviert und im Menschen ubiquitär exprimiert. Das Gen umfasst 8142 bp, liegt auf dem langen Arm von Chromosom 1 (1q41) und codiert für zwei Isoformen, *TANGO1* und *TANGO1-Short*. *TANGO1* (Abbildung 7.3) besteht aus 1907 Aminosäuren und enthält eine im ER Lumen lokalisierte N-terminale Signalsequenz gefolgt von einer *Src-homology 3* (SH3)-like

Domäne und einer *coiled-coil* Domäne. Daran schließen sich eine Trans- und eine Intramembran-Domäne an. Der im Zytoplasma lokalisierte Teil des Proteins besteht aus zwei weiteren *coiled-coil* Domänen (CC1 und CC2) sowie einer C-terminalen Prolinreichen Domäne (PRD).

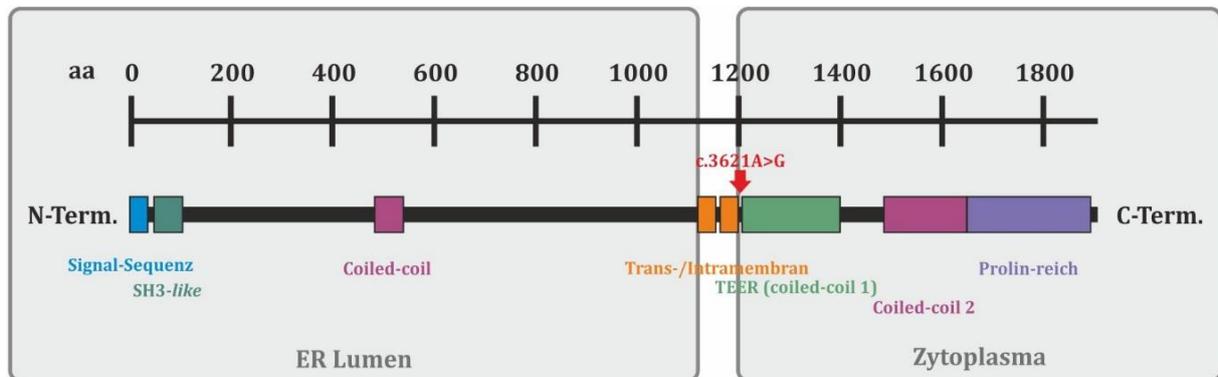


Abbildung 7.3: Aufbau des Transmembranproteins TANGO1 und Lokalisation der bei Familie BEL_1 identifizierten Mutation (c.3621A>G).

Das 785 Aminosäuren lange TANGO1-Short ist ähnlich aufgebaut wie TANGO1, ihm fehlt jedoch fast der gesamte im ER Lumen lokalisierte Teil und damit die SH3-like Domäne, welche für die Bindung an zu sekretierende Moleküle benötigt wird. cTAGE5, ein weiteres Protein aus der TANGO1-Familie, wird von einem Gen codiert, von dem man annimmt, dass es in der Entwicklung der Metazoen durch eine frühe Genduplikation von *MIA3/TANGO1* entstanden ist, dem *TANGO1-like protein (TALI)*. TANGO1, TANGO1-Short und cTAGE5 bilden u.a. stabile Multimer-Komplexe an den ERES und sind an der Sekretion großer Moleküle wie Prokollagenen, sowie den Vorstufen von Chylomikronen und *Very Low Density* Lipoproteinen (VLDLs) beteiligt (Bossert, Moser et al. 2003, Fromme and Schekman 2005, Saito, Chen et al. 2009, Malhotra and Erlmann 2011, Wilson, Phamluong et al. 2011, Malhotra and Erlmann 2015, Maeda, Saito et al. 2016, Santos, Nogueira et al. 2016).

Die Rolle von MIA3/TANGO1 bei der Kollagensekretion

Kollagene gehören zu den am meisten sekretierten Molekülen in Säugetieren und werden im gesamten Körper benötigt. Sie machen etwa 25% der Trockenmasse des Körpers aus und stellen einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) dar. Im ER Lumen trimerisieren Prokollagene zu starren, stäbchenförmigen Helices mit einem Durchmesser von bis zu 450 nm. Lange blieb deshalb unklar, über welchen Mechanismus Kollagene sekretiert werden, da die konventionellen COPII (*coat protein complex II*)-Vesikel für den anterograden Molekül-Transport vom ER zum *cis*-Golgi einen Durchmesser von nur 60-90 nm besitzen (Miller and Schekman 2013, Malhotra and Erlmann 2015). In den letzten Jahren wurde TANGO1 als Hauptakteur bei der Sekretion von großen, sperrigen Molekülen identifiziert (Fromme and Schekman 2005, Bard, Casano et al. 2006, Saito, Chen et al. 2009, Malhotra and Erlmann 2011, Malhotra and Erlmann 2011, Wilson, Phamluong et al. 2011, Malhotra and Erlmann 2015, Malhotra, Erlmann et al. 2015, Santos, Nogueira et al. 2016). TANGO1 bindet über seine SH3-like Domäne das Kollagen-spezifische Chaperon HSP47 (*heat shock protein 47*) im ER Lumen (Ishikawa, Ito et al. 2016), was die Affinität der PRD zum COPII-Mantelprotein Sec23 in

Sec23/24-Komplexen im Zytoplasma erhöht. TANGO1's CC1 Domäne rekrutiert daraufhin Membranen aus dem Bereich zwischen ER und Golgi-Apparat, dem *ER Golgi intermediate compartment* (ERGIC), weshalb die CC1 Domäne auch als TEER (*Tether of ERGIC at ER*) bezeichnet wird. Die rekrutierten Membranen fusionieren mit der entstehenden Vesikelknospe und stellen so zusätzliches Membranmaterial für die benötigten Riesen-Vesikel bereit (Santos, Raote et al. 2015). Dieser Prozess läuft so lange ab, bis die Kollagen-Trimere vollständig im Transportvesikel eingekapselt sind, woraufhin TANGO1 vom Kollagen dissoziiert und in der ER Membran verbleibt, während der Riesen-Vesikel in das ERGIC entlassen wird (Raote, Ortega Bellido et al. 2017). Obwohl TANGO1-Short die SH3-like Domäne und damit die Fähigkeit, Kollagene zu binden, fehlt, konnte gezeigt werden, dass TANGO1-Short die Rolle von TANGO1 bei der Kollagen-Sekretion vollständig ersetzen kann (Maeda, Saito et al. 2016). Es wurde postuliert, dass die Fähigkeit des zytoplasmatischen Anteils beider Proteine, Membranen aus dem ERGIC, Sec23 und cTAGE5 zu rekrutieren für die Formierung der Riesen-Vesikel ausreicht (Saito, Chen et al. 2009, Santos, Raote et al. 2015). Deshalb stellen Maeda, Saito et al. (2016) die Hypothese auf, dass die SH3-like Domäne von TANGO1 vielmehr für die Modulierung der Effizienz und/oder für die Kontrolle des Faltungszustands der zu sekretierenden Kollagene zuständig ist.

Während es etwa 40 000 TANGO1-Moleküle pro Zelle gibt, wird die Anzahl an ERES lediglich auf ein paar Hunderte geschätzt. Diese Diskrepanz kann durch die Entdeckung von Raote, Ortega Bellido et al. (2017) erklärt werden, dass TANGO1-Moleküle die entstehenden Riesen-Vesikel in Form eines Rings umgeben. Dies impliziert, dass etwa 100-200 Kollagene pro Riesen-Vesikel transportiert werden können, wenngleich die genaue Anzahl an Kollagen-Trimeren sowie die Zusammensetzung der transportierten Moleküle innerhalb eines Riesen-Vesikels noch nicht erforscht sind (Santos, Raote et al. 2015, Raote, Ortega Bellido et al. 2017).

Um potenzielle Auswirkungen der in Familie BEL_1 detektierten *MIA3/TANGO1*-Mutation auf die Kollagensekretion zu ermitteln, wurde von Kollaborationspartnern eine stabile U2OS-Zelllinie herangezogen, welche neben dem endogenen intakten *MIA3/TANGO1* auch das trunkierte Molekül über einen eingeschleuften Vektor exprimierte. Mit Hilfe von Western Blots konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des trunkierten *MIA3/TANGO1*-Moleküls, sogar in Anwesenheit des intakten *MIA3/TANGO1*-Moleküls, zu einer Reduzierung an intrazellulärem und sekretiertem Kollagen I führt (Lekszas, Foresti, Raote et al., *submitted*). Denkbar wäre deshalb ein negativer Effekt des trunkierten Proteins auf die intakten TANGO1-Moleküle oder andere an der Kollagenfaltung und -sekretion beteiligten Komponenten wie HSP47.

Potenzielle phänotypische Auswirkungen der identifizierten *MIA3/TANGO1*-Mutation *Tango1*^{-/-} Mäuse weisen einen globalen Kollagen-Sekretionsdefekt auf, der sich u.a. in Kleinwuchs mit kurzen Extremitäten, sowie beeinträchtigter Chondrozyten-Reifung und Knochenineralisierung mit perinataler Letalität manifestiert (Wilson, Phamluong et al. 2011). Trotz TANGO1's essenzieller Rolle bei der Sekretion von Kollagenen und des in *Tango1*^{-/-} Mäusen beobachteten komplexen Phänotyps, wurden bisher keine TANGO1-assoziierten Erkrankungen im Menschen beschrieben. Das in Familie BEL_1

nachgewiesene *MIA3/TANGO1* Exon 8 Skipping führt zu einer Verschiebung des Leserasters in der reifen mRNA, was aufgrund eines vorzeitigen Stop-Codons sehr wahrscheinlich in einem trunkierten Protein resultiert, dem fast der gesamte zytoplasmatische Teil fehlt. Das betroffene Exon ist auch in der Isoform TANGO1-Short als Exon 3 vorhanden. Auch hier entsteht durch das Wegfallen des Exons ein vorzeitiges Stop-Codon. Ob die daraus hervorgehende mRNA dem *nonsense-mediated mRNA decay* zugeführt wird oder ein trunkiertes Protein mit 90 Aminosäuren entsteht, müsste noch experimentell geprüft werden. Da die identifizierte Mutation aber sehr wahrscheinlich zum Verlust entscheidender Funktionen sowohl von TANGO1, als auch von TANGO1-Short führt, wird TANGO1-Short TANGO1 bei der Formierung der Riesen-Vesikel nicht ersetzen können.

Der Phänotyp der Patienten aus Familie BEL_1 legt den Verdacht nahe, dass TANGO1 neben der Sekretion von Kollagenen auch am anterograden Transport weiterer Moleküle wie Insulin (Diabetes mellitus) oder anderer Hormone (früh einsetzende Pubertät) beteiligt ist. Fan, Wang et al. (2017) konnten nachweisen, dass der Knockout von cTAGE5 in den β -Zellen des Pankreas von Mäusen zu einer veränderten Struktur der Langerhans'schen Inseln, reduzierter Insulinsekretion und einer schweren Glukoseintoleranz führt. Da cTAGE5 und TANGO1 einander binden, interagieren und die betroffenen Kinder aus Familie BEL_1 alle eine milde Form von Diabetes mellitus aufgrund unzureichender Insulinsekretion zeigen, wäre es hochinteressant, TANGO1's Rolle bei der Insulinsekretion experimentell näher zu beleuchten.

Überlegungen zur Dosissensitivität von *MIA3/TANGO1*

In den großen Populationsdatenbanken wie ExAC oder gnomAD sind keine homozygoten *loss-of-function* Mutationsträger zu *MIA3/TANGO1* aufgeführt. In Anbetracht der Tatsache, dass homozygote *Tango1* Knockout Mäuse kurz nach der Geburt versterben, könnten demnach auch beim Menschen letale Auswirkungen eines homozygoten Funktionsverlusts von TANGO1 anzunehmen sein. Eventuell könnten bei den betroffenen Kindern aus Familie BEL_1 die wenigen korrekt gespleißten Moleküle und die daraus resultierenden intakten Proteine ein Überleben ermöglicht haben. Daraus ergibt sich die Frage, welche Menge an funktionsfähigem TANGO1 benötigt wird, um ein Überleben oder auch Symptomfreiheit zu gewährleisten. Beide Eltern sind heterozygote Träger der identifizierten Mutation und weisen ebenfalls weniger korrekt gespleißte mRNA Moleküle auf, als die gesunde Kontrolle (Abbildung 6.47). Laut Kollaborationspartnern zeigen sie allerdings keine klinischen Symptome, besitzen aber auch mehr korrekt gespleißte Moleküle als die homozygot betroffenen Kinder. Diese Beobachtung könnte ein Schwellenwertmodell implizieren, bei dem ein kritisches Verhältnis von normal gespleißten Molekülen zu solchen, denen Exon 8 fehlt, nicht überschritten werden darf.

Die Identifizierung von *MIA3/TANGO1* als krankheitsverursachendes Gen in der hier vorgestellten Familie legt den Grundstein für zukünftige Fragestellungen im Zusammenhang mit TANGO1's Rolle bei der Sekretion verschiedenster Moleküle und verdeutlicht die Bedeutung einzelner Schlüsselproteine bei der Komplexität des menschlichen Körpers. Es handelt sich um den erstmaligen Nachweis einer klinischen Relevanz von *MIA3/TANGO1* im Menschen.

7.4. Ausblick

Mit Hilfe von WES konnten im Rahmen dieser Arbeit in ~51% der untersuchten Familien Mutationen in Genen aufgespürt werden, die sehr wahrscheinlich die Krankheitsursache der Patienten darstellen. Unter den 22 aufgeklärten Fällen wurden drei neue krankheitsrelevante Gene (*SLC10A7*, *TBX4*, *MIA3/TANGO1*) sowie ein potenzielles Kandidatengen (*MSGN1*) ermittelt, was den Nutzen von WES bei der Suche nach neuen krankheitsrelevanten Genen im Menschen unterstreicht. Weitere funktionelle Studien werden nötig sein, um die physiologische Funktion, Interaktionsnetzwerke und ggf. auch die pathologische Relevanz der entsprechenden Genprodukte näher charakterisieren zu können. Hierbei wären insbesondere das spezifische Substrat von *SLC10A7*, die Vielzahl der von *MIA3/TANGO1* sekretierten Moleküle und die Funktion des Proteins bei der Insulinsekretion im Hinblick auf Diabetes mellitus, sowie funktionelle Konsequenzen der identifizierten *MSGN1*-Mutation im Menschen näher zu ergründen.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse verdeutlichen, dass die internationale Vernetzung über Online-Plattformen wie GeneMatcher eine effiziente Strategie darstellt, die pathologische Relevanz neu identifizierter, potenziell krankheitsrelevanter Gene im Menschen nachzuweisen. Das Online-Tool GeneMatcher (<https://www.genematcher.org/>) ermöglicht einen schnellen Austausch zwischen Wissenschaftlern auf der ganzen Welt zu Sequenzvarianten in gemeinsam untersuchten Genen, den Abgleich phänotypischer Merkmale der dazugehörigen Patienten und die gezielte Priorisierung vielversprechender Kandidaten. So können selbst für sehr seltene Erkrankungen ausreichend Fälle zusammengetragen und individuelle Kompetenzen der einzelnen Labors vereint werden, um eine pathologische Relevanz eines entsprechenden Gens untermauern zu können. Zudem zeigen die in dieser Arbeit erzielten Aufklärungsraten, dass eine WES ohne detaillierte klinische Beschreibung durchaus zur Diagnose führen kann. Ein Anhaltspunkt zum Phänotyp der untersuchten Patienten sollte in einem solchen Fall jedoch mindestens über aussagekräftige Bilder gegeben sein. Zusätzlich sollte nach Möglichkeit ein Stammbaum der untersuchten Familie vorliegen, der Rückschlüsse auf den möglichen Erbgang erlaubt. In der vorliegenden Arbeit konnte bei schlechter klinischer Beschreibung der Patienten vor allem von der Konsanguinität der analysierten Familien profitiert werden (siehe Kapitel 7.1). Nichtsdestotrotz bleibt die Krankheitsursache in ~49% der untersuchten Fälle ungeklärt. Mögliche Gründe hierfür könnten pathogene Mutationen in bei der WES nicht abgedeckten Regionen, Kopiezahlvariationen, strukturelle Umbauten im Genom mit pathologischen Konsequenzen, di-/oligo-/polygen bedingte oder durch *Modifier* beeinflusste Erkrankungen, exogene Krankheitsursachen, sowie Mutationen sein, die auf den ersten Blick nicht relevant erscheinen und deshalb bei der Analyse aufgrund der zu bewältigenden Variantenzahl nicht berücksichtigt werden.

Derzeit geht man davon aus, dass das menschliche Genom etwa 20 000-25 000 proteincodierende Gene enthält (Consortium 2004). Dr. Victor A. McKusick etablierte in den 1990er Jahren eine bis heute kuratierte Online-Datenbank, die sich mit genetisch bedingten Erkrankungen im Menschen befasst, die Online Mendelian Inheritance in Man

(OMIM)-Datenbank. In dieser öffentlich zugänglichen Online-Datenbank sind aktuell 4132 Gene gelistet, die mit einem pathologischen Phänotyp assoziiert werden. Für 1558 beschriebene Phänotypen konnte die genetische Ursache allerdings noch nicht ausfindig gemacht werden (Stand: 31.07.2019). Diese Zahlen legen die Notwendigkeit neuer Analysestrategien nahe. Im Vergleich zur WES bietet die Genomsequenzierung (*Whole Genome Sequencing*; WGS) einige Vorteile. Durch die Sequenzierung des gesamten Genoms können nicht nur pathogene Varianten außerhalb der codierenden Bereiche, wie Promotor- und Enhancerregionen, sondern auch strukturelle Umbauten innerhalb des Genoms wie große Inversionen oder Translokationen detektiert werden. Zudem bietet die WGS eine einheitlichere Abdeckung, auch von proteincodierenden und GC-reichen Regionen, die beim Anreicherungs- und Amplifikationsprozess im Rahmen einer WES vernachlässigt werden können (Kozarewa, Ning et al. 2009, Xu, Jiang et al. 2011, Veal, Freeman et al. 2012, Bodi, Perera et al. 2013, Chilamakuri, Lorenz et al. 2014, Robert, Fuentes-Utrilla et al. 2014, Warr, Robert et al. 2015). Der große Nachteil der WGS gegenüber der WES ist neben den höheren Kosten allerdings die Generierung immenser Datenmengen, die hohe Computer-Rechenleistungen und große Speicherkapazitäten erfordern. Da die genomischen Bereiche außerhalb der proteincodierenden Regionen weniger stark konserviert und damit variabler sind, werden bei der WGS auch enorme Mengen an Sequenzvarianten detektiert (*gcallt*), die es zu analysieren und einzuordnen gilt. Der Einfluss von Varianten in nichtcodierenden Regionen ist derzeit aber noch nicht gut verstanden, weshalb seine Bewertung eine große Herausforderung darstellt (Mu, Lu et al. 2011, Maurano, Humbert et al. 2012, Ward and Kellis 2012, Warr, Robert et al. 2015). Je mehr solcher nichtcodierender Sequenzvarianten jedoch analysiert und annotiert werden, desto mehr Erkenntnisse können in Bezug auf deren Interpretation gewonnen werden (Consortium 2012, Ward and Kellis 2012, Andersson, Gebhard et al. 2014, Consortium 2014). Eine Weiterentwicklung der Analysestrategien setzt demnach die Generierung von WGS-Daten voraus. Beide Sequenzieretechnologien hängen von der korrekten Annotation des zur Verfügung stehenden Referenzgenoms ab. Durch das Mapping von *Reads* an eine fehlerhafte Referenz werden mehr falsch-positive Varianten *gcallt*. Dadurch sind stringenter Filtereinstellungen nötig, was wiederum das Risiko erhöht, dass wichtige Varianten bei der Analyse aus dem Fokus geraten (Warr, Robert et al. 2015). Zurzeit ist die WES noch eine nützliche Methode, um Sequenzvarianten innerhalb proteincodierender Bereiche kostengünstig zu detektieren, wobei auch die Möglichkeit besteht, gezielt zusätzliche regulatorische bzw. nichtcodierende Bereiche in die Anreicherung und Analyse einzuschließen. Zudem gestaltet sich das Datenmanagement wesentlich unkomplizierter als bei der WGS. Mit sinkenden Kosten, der Entwicklung einer entsprechenden IT-Infrastruktur und Analysestrategien für die WGS wird diese in den kommenden Jahren jedoch sicherlich eine immer wichtigere Rolle einnehmen. Zudem wird mit der Weiterentwicklung des maschinellen Lernens die Suche nach *Modifiern* und polygen bedingten Krankheitsursachen enorm erleichtert werden.

NGS-basierte Sequenzieretechniken und computergestützte Analysen haben die (human-) genetische Forschung und Diagnostik demnach zu schnelllebigen Disziplinen gemacht und werden in den kommenden Jahren weiterhin einen rasanten Erkenntnisgewinn ermöglichen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Alber, J., et al. (2013). "CaRch1p does not functionally interact with the high-affinity Ca²⁺ influx system (HACS) of *Candida albicans*." *Yeast* **30**(11): 449-457.

Alfares, A., et al. (2017). "A multicenter clinical exome study in unselected cohorts from a consanguineous population of Saudi Arabia demonstrated a high diagnostic yield." *Molecular genetics and metabolism* **121**(2): 91-95.

Andersson, R., et al. (2014). "An atlas of active enhancers across human cell types and tissues." *Nature* **507**(7493): 455.

Aubart, M., et al. (2015). "The clinical presentation of Marfan syndrome is modulated by expression of wild-type FBN1 allele." *Human molecular genetics* **24**(10): 2764-2770.

Aulehla, A. and R. L. Johnson (1999). "Dynamic Expression of *Notch* Signaling Suggests a Link between *Notch* Signaling and an Autonomous Cellular Oscillator Driving Somite Segmentation." *Developmental biology* **207**(1): 49-61.

Baeurle, S., et al. (2009). "Effect of the counterion behavior on the frictional-compressive properties of chondroitin sulfate solutions." *Polymer* **50**(7): 1805-1813.

Bard, F., et al. (2006). "Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization." *Nature* **439**(7076): 604.

Below, J. E., et al. (2013). "Whole-genome analysis reveals that mutations in inositol polyphosphate phosphatase-like 1 cause opsismodysplasia." *The American Journal of Human Genetics* **92**(1): 137-143.

Berger, P., et al. (2003). "Membrane association of myotubularin-related protein 2 is mediated by a pleckstrin homology-GRAM domain and a coiled-coil dimerization module." *Proceedings of the national academy of sciences* **100**(21): 12177-12182.

Berger, P., et al. (2002). "Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease." *Neurogenetics* **4**(1): 1-15.

Bird, T. D. (2018). Charcot-Marie-Tooth (CMT) hereditary neuropathy overview. *GeneReviews*@[Internet], University of Washington, Seattle.

Bittles, A. H., et al. (1993). "Consanguinity as a determinant of reproductive behaviour and mortality in Pakistan." *International journal of epidemiology* **22**(3): 463-467.

Bodi, K., et al. (2013). "Comparison of commercially available target enrichment methods for next-generation sequencing." *Journal of biomolecular techniques: JBT* **24**(2): 73.

Bonafe, L., et al. (2015). "Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision." American journal of medical genetics Part A **167**(12): 2869-2892.

Bongers, E. M., et al. (2004). "Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome." The American Journal of Human Genetics **74**(6): 1239-1248.

Bongers, E. M., et al. (2001). "The small patella syndrome: Description of five cases from three families and examination of possible allelism with familial patella aplasia-hypoplasia and nail-patella syndrome." Journal of medical genetics **38**(3): 209-214.

Bosserhoff, A. K., et al. (2003). "Specific expression and regulation of the new melanoma inhibitory activity-related gene MIA2 in hepatocytes." Journal of Biological Chemistry **278**(17): 15225-15231.

Bras, J. M. and A. B. Singleton (2011). "Exome sequencing in Parkinson's disease." Clinical genetics **80**(2): 104-109.

Buoni, S., et al. (2004). "The FBN1 (R2726W) mutation is not fully penetrant." Annals of human genetics **68**(6): 633-638.

Burn, T. C., et al. (1995). "Increased exon-trapping efficiency through modifications to the pSPL3 splicing vector." Gene **161**(2): 183-187.

Chang, W.-L., et al. (2016). "Exome sequencing in mostly consanguineous Arab families with neurologic disease provides a high potential molecular diagnosis rate." BMC medical genomics **9**(1): 42.

Chen, C., et al. (2016). "Skeleton Genetics: a comprehensive database for genes and mutations related to genetic skeletal disorders." Database **2016**.

Chilamakuri, C. S. R., et al. (2014). "Performance comparison of four exome capture systems for deep sequencing." BMC genomics **15**(1): 449.

Comeglio, P., et al. (2007). "The importance of mutation detection in Marfan syndrome and Marfan-related disorders: report of 193 FBN1 mutations." Human mutation **28**(9): 928-928.

Consortium, E. P. (2012). "An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome." Nature **489**(7414): 57.

Consortium, F. (2014). "A promoter-level mammalian expression atlas." Nature **507**(7493): 462.

Consortium, I. H. G. S. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." Nature **431**(7011): 931.

- Cortes, M., et al. (2009). "Sulfation of chondroitin sulfate proteoglycans is necessary for proper Indian hedgehog signaling in the developing growth plate." Development **136**(10): 1697-1706.
- Dale, K. J. and O. Pourquié (2000). "A clock-work somite." Bioessays **22**(1): 72-83.
- De Ingeniis, J., et al. (2012). "Functional specialization in proline biosynthesis of melanoma." PLoS one **7**(9): e45190.
- Dighe, M., et al. (2008). "Fetal skeletal dysplasia: an approach to diagnosis with illustrative cases." Radiographics **28**(4): 1061-1077.
- Dubail, J., et al. (2018). "SLC10A7 mutations cause a skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta mediated by GAG biosynthesis defects." Nature communications **9**(1): 3087.
- Eldomery, M. K., et al. (2017). "Lessons learned from additional research analyses of unsolved clinical exome cases." Genome medicine **9**(1): 26.
- Espinós, C., et al. (2009). "Mutations in the urocanase gene UROC1 are associated with urocanic aciduria." Journal of medical genetics **46**(6): 407-411.
- Fan, J., et al. (2017). "cTAGE5 deletion in pancreatic β cells impairs proinsulin trafficking and insulin biogenesis in mice." J Cell Biol **216**(12): 4153-4164.
- Fareed, M., et al. (2017). "Impact of consanguineous marriages and degrees of inbreeding on fertility, child mortality, secondary sex ratio, selection intensity, and genetic load: a cross-sectional study from Northern India." Pediatric research **81**(1-1): 18.
- Fernet, M., et al. (2004). "Cellular responses to ionising radiation of AT heterozygotes: differences between missense and truncating mutation carriers." British journal of cancer **90**(4): 866.
- Forsberg, H., et al. (1998). "Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation." Current biology **8**(18): 1027-1030.
- Frederick, J. P., et al. (2008). "A role for a lithium-inhibited Golgi nucleotidase in skeletal development and sulfation." Proceedings of the national academy of sciences **105**(33): 11605-11612.
- Fromme, J. C. and R. Schekman (2005). "COPII-coated vesicles: flexible enough for large cargo?" Current opinion in cell biology **17**(4): 345-352.
- Geister, K. A. and S. A. Camper (2015). "Advances in skeletal dysplasia genetics." Annual review of genomics and human genetics **16**: 199-227.

Glinton, K. E., et al. (2019). "Untargeted metabolomics identifies unique though benign biochemical changes in patients with pathogenic variants in UROC1." Molecular genetics and metabolism reports **18**: 14-18.

Godoy, J. R., et al. (2007). "Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria." European journal of cell biology **86**(8): 445-460.

Grossmann, V., et al. (2011). "Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype." Blood **118**(23): 6153-6163.

Gutiérrez-Enríquez, S., et al. (2004). "Functional consequences of ATM sequence variants for chromosomal radiosensitivity." Genes, Chromosomes and Cancer **40**(2): 109-119.

Hall, B. K. and T. Miyake (2000). "All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development." Bioessays **22**(2): 138-147.

Hanewinckel, R., et al. (2016). "The epidemiology and risk factors of chronic polyneuropathy." European journal of epidemiology **31**(1): 5-20.

Herzog, C. R., et al. (2015). "Hypomaturation amelogenesis imperfecta caused by a novel SLC24A4 mutation." Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology **119**(2): e77-e81.

Huber, C., et al. (2013). "Exome sequencing identifies INPPL1 mutations as a cause of opsismodysplasia." The American Journal of Human Genetics **92**(1): 144-149.

Hutchinson, S., et al. (2003). "Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: a potential modifier of phenotype?" Human molecular genetics **12**(18): 2269-2276.

Iglesias, A., et al. (2014). "The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice." Genetics in Medicine **16**(12): 922.

Ishikawa, Y., et al. (2016). "Intracellular mechanisms of molecular recognition and sorting for transport of large extracellular matrix molecules." Proceedings of the national academy of sciences **113**(41): E6036-E6044.

Jiang, Y.-J., et al. (1998). "Vertebrate segmentation: the clock is linked to Notch signalling." Current biology **8**(24): R868-R871.

Kalafatic, Z., et al. (1980). "A liver urocanase deficiency." Metabolism **29**(11): 1013-1019.

- Kapurubandara, S., et al. (2016). "Consanguinity and associated perinatal outcomes, including stillbirth." Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology **56**(6): 599-604.
- Karsenty, G., et al. (2009). "Genetic control of bone formation." Annual Review of Cell and Developmental **25**: 629-648.
- Kim, Y.-S., et al. (2008). "Predisposition of genetic disease by modestly decreased expression of GCH1 mutant allele." Experimental & molecular medicine **40**(3): 271.
- Kozarewa, I., et al. (2009). "Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+ C)-biased genomes." Nature methods **6**(4): 291.
- Koziel, L., et al. (2004). "Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification." Developmental cell **6**(6): 801-813.
- Krakow, D. and D. L. Rimoin (2010). "The skeletal dysplasias." Genetics in Medicine **12**(6): 327.
- Kronenberg, H. M. (2003). "Developmental regulation of the growth plate." Nature **423**(6937): 332.
- Lee, H., et al. (2014). "Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders." Jama **312**(18): 1880-1887.
- Lee, H., et al. (2015). "A second locus for Schneckenbecken dysplasia identified by a mutation in the gene encoding inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (INPPL1)." American journal of medical genetics. Part A **167**(10): 2470.
- Maeda, M., et al. (2016). "Distinct isoform-specific complexes of TANGO1 cooperatively facilitate collagen secretion from the endoplasmic reticulum." Molecular biology of the cell **27**(17): 2688-2696.
- Malhotra, V. and P. Erlmann (2011). "Protein export at the ER: loading big collagens into COPII carriers." Embo j **30**(17): 3475-3480.
- Malhotra, V. and P. Erlmann (2011). "Protein export at the ER: loading big collagens into COPII carriers." The EMBO journal **30**(17): 3475-3480.
- Malhotra, V. and P. Erlmann (2015). "The pathway of collagen secretion." Annu Rev Cell Dev Biol **31**: 109-124.
- Malhotra, V. and P. Erlmann (2015). "The pathway of collagen secretion." Annual review of cell and developmental biology **31**: 109-124.

- Malhotra, V., et al. (2015). Procollagen export from the endoplasmic reticulum, Portland Press Limited.
- Maurano, M. T., et al. (2012). "Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA." Science **337**(6099): 1190-1195.
- McGrew, M. J., et al. (1998). "The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos." Current biology **8**(17): 979-982.
- McKusick, V. (1972). "Heritable disorders of connective tissue. (1972)." St Louis: CV Mosby and Sons.
- Miller, E. A. and R. Schekman (2013). "COPII—a flexible vesicle formation system." Current opinion in cell biology **25**(4): 420-427.
- Mu, X. J., et al. (2011). "Analysis of genomic variation in non-coding elements using population-scale sequencing data from the 1000 Genomes Project." Nucleic acids research **39**(16): 7058-7076.
- Naiche, L. and V. E. Papaioannou (2003). "Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois." Development **130**(12): 2681-2693.
- Naiche, L. and V. E. Papaioannou (2007). "Tbx4 is not required for hindlimb identity or post-bud hindlimb outgrowth." Development **134**(1): 93-103.
- Najafi, K., et al. (2019). "Chromosomal aberrations in pregnancy and fetal loss: Insight on the effect of consanguinity, review of 1625 cases." Molecular genetics & genomic medicine: e820.
- Niemann, A., et al. (2005). "Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease." J Cell Biol **170**(7): 1067-1078.
- Orioli, I., et al. (1986). "The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias." Journal of medical genetics **23**(4): 328-332.
- Palmeirim, I., et al. (1997). "Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis." Cell **91**(5): 639-648.
- Papaioannou, V. E. (2014). "The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer." Development **141**(20): 3819-3833.
- Porat, A. and Z. Elazar (2000). "Regulation of intra-Golgi membrane transport by calcium." Journal of Biological Chemistry **275**(38): 29233-29237.

Pourquié, O. (1999). "Notch around the clock." Current opinion in genetics & development **9**(5): 559-565.

Prydz, K. (2015). "Determinants of glycosaminoglycan (GAG) structure." Biomolecules **5**(3): 2003-2022.

Pyeritz, R. E. and V. A. McKusick (1979). "The Marfan syndrome: diagnosis and management." New England Journal of Medicine **300**(14): 772-777.

Rabbani, B., et al. (2012). "Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders." Journal of human genetics **57**(10): 621.

Raote, I., et al. (2017). "TANGO1 assembles into rings around COPII coats at ER exit sites." J Cell Biol **216**(4): 901-909.

Retterer, K., et al. (2016). "Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications." Genetics in Medicine **18**(7): 696.

Robert, C., et al. (2014). "Design and development of exome capture sequencing for the domestic pig (*Sus scrofa*)." BMC genomics **15**(1): 550.

Rodriguez-Esteban, C., et al. (1999). "The T-box genes *Tbx4* and *Tbx5* regulate limb outgrowth and identity." Nature **398**(6730): 814.

Royce, P. M. and B. Steinmann (2003). Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects, John Wiley & Sons.

Saga, Y., et al. (1996). "Mesp1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation." Development **122**(9): 2769-2778.

Saga, Y., et al. (1997). "Mesp2: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation." Genes & development **11**(14): 1827-1839.

Saito, K., et al. (2009). "TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites." Cell **136**(5): 891-902.

Sanger, F., et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proceedings of the national academy of sciences **74**(12): 5463-5467.

Santos, A. J., et al. (2016). "TANGO1 and Mia2/cTAGE5 (TALI) cooperate to export bulky pre-chylomicrons/VLDLs from the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **213**(3): 343-354.

Santos, A. J., et al. (2015). "TANGO1 recruits ERGIC membranes to the endoplasmic reticulum for procollagen export." Elife **4**: e10982.

- Sassi, C., et al. (2014). "Exome sequencing identifies 2 novel presenilin 1 mutations (p. L166V and p. S230R) in British early-onset Alzheimer's disease." Neurobiology of aging **35**(10): 2422. e2413-2422. e2416.
- Seelow, D., et al. (2009). "HomozygosityMapper—an interactive approach to homozygosity mapping." Nucleic acids research **37**(suppl_2): W593-W599.
- Sheridan, E., et al. (2013). "Risk factors for congenital anomaly in a multiethnic birth cohort: an analysis of the Born in Bradford study." The Lancet **382**(9901): 1350-1359.
- Sobreira, N., et al. (2015). "GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene." Human mutation **36**(10): 928-930.
- Stark, Z., et al. (2016). "A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders." Genetics in Medicine **18**(11): 1090.
- Stojkovic, T. (2016). "Hereditary neuropathies: an update." Revue neurologique **172**(12): 775-778.
- Takeuchi, J. K., et al. (2003). "Tbx5 and Tbx4 trigger limb initiation through activation of the Wnt/Fgf signaling cascade." Development **130**(12): 2729-2739.
- Taneri, B., et al. (2012). "Biomedical impact of splicing mutations revealed through exome sequencing." Molecular Medicine **18**(2): 314-319.
- Tarailo-Graovac, M., et al. (2016). "Exome sequencing and the management of neurometabolic disorders." New England Journal of Medicine **374**(23): 2246-2255.
- Taschner, M., et al. (2012). "Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis." Differentiation **83**(2): S12-S22.
- Taschner, M., et al. (2016). "Intraflagellar transport proteins 172, 80, 57, 54, 38, and 20 form a stable tubulin-binding IFT-B2 complex." The EMBO journal **35**(7): 773-790.
- Trujillano, D., et al. (2017). "Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families." European Journal of Human Genetics **25**(2): 176.
- Veal, C. D., et al. (2012). "A mechanistic basis for amplification differences between samples and between genome regions." BMC genomics **13**(1): 455.
- Vulpe, C., et al. (1993). "Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase." Nature genetics **3**(1): 7.

- Ward, L. D. and M. Kellis (2012). "Interpreting non-coding variation in complex disease genetics." Nature biotechnology **30**(11): 1095.
- Warr, A., et al. (2015). "Exome sequencing: current and future perspectives." G3: Genes, Genomes, Genetics **5**(8): 1543-1550.
- Wilson, D. G., et al. (2011). "Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse." The Journal of cell biology **193**(5): 935-951.
- Worthey, E. A., et al. (2011). "Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease." Genetics in Medicine **13**(3): 255.
- Xu, Y., et al. (2011). "Comprehensive comparison of three commercial human whole-exome capture platforms." Genome biology **12**(9): R95.
- Xu, Y., et al. (2014). "A novel mutation identified in PKHD1 by targeted exome sequencing: guiding prenatal diagnosis for an ARPKD family." Gene **551**(1): 33-38.
- Yang, Y., et al. (2013). "Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders." New England Journal of Medicine **369**(16): 1502-1511.
- Yang, Y., et al. (2014). "Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing." Jama **312**(18): 1870-1879.
- Yoon, J. K., et al. (2000). "The bHLH class protein pMesogenin1 can specify paraxial mesoderm phenotypes." Developmental biology **222**(2): 376-391.
- Zhang, L., et al. (2015). "Early onset ectopia lentis due to a FBN1 mutation with non-penetrance." American journal of medical genetics Part A **167**(6): 1365-1368.
- Zhang, W., et al. (2018). "Expanding the genetic architecture and phenotypic spectrum in the skeletal ciliopathies." Human mutation **39**(1): 152-166.
- Zhao, Y., et al. (2016). "The plasma membrane protein Rch1 is a negative regulator of cytosolic calcium homeostasis and positively regulated by the calcium/calcineurin signaling pathway in budding yeast." European journal of cell biology **95**(3-5): 164-174.

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4.1: Arbeitsschritte für die Illumina <i>Whole Exome</i> Sequenzierung.....	5
Abbildung 5.1: Vektorkarte zu pSPL3b-cam.	25
Abbildung 6.1: Verteilung der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationsarten.	34
Abbildung 6.2: Neuartigkeit der detektierten Mutationen.	35
Abbildung 6.3: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_1.	37
Abbildung 6.4: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_9.	39
Abbildung 6.5: Patient II.1 (A, B) und II.2 (C, D) aus Familie IRN_10.....	39
Abbildung 6.6: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_10.....	41
Abbildung 6.7: Patient IV.1 aus Familie IRN_11.	42
Abbildung 6.8: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_11.....	43
Abbildung 6.9: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_12.....	45
Abbildung 6.10: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_13.....	47
Abbildung 6.11: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_15.....	49
Abbildung 6.12: Patientin II.3 (A, rechts und C) und Patient II.4 (A, links und B) aus Familie PAK_1.....	49
Abbildung 6.13: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_1.	51
Abbildung 6.14: Patientinnen IV.1 (A) und IV.2 (B) aus Familie PAK_4.	52
Abbildung 6.15: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_4.	53
Abbildung 6.16: Patient IV.1 (A, B) und Patientin IV.2 (C) aus Familie PAK_9.....	54
Abbildung 6.17: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_9.	56
Abbildung 6.18: Patientinnen IV.1 (A) und IV.2 (B) aus Familie PAK_11.	57
Abbildung 6.19: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_11.....	58
Abbildung 6.20: Patienten IV.5 (A, B), IV.7 (C, D) und IV.8 (E, F) aus Familie PAK_14.	59
Abbildung 6.21: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_14.....	60
Abbildung 6.22: Patienten IV.1 (A, B) und IV.3 (C) aus Familie PAK_15.	61
Abbildung 6.23: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_15.....	62
Abbildung 6.24: Patientin IV.7 (A, links), Patientin IV.5 (A, zweite von links und C), Patient IV.6 (A, zweiter von rechts) und Patient IV.3 (A, rechts und B) aus Familie PAK_16.	63
Abbildung 6.25: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_16.....	64
Abbildung 6.26: Patientin IV.5 (A) und Patient IV.6 (B, C) aus Familie PAK_18.	65
Abbildung 6.27: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_18.....	66
Abbildung 6.28: Von links nach rechts: Nicht zugeordnetes Familienmitglied, Patient V.2, Patient V.1 und Patientin V.4 aus Familie PAK_20.....	67
Abbildung 6.29: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_20.....	68
Abbildung 6.30: Patient IV.1 (A), IV.2 (B) und IV.3 (C) aus Familie PAK_21.	69
Abbildung 6.31: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_21.....	70
Abbildung 6.32: Patient IV.3 (A, B, C) und die Hände von Patientin IV.2 (D) aus Familie PAK_23.....	71
Abbildung 6.33: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_23.....	72
Abbildung 6.34: Patienten IV.2 (A, B) und IV.3 (C, D) aus Familie PAK_25.....	73
Abbildung 6.35: Analyse-Ergebnisse für Familie PAK_25.....	74
Abbildung 6.36: Patient II.2 aus Familie IRN_5.....	75
Abbildung 6.37: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_5.	77
Abbildung 6.38: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_8.	79
Abbildung 6.39: Patientin IV.1 aus Familie IRN_14.	80
Abbildung 6.40: Analyse-Ergebnisse für Familie IRN_14.....	81
Abbildung 6.41: Patienten II.2 (A), II.4 (B) und II.5 (C) aus Familie BEL_1.	82
Abbildung 6.42: Auszüge aus dem Analyseprogramm Alamut® Visual.....	85
Abbildung 6.43: Analyse-Ergebnisse für Familie BEL_1.....	86
Abbildung 6.44: Konzeption und Ergebnisse des <i>in-vitro</i> -Spleißassays..	87
Abbildung 6.45: Ergebnisse der <i>in-vivo</i> -Spleißanalysen bei Familie BEL_1.	88

Abbildung 6.46: Ergebnisse der Gelextraktion und Sequenzierung der bei Familie BEL_1 entstandenen <i>MIA3</i> -Spleißprodukte.....	89
Abbildung 6.47: Relative Verhältnisse der beiden verschiedenen <i>MIA3</i> -Spleißprodukte der betroffenen Kinder (II.1, II.2, II.4, II.5) und beider Elternteile (I.1, I.2) aus Familie BEL_1, sowie einer wildtypischen Kontrolle.....	90
Abbildung 6.48: Ergebnisse der Effekte verschiedener <i>vivo</i> Morpholinos auf das <i>MIA3</i> prä-mRNA Spleißen.....	91
Abbildung 7.1: Genetische Übereinstimmung zwischen zwei Mitgliedern derselben Familie.....	93
Abbildung 7.2: Hypothesen für den zugrunde liegenden Mechanismus des bei Familie BEL_1 beobachteten <i>MIA3</i> Exon 8 Skippings.....	115
Abbildung 7.3: Aufbau des Transmembranproteins TANGO1 und Lokalisation der bei Familie BEL_1 identifizierten Mutation (c.3621A>G).....	116
Abbildung 14.1: Stammbaum von Familie IRN_2.....	XXV
Abbildung 14.2: Stammbaum von Familie IRN_3.....	XXVI
Abbildung 14.3: Stammbaum von Familie IRN_4.....	XXVII
Abbildung 14.4: Informationen zu Familie IRN_6.....	XXVIII
Abbildung 14.5: Informationen zu Familie IRN_7.....	XXIX
Abbildung 14.6: Informationen zu Familie IRN_16.....	XXX
Abbildung 14.7: Informationen zu Familie PAK_2.....	XXXI
Abbildung 14.8: Informationen zu Familie PAK_3.....	XXXII
Abbildung 14.9: Informationen zu Familie PAK_5.....	XXXIII
Abbildung 14.10: Informationen zu Familie PAK_6.....	XXXIV
Abbildung 14.11: Informationen zu Familie PAK_7.....	XXXV
Abbildung 14.12: Informationen zu Familie PAK_8.....	XXXVI
Abbildung 14.13: Informationen zu Familie PAK_10.....	XXXVII
Abbildung 14.14: Betroffene aus Familie PAK_12.....	XXXVIII
Abbildung 14.15: Informationen zu Familie PAK_13.....	XXXIX
Abbildung 14.16: Informationen zu Familie PAK_17.....	XL
Abbildung 14.17: Informationen zu Familie PAK_19.....	XLI
Abbildung 14.18: Informationen zu Familie PAK_22.....	XLII
Abbildung 14.19: Informationen zu Familie PAK_24.....	XLIII
Abbildung 14.20: Informationen zu Familie PAK_26.....	XLIV

10. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 5.1: Auflistung der für diese Arbeit untersuchten Patienten.....	9
Tabelle 5.2: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Medien und Reagenzien.	11
Tabelle 5.3: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Enzyme, Morpholinos, Plasmide und Zelllinien.....	13
Tabelle 5.4: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten kommerziellen Kits.	13
Tabelle 5.5: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Primer- und Morpholino-Sequenzen.....	14
Tabelle 5.6: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Geräte und Hardware.....	15
Tabelle 5.7: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Software und Datenbanken.	15
Tabelle 6.1: Informationen zur identifizierten <i>CPS1</i> -Mutation in Familie IRN_1.....	36
Tabelle 6.2: Informationen zur identifizierten <i>IMPAD1</i> -Mutation in Familie IRN_9.....	38
Tabelle 6.3: Informationen zur identifizierten <i>PYCR1</i> -Mutation in Familie IRN_10.....	40
Tabelle 6.4: Informationen zur identifizierten <i>DNMT3B</i> -Mutation in Familie IRN_11.	42
Tabelle 6.5: Informationen zur identifizierten <i>PEX7</i> -Mutation in Familie IRN_12.	44
Tabelle 6.6: Informationen zur identifizierten <i>INPPL1</i> -Mutation in Familie IRN_13.....	46
Tabelle 6.7: Informationen zur identifizierten <i>TRAF3IP1</i> -Mutation in Familie IRN_15.....	48
Tabelle 6.8: Informationen zur identifizierten <i>GCH1</i> -Mutation in Familie PAK_1.....	50
Tabelle 6.9: Informationen zur identifizierten <i>CHST3</i> -Mutation in Familie PAK_4.	52
Tabelle 6.10: Informationen zur identifizierten <i>MAP3K20</i> -Mutation in Familie PAK_9.....	54
Tabelle 6.11: Informationen zu einer zweiten identifizierten <i>NEB</i> -Mutation in Familie PAK_9.	55
Tabelle 6.12: Informationen zur identifizierten <i>UROCI</i> -Mutation in Familie PAK_11.	57
Tabelle 6.13: Informationen zur identifizierten <i>SGCA</i> -Mutation in Familie PAK_14.....	59
Tabelle 6.14: Informationen zur identifizierten <i>CAPN3</i> -Mutation in Familie PAK_15.	61
Tabelle 6.15: Informationen zur identifizierten <i>MTMR2</i> -Mutation in Familie PAK_16.	63
Tabelle 6.16: Informationen zur identifizierten <i>GAN</i> -Mutation in Familie PAK_18.	65
Tabelle 6.17: Informationen zur identifizierten <i>ATM</i> -Mutation in Familie PAK_20.....	67
Tabelle 6.18: Informationen zur identifizierten <i>GDAP1</i> -Mutation in Familie PAK_21.....	69
Tabelle 6.19: Informationen zur identifizierten <i>FBN1</i> -Mutation in Familie PAK_23.....	71
Tabelle 6.20: Informationen zur identifizierten <i>ATP7A</i> -Mutation in Familie PAK_25.	73
Tabelle 6.21: Informationen zur identifizierten <i>SLC10A7</i> -Mutation in Familie IRN_5.....	76
Tabelle 6.22: Informationen zur identifizierten <i>TBX4</i> -Mutation in Familie IRN_8.....	78
Tabelle 6.23: Informationen zur identifizierten <i>MSGN1</i> -Mutation in Familie IRN_14.	80
Tabelle 6.24: Verteilung der Symptome bei den Patienten aus Familie BEL_1.	83
Tabelle 6.25: Informationen zur identifizierten <i>MIA3</i> -Mutation in Familie BEL_1.....	84

11. DANKSAGUNG

12. CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name Caroline Friederike Lekszas

Geburtsdatum

Geburtsort Speyer

Staatsangehörigkeit deutsch

Kontakt

BILDUNGSWEG

seit März 2015 Promotion am Institut für Humangenetik
Julius-Maximilians-Universität Würzburg | Deutschland

seit Januar 2015 Weiterbildung zur Fachhumangenetikerin (GfH)
Institut für Humangenetik Würzburg | Deutschland

2012-2014 Masterstudiengang Biologie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg | Deutschland

2009-2012 Bachelorstudiengang Biologie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg | Deutschland

2000-2009

1996-2000

WEITERBILDUNGSVERANSTALTUNGEN

März 2019	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V. (GfH) Weimar Deutschland
März 2018	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V. (GfH) Münster Deutschland
Oktober 2017	Eureka! International GSLS Student Symposium Würzburg Deutschland
Juni 2017	International Conference on Children's Bone Health (ICCBH) Würzburg Deutschland
März 2017	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V. (GfH) Bochum Deutschland
Oktober 2016	Eureka! International GSLS Student Symposium Würzburg Deutschland
März 2016	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V. (GfH) Lübeck Deutschland
Oktober 2015	Illumina Clinical Seminar Stuttgart Deutschland
September 2015	Fortbildung „Grundlagen der molekulargenetischen Diagnostik“ Würzburg Deutschland
Juni 2015	Süddeutsches Beratertreffen Humangenetik Würzburg Deutschland

13. PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

13.1. Publikationen

***Biallelic mutations in *TANGO1* cause a novel syndromal disease due to hampered cellular collagen secretion.**

Caroline Lekszas, Ombretta Foresti, Ishier Raote, Daniel Liedtke, Eva-Maria König, Indrajit Nanda, Barbara Vona, Peter De Coster, Rita Cauwels, Vivek Malhotra, Thomas Haaf

-submitted-

***Homozygous null *TBX4* mutations lead to posterior amelia with pelvic and pulmonary hypoplasia.**

Ariana Kariminejad, Emmanuelle Szenker-Ravi, Caroline Lekszas, Homa Tajsharghi, Ali-Reza Moslemi, Thomas Naert, Hong Thi Tran, Fatemeh Ahangari, Minoo Rajaei, Mojila Nasser, Thomas Haaf, Afroz Azad, Andrea Superti-Furga, Reza Maroofian, Siavash Ghaderi-Sohi, Hossein Najmabadi, Kris Vleminckx, Mohammad Reza Abbaszadegan, Pooneh Nikuei, Bruno Reversade

-submitted-

Unbalanced segregation of a paternal t(9;11)(p24.3;p15.4) translocation causing familial Beckwith-Wiedemann syndrome: a case report

Caroline Lekszas, Indrajit Nanda, Barbara Vona, Julia Böck, Farah Ashrafzadeh, Nahid Donyadideh, Farnoosh Ebrahimzadeh, Najmeh Ahangari, Reza Maroofian, Ehsan Ghayoor Karimiani, and Thomas Haaf

BMC Med Genomics. 2019 Jun 7;12(1):83.

doi: 10.1186/s12920-019-0539-y

****SLC10A7* mutations cause a skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta mediated by GAG biosynthesis defects.**

Johanne Dubail, Celine Huber, Sandrine Chantepie, Stephan Sonntag, Beyhan tuysuz, Ercan Mihci, Christopher Gordon, Elisabeth Steichen, Jeanne Amiel, Banu Nur, Irene Stolte-Dijkstra, Albertien van Eerde, Koen van Gassen, Corstiaan Breugem, Alexander Stegmann, Caroline Lekszas, Reza Maroofian, Ehsan Ghayoor Karimiani, Arnaud Bruneel, Nathalie Seta, Arnold MUNNICH, Dulce Papy-Garcia, Muriel De La Dure-Molla, and Valérie Cormier-Daire

Nat Comm. 2018 Aug 6;9(1):3087.

doi: 10.1038/s41467-018-05191-8

Dual Diagnosis of Ellis-van Creveld Syndrome and Hearing Loss in a Consanguineous Family.

Barbara Vona, Reza Maroofian, Geetu Mendiratta, Matthew Croken, Siwu Peng, Xiaoqian Ye, Jamileh Rezazadeh, Paulina Bahena, Caroline Lekszas, Thomas Haaf, Lisa Edelmann, and Lisong Shi

Mol Syndromol. 2017 Dec;9(1):5-14.

doi: 10.1159/000480458

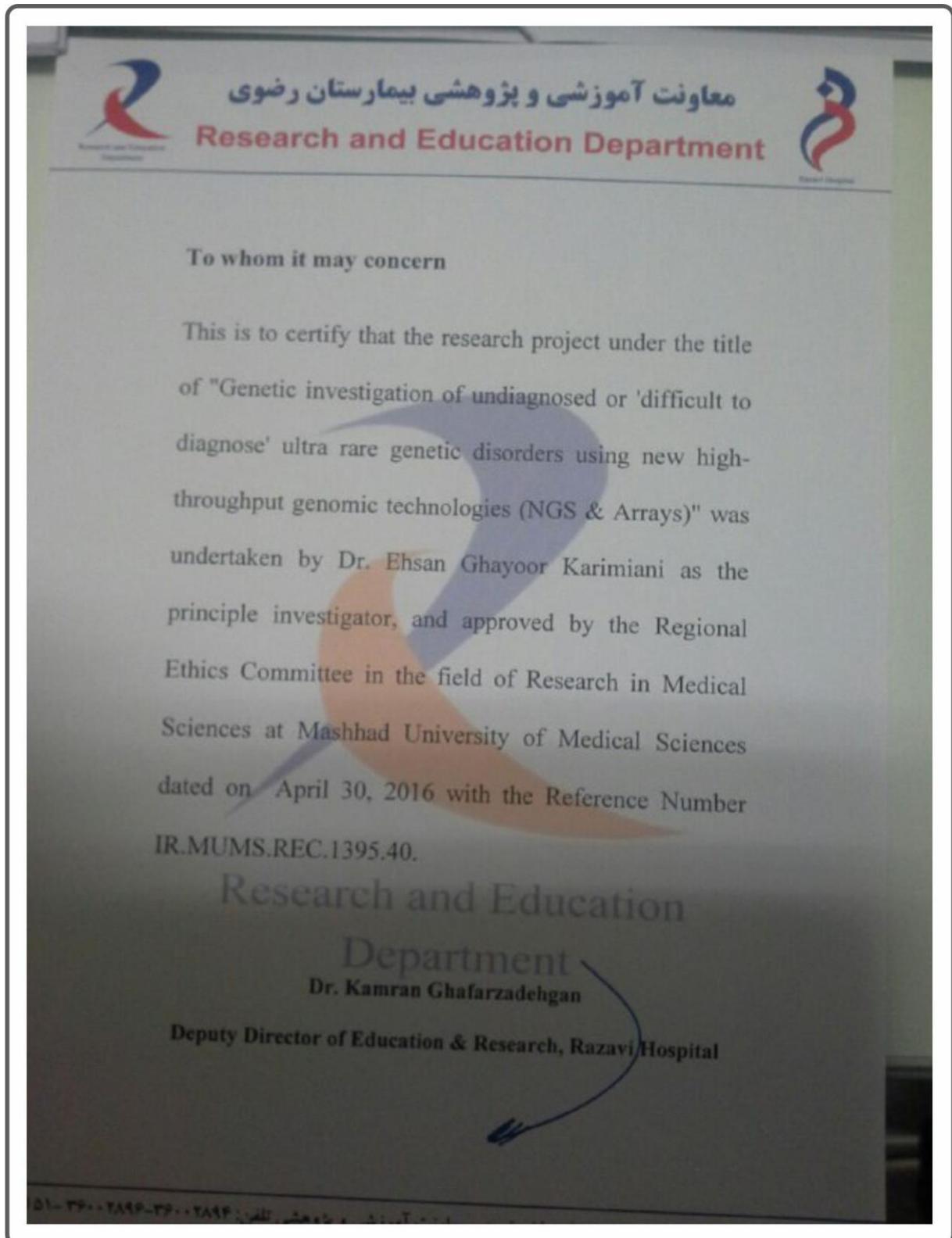
*Diese Publikationen sind aus der hier vorgestellten Doktorarbeit hervorgegangen.

13.2. Kongressbeiträge

- März 2018 **A novel reciprocal translocation t(9;11)(p24.3;p15.4) as a cause of transgenerational Beckwith-Wiedemann syndrome**
Caroline Lekszas, Indrajit Nanda, Julia Böck, Barbara Vona, Ehsan Ghayoor Karimiani, Reza Maroofian, Thomas Haaf
Posterpräsentation | GfH Jahrestagung | Münster | Deutschland
- Juni 2017 **Case Report: A potentially new skeletal dysplasia with autosomal recessive inheritance**
Caroline Lekszas, Barbara Vona, Indrajit Nanda, Reza Maroofian, Thomas Haaf
Posterpräsentation | ICCBH | Würzburg | Deutschland
- März 2016 **Molecular Karyotyping of Abortion Samples with Normal Karyotypes and Cell-Free Fetal DNA from Amniotic Fluid Supernatant**
Caroline Lekszas, Indrajit Nanda, Eva Klopocki, Thomas Haaf
Posterpräsentation | GfH Jahrestagung | Lübeck | Deutschland

14. ANHANG

14.1. Ethikvotum für die iranische Kohorte



14.2. Ethikvotum für die pakistanische Kohorte



Institutional Review Board Office
 Georgia Regents University
 1120 15th St., CJ-2103
 Augusta GA 30912-7621
 Email: irb@gru.edu
 Phone: 706-721-3110



<http://www.gru.edu/research/irboffice/>

DATE: May 16, 2016

TO: Hyung-Goo Kim, Ph.D
 FROM: Georgia Regents University (GRU) Committee A

PROJECT TITLE: [624456-1] Developmental gene discovery project 1
 REFERENCE #:
 SUBMISSION TYPE: New Project

ACTION: APPROVED
 APPROVAL DATE: May 16, 2016
 EXPIRATION DATE: May 15, 2017
 REVIEW TYPE: Expedited Review

REVIEW CATEGORY: Expedited review category #2, 6

2- Collection of blood samples by finger stick, heel stick, ear stick, or venipuncture as follows:
 a. from healthy, nonpregnant adults who weigh at least 110 pounds. For these subjects, the amounts drawn may not exceed 550 ml in an 8 week period and collection may not occur more frequently than 2 times per week; or
 b. from other adults and children, considering the age, weight, and health of the subjects, the collection procedure, the amount of blood to be collected, and the frequency with which it will be collected. For these subjects, the amount drawn may not exceed the lesser of 50 ml or 3 ml per kg in an 8 week period and collection may not occur more frequently than 2 times per week.

6- Collection of data from voice, video, digital, or image recordings made for research purposes

Thank you for your submission of New Project materials for this project. The Georgia Regents University (GRU) Committee A has APPROVED your submission. This approval is based on an appropriate risk/benefit ratio and a project design wherein the risks have been minimized. All research must be conducted in accordance with this approved submission.

This submission has received Expedited Review based on applicable federal regulations.

This project has been determined to be a Minimal Risk project. Based on the risks, this project requires continuing review by this committee on an annual basis. Please use the appropriate forms for this procedure. Your documentation for continuing review must be received with sufficient time for review and continued approval before the expiration date of May 15, 2017.

The approval includes the following documents:

- Application Form - Clinical Biosafety (BSP) Application (UPDATED: 04/6/2016)
- Child Assent - Child Assent 13-17 yrs (UPDATED: 04/1/2016)

- Child Assent - Child Assent 7-12 yrs (UPDATED: 04/1/2016)
- Conflict of Interest - Declaration - Conflict of Interest Attestation (UPDATED: 04/4/2016)
- Consent Form - Consent for subject and normal control (UPDATED: 04/1/2016)
- Consent Form - DGDP study parental consent Apr0116 Word.doc (UPDATED: 04/1/2016)
- Data Collection - Information collected from medical records (UPDATED: 04/1/2016)
- GRU - Core Data Form - GRU - Core Data Form (UPDATED: 04/1/2016)
- Other - R01 Grant Submitted Feb 2016 (UPDATED: 04/7/2016)
- Other - Agreement - Carrick Foundation Funding (UPDATED: 04/7/2016)
- Other - Protocol specific determination of cognitively impaired subjects (UPDATED: 04/6/2016)
- Other - Protocol specific determination of minors (UPDATED: 04/6/2016)
- Other - Researcher Attestation form (UPDATED: 04/4/2016)
- Proposal - Research proposal (UPDATED: 04/1/2016)
- Protocol - DGDP protocol (UPDATED: 04/26/2016)

All Principal Investigators must comply with the following:

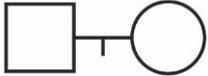
- Conduct the research in accordance with the protocol, applicable laws and regulations, and principles and research ethics as set forth in the Belmont Report.
- Unless consent has been waived, conduct the informed consent process without coercion or undue influence, and provide the potential participant sufficient opportunity to consider whether or not to participate.
 - Use only the most current approved consent form bearing the GRU IRB stamp.
 - Provide non-English speaking subjects with a certified translation of the approved consent form in the subject's first language. The translation must be approved by the IRB unless other arrangements have been made and approved by the IRB.
 - Obtain approval from the IRB for use of recruitment materials and other materials provided to subjects.
- Obtain approval from the IRB for changes/modification in research.
- Report all reportable events to the IRB within **5 days**, per IRB Policy: "Reportable Events."
- Ensure all applicable ancillary approvals are obtained **prior to initiating the study**. This includes:
 - Medical Center approval if Medical Center resources are used
 - Biosafety Approval, if applicable
 - Radiation Safety Approval, if applicable
 - Chemical Safety Approval, if applicable

Please refer to the GRU IRB Policy **Records Retention** on the IRB website.

If you have any questions, please contact the IRB office at 706-721-3110 or irb@gru.edu.

This letter has been electronically signed in accordance with all applicable regulations, and a copy is retained within Georgia Regents University (GRU) Committee A's records. If the reader of this message is not the intended recipient you are hereby notified that any dissemination, distribution or copying of this information is STRICTLY PROHIBITED.

14.3. Stammbaumlegende

	männlich	weiblich	Geschlecht unbekannt
nicht betroffen			
Merkmalssträger			
mehrere Individuen (Anzahl angegeben)			
verstorbenes Individuum			
Schwangerschaft (<i>pregnancy</i>)			
<hr/>			
Spontanabort			
induzierter Abort			
Fortpflanzungspartner			
konsanguine Fortpflanzungspartner			

14.4. Unaufgeklärte Fälle

14.4.1. Familie IRN_2

In Familie IRN_2 sind drei Söhne (Abbildung 14.1; II.1, II.2, II.3) kurz nach der Geburt verstorben. Familienmitglieder II.1 und II.2 wiesen beide eine Zwerchfellhernie, eine Kardiomegalie und Atemnot auf. Extern durchgeführte Chromosomenanalysen kamen zu einem unauffälligen Karyotyp bei beiden Neugeborenen. Familienmitglied II.2 zeigte zusätzlich einen kurzen Hals, eine Mikrognathie, eine Mittelgesichtshypoplasie, eine erhöhte Nackentransparenz, Plattfüße, einen bilateralen Kryptorchismus, einen milden Ventrikelseptumdefekt, eine Lungenhypoplasie und einen Hydrops. Eine extern durchgeführte *array-comparative genomic hybridization* (CGH)-Analyse ergab keine potenziell pathogenen Kopiezahlveränderungen. Bei Familienmitglied II.3 wurden bis auf eine Lungenhypoplasie, eine Herzinsuffizienz und Atemnot keine Auffälligkeiten beschrieben. Die Eltern (Abbildung 14.1; I.1 und I.2) sind nicht blutsverwandt. Weitere klinische oder anamnestische Informationen sowie Patientenbilder lagen nicht vor.

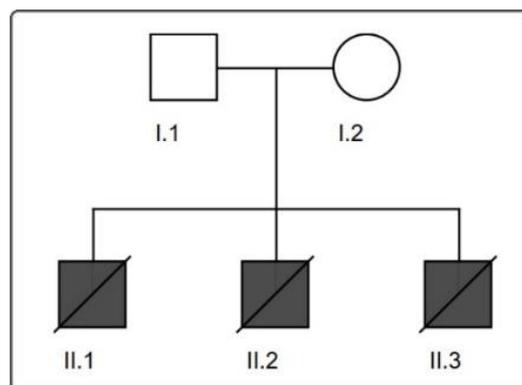


Abbildung 14.1: Stammbaum von Familie IRN_2.

14.4.2. Familie IRN_3

In Familie IRN_3 kamen laut Angaben des Kollaborationspartners nach der Geburt eines gesunden Mädchens (Abbildung 14.2; II.1) weitere drei Kinder (Abbildung 14.2; II.2, II.3, II.4) zur Welt, die alle einen angeborenen Herzfehler (Ventrikelseptumdefekt und persistierender Ductus arteriosus Botalli) sowie Gallensteine aufwiesen. Extern war bereits eine WES durchgeführt gewesen, bei der keine potenziell pathogenen Sequenzvarianten detektiert wurden. Die Eltern (Abbildung 14.2; I.1 und I.2) sind nicht blutsverwandt. Weitere klinische oder anamnestische Informationen sowie Patientenbilder lagen nicht vor.

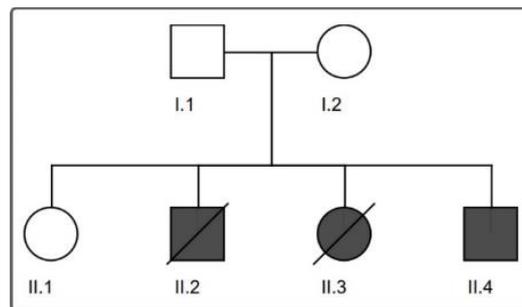


Abbildung 14.2: Stammbaum von Familie IRN_3.

14.4.3. Familie IRN_4

In Familie IRN_4 sind vier Kinder (Abbildung 14.3; III.1, III.2, III.3, III.4) kurz nach der Geburt verstorben. laut Angaben des Kollaborationspartners zeigten alle eine Gedeihstörung mit schwerer Diarrhö und reduzierten Immunglobulin-Spiegeln. Eine extern durchgeführte array-CGH-Analyse ergab keine potenziell pathogenen Kopiezahlveränderungen. Mutationen im *JAK3*-Gen (*Janus kinase 3*) wurden zuvor extern ausgeschlossen. Die jeweiligen Eltern (Abbildung 14.3; II.3 und II.4; II.6 und II.7) der Betroffenen sind nicht blutsverwandt. Weitere klinische oder anamnestische Informationen sowie Patientenbilder lagen nicht vor.

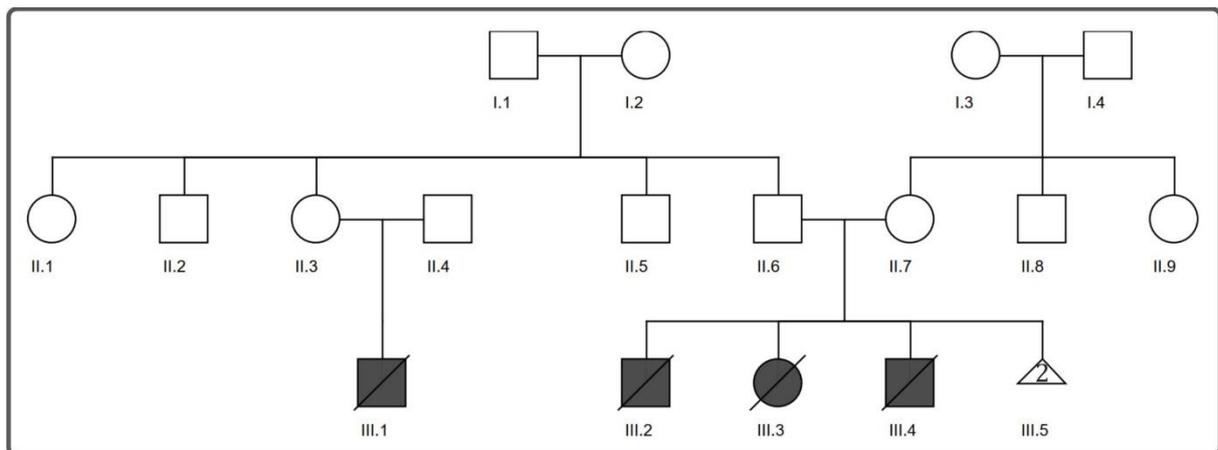


Abbildung 14.3: Stammbaum von Familie IRN_4.

14.4.4. Familie IRN_6

Bei dem einzigen betroffenen Kind (Abbildung 14.4; VI.1) in Familie IRN_6 liegen laut Angaben des Kollaborationspartners eine milde Mitralklappeninsuffizienz, eine Gelenküberbeweglichkeit, blaue Skleren, eine Osteopenie und eine Skoliose vor. Eine extern durchgeführte Chromosomenanalyse sowie Labortests zu Aminosäuren und Ketonen kamen zu einem unauffälligen Ergebnis. Die Eltern des betroffenen Mädchens (Abbildung 14.4; V.3 und V.4) sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

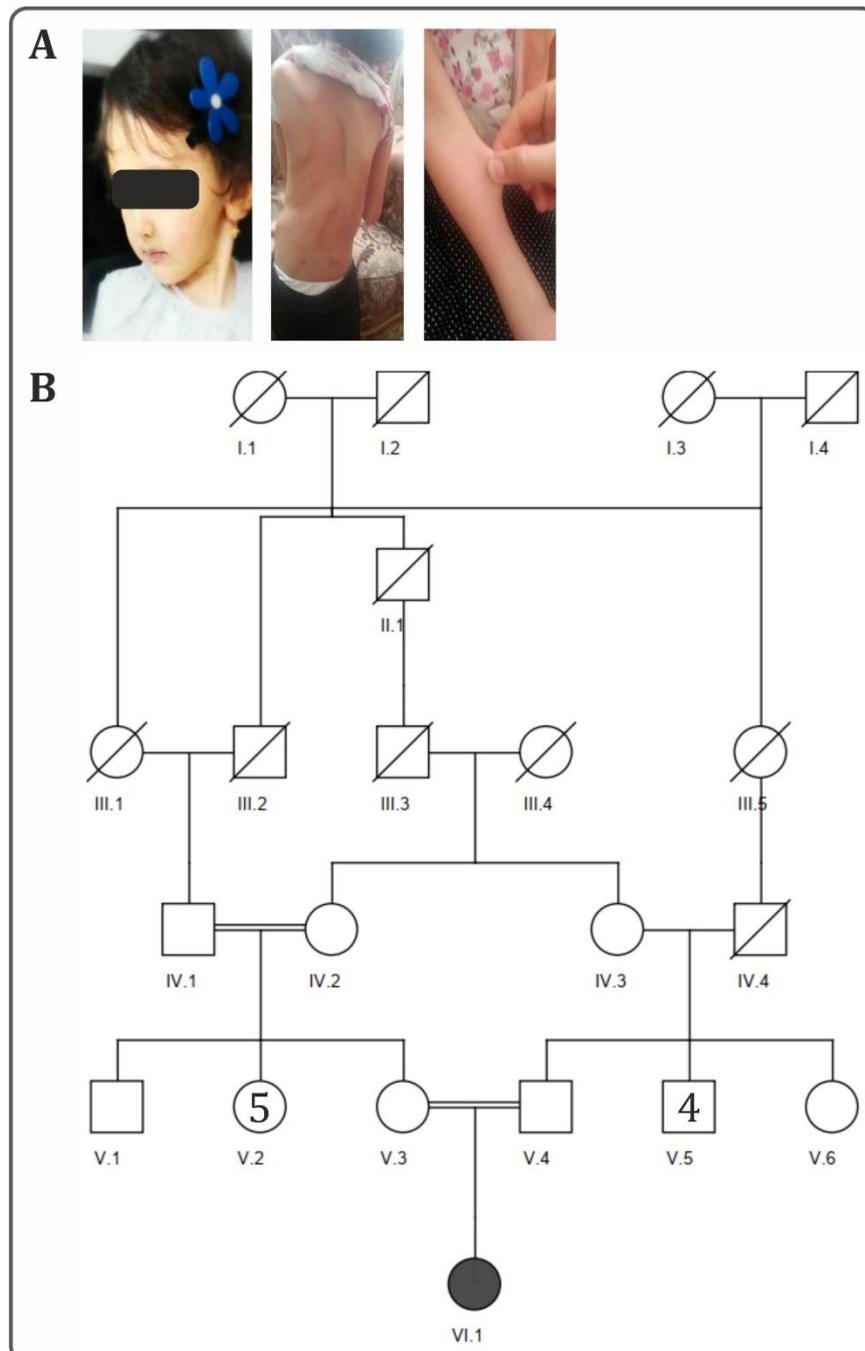


Abbildung 14.4: Informationen zu Familie IRN_6. (A) Patientin VI.1. (B) Stammbaum der Familie IRN_6. Die Eltern (V.3 und V.4) des betroffenen Mädchens sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.5. Familie IRN_7

Patientin II.2 aus Familie IRN_7 (Abbildung 14.5) war zum Zeitpunkt der klinischen Datenerhebung etwa sechs Jahre alt. Sie zeigte laut Angaben des Kollaborationspartners u.a. eine Entwicklungsverzögerung, eine Intelligenzminderung, eine Hörstörung, eine Kniefehlstellung, einen milden Hydrozephalus, eine Kolpozephalie und Hypertelorismus. Im erweiterten Stammbaum der Familie findet sich ein ebenfalls als betroffen markiertes und bereits verstorbenes Familienmitglied, das phänotypisch jedoch nicht eingeordnet wurde und von dem auch kein Material zur Verfügung stand. Radiologische Aufnahmen sowie Computertomographie (CT)-Scans des Schädels können auf Anfrage eingesehen werden. Die Eltern (Abbildung 14.5; I.1 und I.2) des betroffenen Mädchens sind Cousin und Cousine ersten Grades.

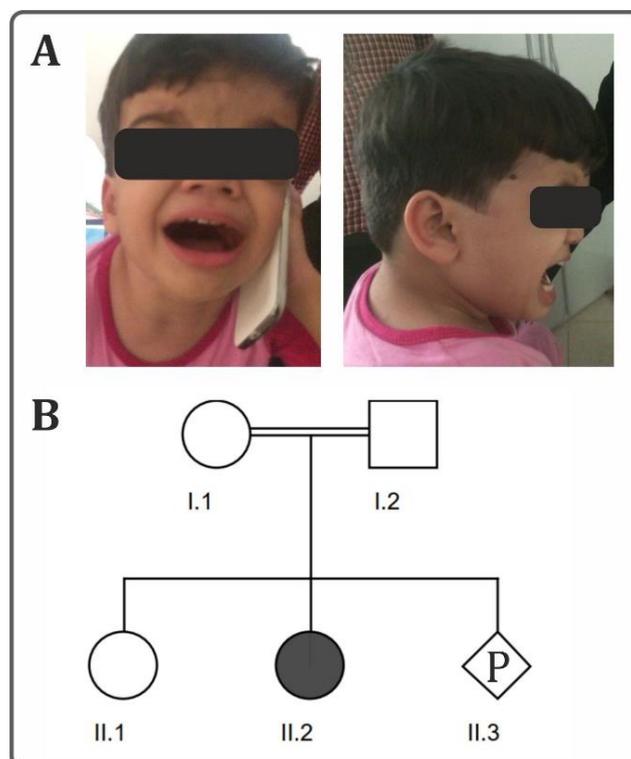


Abbildung 14.5: Informationen zu Familie IRN_7. (A) Patientin II.2. (B) Stammbaum von Familie IRN_7. Die Eltern (I.1 und I.2) des betroffenen Mädchens sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.6. Familie IRN_16

Patient IV.1 aus Familie IRN_16 (Abbildung 14.6) wies laut Angaben des Kollaborationspartners einen kurzen Hals, einen Oxyzephalus, eine Kielbrust (*Pectus carinatum*), eine angeborene Kyphoskoliose, eine Arachnodaktylie sowie eine Muskelatrophie auf. Inwiefern seine Schwester (Abbildung 14.6; IV.2) betroffen war und in welchem Alter bzw. woran die Geschwister gestorben sind, wurde nicht angegeben. Die Eltern (Abbildung 14.6; III.1 und III.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

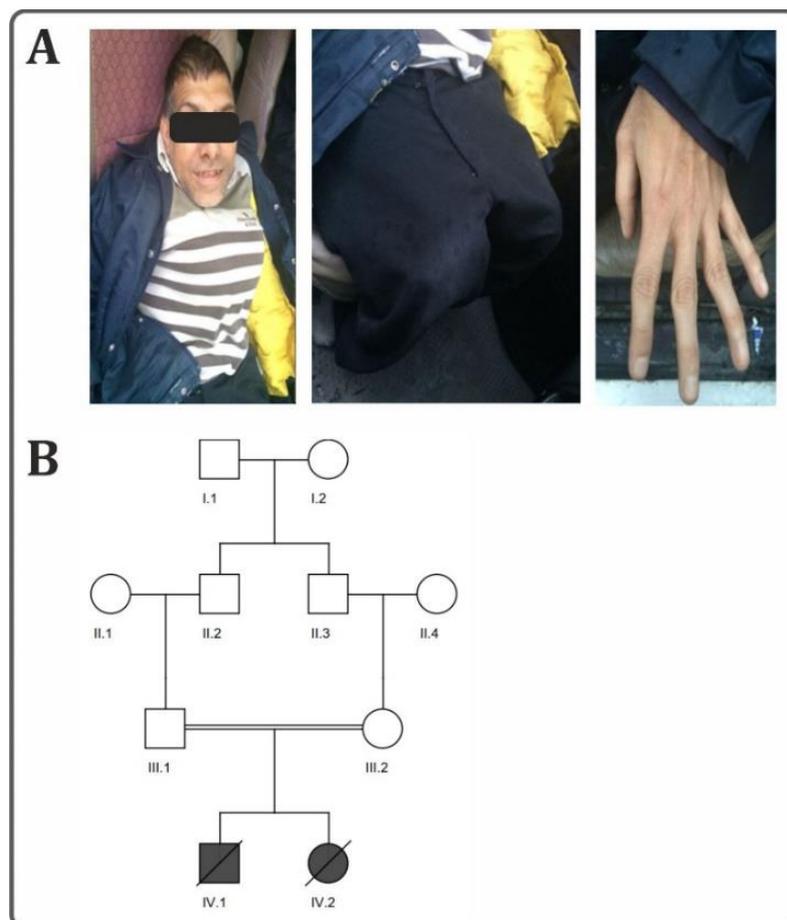


Abbildung 14.6: Informationen zu Familie IRN_16. (A) Patient IV.1. (B) Stammbaum der Familie IRN_16. Die Eltern (III.1 und III.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.7. Familie PAK_2

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_2 (Abbildung 14.7; II.1, II.3 und II.4) eine Intelligenzminderung sowie eine Skelettdysplasie. Die Eltern (Abbildung 14.7; I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

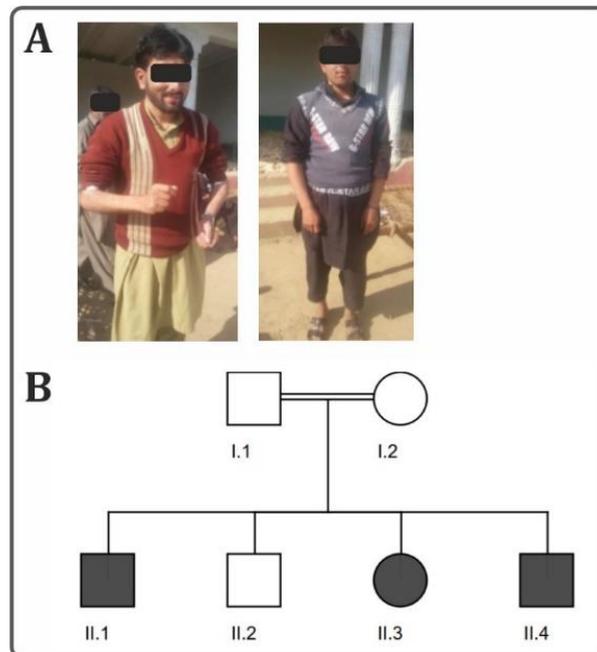


Abbildung 14.7: Informationen zu Familie PAK_2. (A) Patienten II.1 (links) und II.4 (rechts). (B) Stammbaum der Familie PAK_2. Die Eltern (I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.8. Familie PAK_3

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_3 (Abbildung 14.8; II.2 und II.3) eine Skelettdysplasie. Die Eltern (Abbildung 14.8; I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

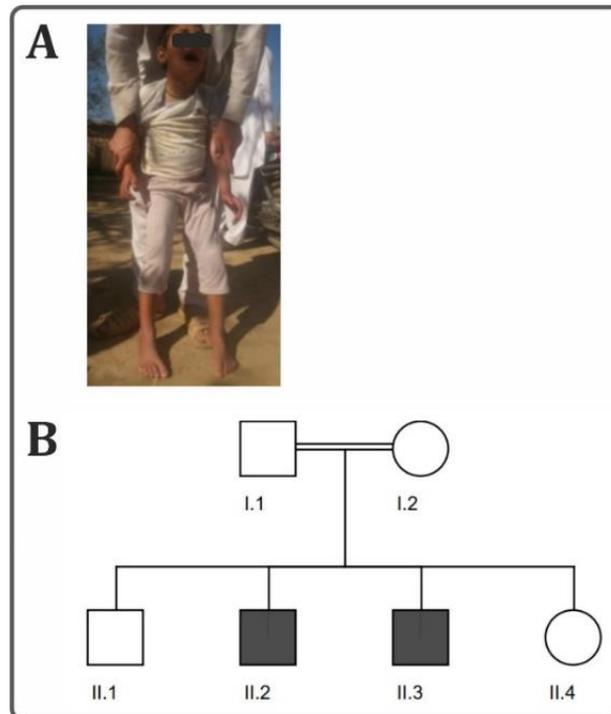


Abbildung 14.8: Informationen zu Familie PAK_3. (A) Patient II.3. (B) Stammbaum der Familie PAK_3. Die Eltern (I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.9. Familie PAK_5

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_5 (Abbildung 14.9; II.1 und III.2) eine Skelettdysplasie. Die jeweiligen Eltern (Abbildung 14.9; I.1 und I.2; II.3 und II.4) der Betroffenen sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

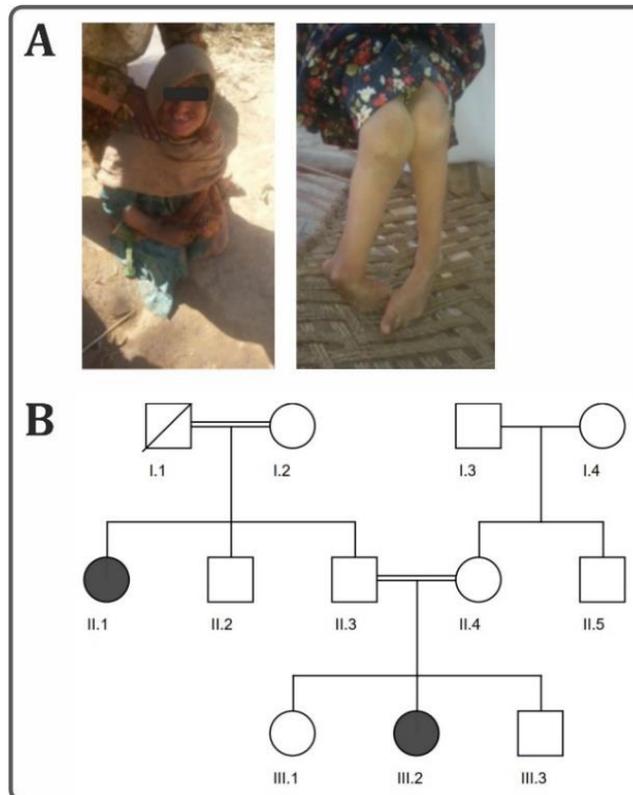


Abbildung 14.9: Informationen zu Familie PAK_5. (A) Patientinnen II.1 (links) und III.2 (rechts). (B) Stammbaum der Familie PAK_5. Die jeweiligen Eltern (I.1 und I.2; II.3 und II.4) der Betroffenen sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.10. Familie PAK_6

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_6 (Abbildung 14.10; II.2 und II.4) eine Skelettdysplasie. Die Eltern (Abbildung 14.10; I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind nicht blutsverwandt. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

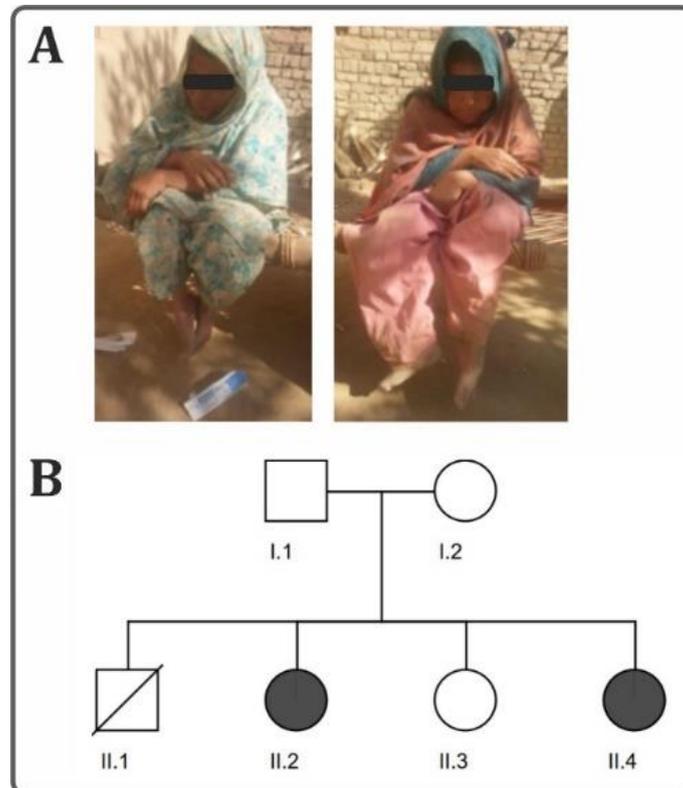


Abbildung 14.10: Informationen zu Familie PAK_6. (A) Patientinnen II.2 (links) und II.4 (rechts). (B) Stammbaum der Familie PAK_6. Die Eltern (I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind nicht blutsverwandt.

14.4.11. Familie PAK_7

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_7 (Abbildung 14.11; II.1 und II.2) eine Skelettdysplasie. Anhand der Fotos lassen sich bei beiden Patienten atrophe Extremitäten erahnen. Die Eltern (Abbildung 14.11; I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

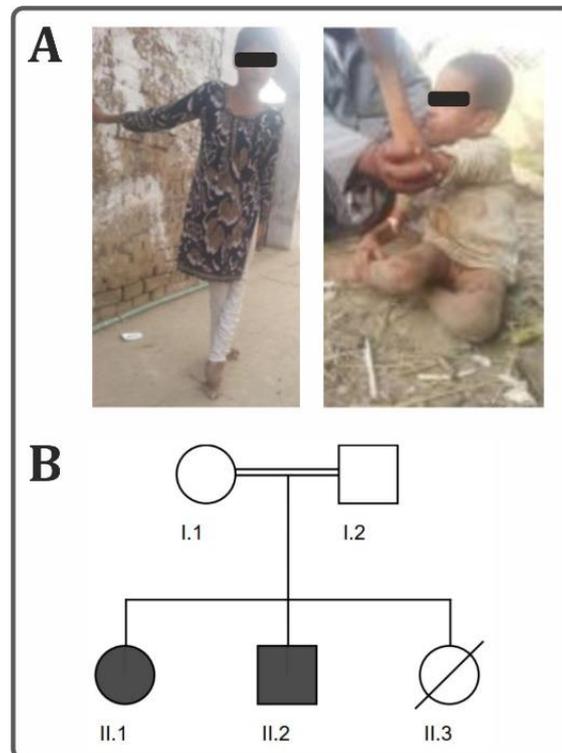


Abbildung 14.11: Informationen zu Familie PAK_7. (A) Patientin II.1 (links) und Patient II.2 (rechts). (B) Stammbaum der Familie PAK_7. Die Eltern (I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.12. Familie PAK_8

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_8 (Abbildung 14.12; III.5, III.6 und IV.2) eine Intelligenzminderung sowie eine Skelettdysplasie. Auf den unzensurierten Fotos ist bei Patientin III.5 eine Exotropie sowie eine Polydaktylie am rechten Fuß zu erkennen. Die jeweiligen Eltern (Abbildung 14.12; II.4 und II.5; III.2 und III.3) der Betroffenen sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

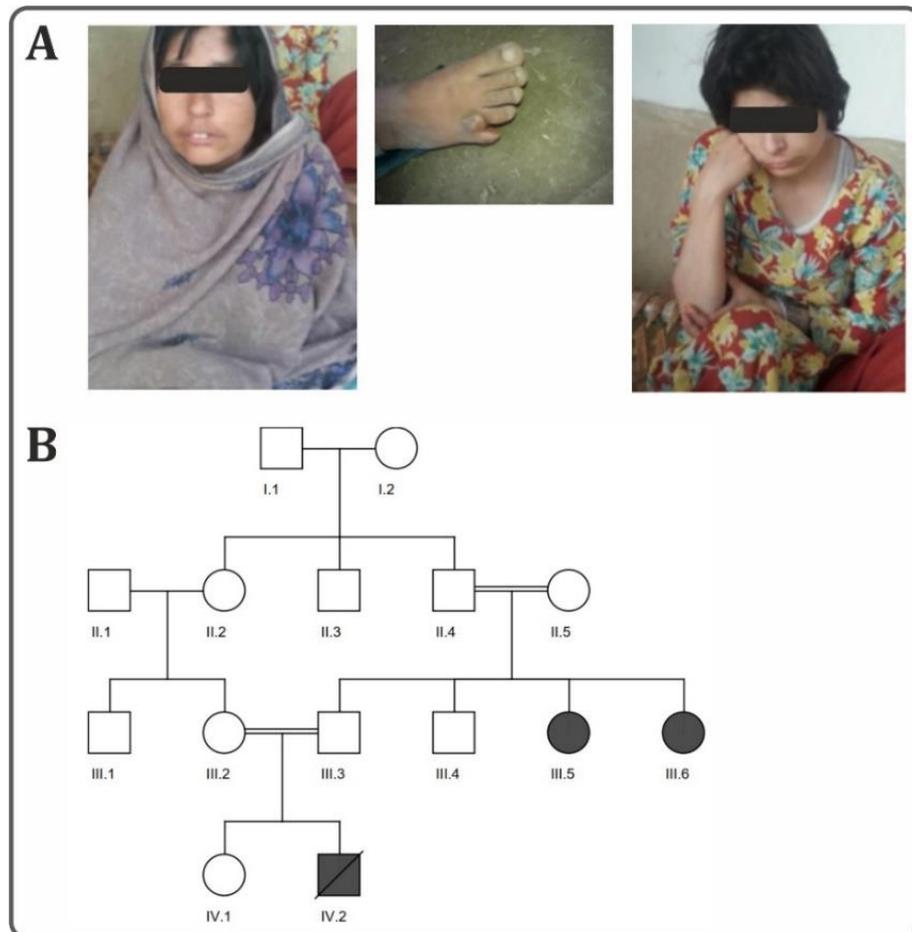


Abbildung 14.12: Informationen zu Familie PAK_8. (A) Patientinnen III.5 (links und mitte) und III.6 (rechts). (B) Stammbaum der Familie PAK_8. Die jeweiligen Eltern (II.4 und II.5; III.2 und III.3) der Betroffenen sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.13. Familie PAK_10

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_10 (Abbildung 14.13; IV.1, IV.2 und IV.4) eine Skelettdysplasie. Die jeweiligen Eltern (Abbildung 14.13; III.1 und III.2; III.4 und III.5) der Betroffenen sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

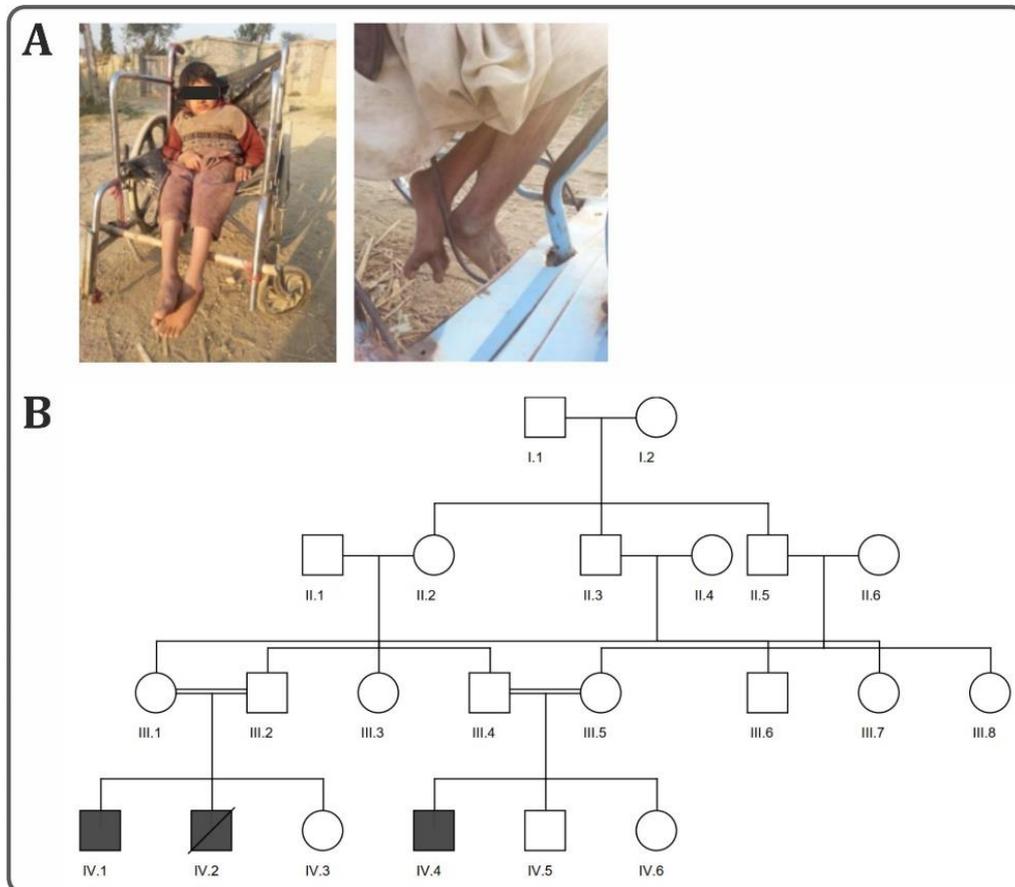


Abbildung 14.13: Informationen zu Familie PAK_10. (A) Patienten IV.1 (links) und IV.4 (rechts). (B) Stammbaum der Familie PAK_10. Die jeweiligen Eltern (III.1 und III.2; III.4 und III.5) der Betroffenen sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.14. Familie PAK_12

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_12 (Abbildung 14.14) eine Intelligenzminderung sowie eine Skelettdysplasie. Bei dem Jungen (Abbildung 14.14, links) ist auf dem unzensurierten Foto eine Esotropie zu erkennen. Der übermittelte Stammbaum der Familie war uneindeutig und ließ keine exakten Schlussfolgerungen zu Verwandtschaftsverhältnissen zu. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.



Abbildung 14.14: Betroffene aus Familie PAK_12. Der übermittelte Stammbaum der Familie war uneindeutig und ließ keine exakten Schlussfolgerungen zu Verwandtschaftsverhältnissen zu.

14.4.15. Familie PAK_13

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_13 (Abbildung 14.15; II.2, II.3 und II.5) eine Intelligenzminderung sowie eine Skelettdysplasie. Die Eltern (Abbildung 14.15; I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

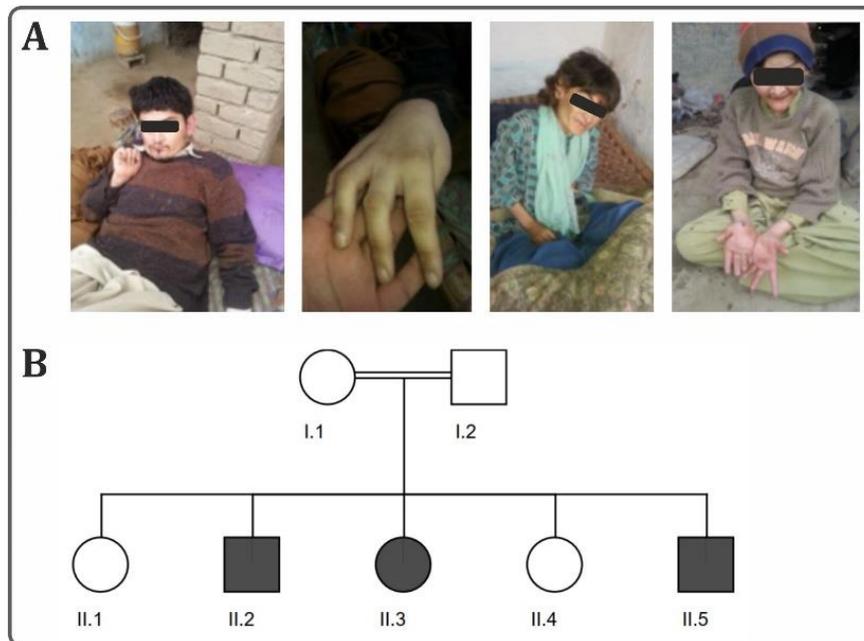


Abbildung 14.15: Informationen zu Familie PAK_13. (A) Patient II.2 (links und mitte links), Patientin II.3 (mitte rechts) und Patient II.5 (rechts). (B) Stammbaum der Familie PAK_13. Die Eltern (I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.16. Familie PAK_17

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_17 (Abbildung 14.16; II.1 und II.3) eine Skelettdysplasie. Den Fotos nach zu urteilen, weisen beide Patienten atrophe Extremitäten auf. Die Eltern (Abbildung 14.16; I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

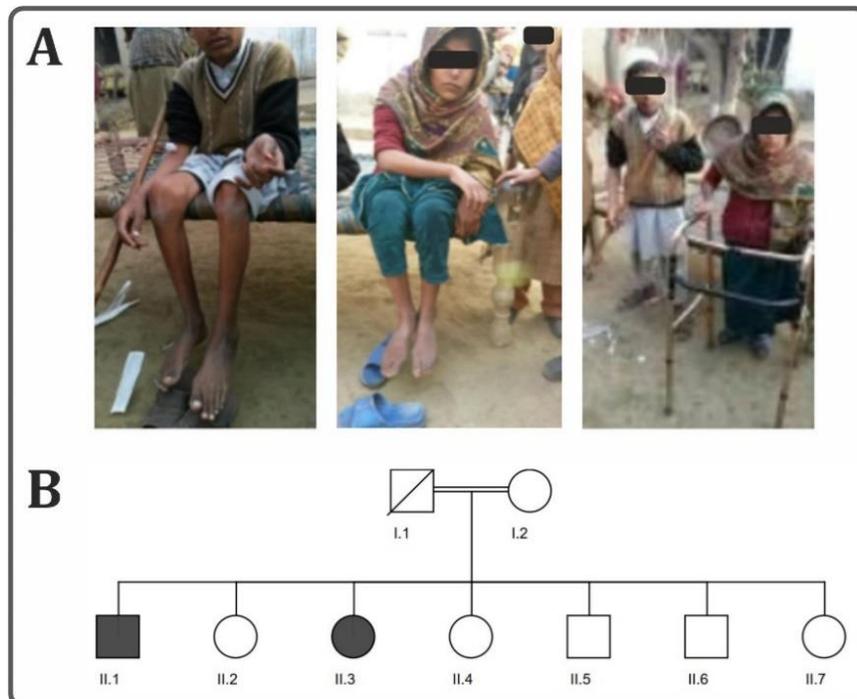


Abbildung 14.16: Informationen zu Familie PAK_17. (A) Patient II.1 (links), Patientin II.3 (mitte) und beide Geschwister auf einem Bild (rechts). (B) Stammbaum von Familie PAK_17. Die Eltern (I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.17. Familie PAK_19

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_19 (Abbildung 14.17; IV.1, V.1, V.2 und V.3) eine Intelligenzminderung sowie eine Skelettdysplasie. Die jeweiligen Eltern (Abbildung 14.17; III.1 und III.2; III.4 und IV.4) der Betroffenen sind blutsverwandt. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

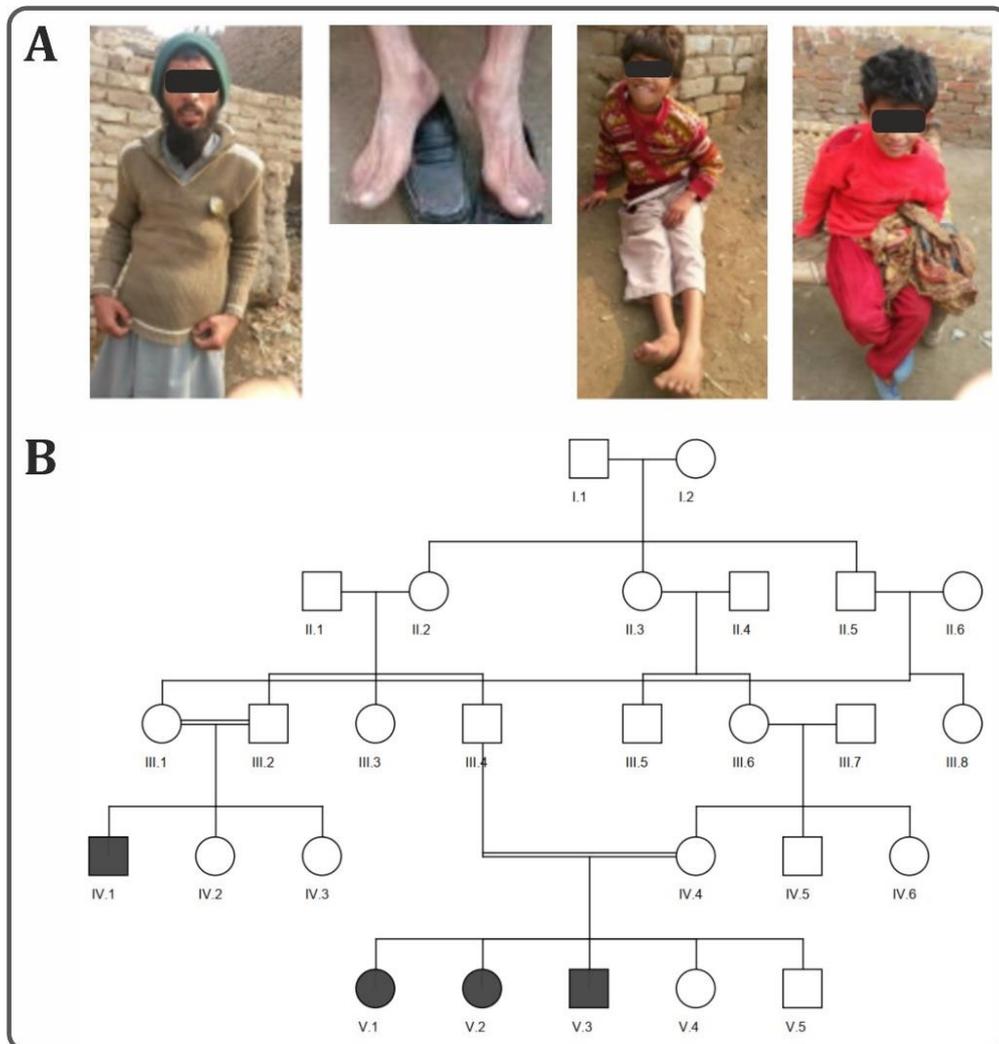


Abbildung 14.17: Informationen zu Familie PAK_19. (A) Patient IV.1 (links und mitte links), Familienmitglieder IV.3 (mitte rechts) und IV.5 (rechts). (B) Stammbaum von Familie PAK_19. Die jeweiligen Eltern (III.1 und III.2; III.4 und IV.4) der Betroffenen sind blutsverwandt. Da die beiden Familienmitglieder IV.3 und IV.5 im Stammbaum als gesund aufgeführt sind, könnte es sich hierbei um eine falsche Zuordnung der Bilder zu den Individuen des Stammbaums durch den Kollaborationspartner handeln.

14.4.18. Familie PAK_22

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_22 (Abbildung 14.18; IV.1, IV.4 und IV.5) eine Intelligenzminderung sowie eine Skelettdysplasie. Die Eltern (Abbildung 14.18; I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

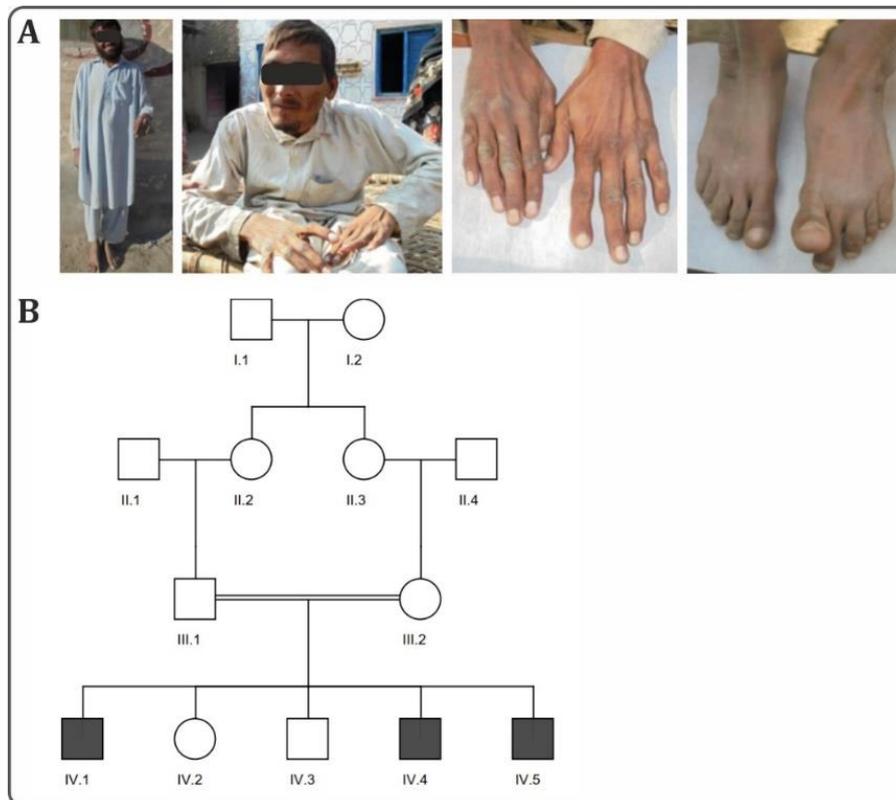


Abbildung 14.18: Informationen zu Familie PAK_22. (A) Patienten IV.4 (rechts) und IV.5 (mitte links, mitte rechts, rechts). (B) Stammbaum von Familie PAK_22. Die Eltern (I.1 und I.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.19. Familie PAK_24

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_24 (Abbildung 14.19; IV.3 und IV.5) eine syndromale Intelligenzminderung, eine Deformation des Sprunggelenks und ein heiteres Gemüt. Die jeweiligen Eltern der Betroffenen (Abbildung 14.19; III.1 und III.2; III.3 und III.4) sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

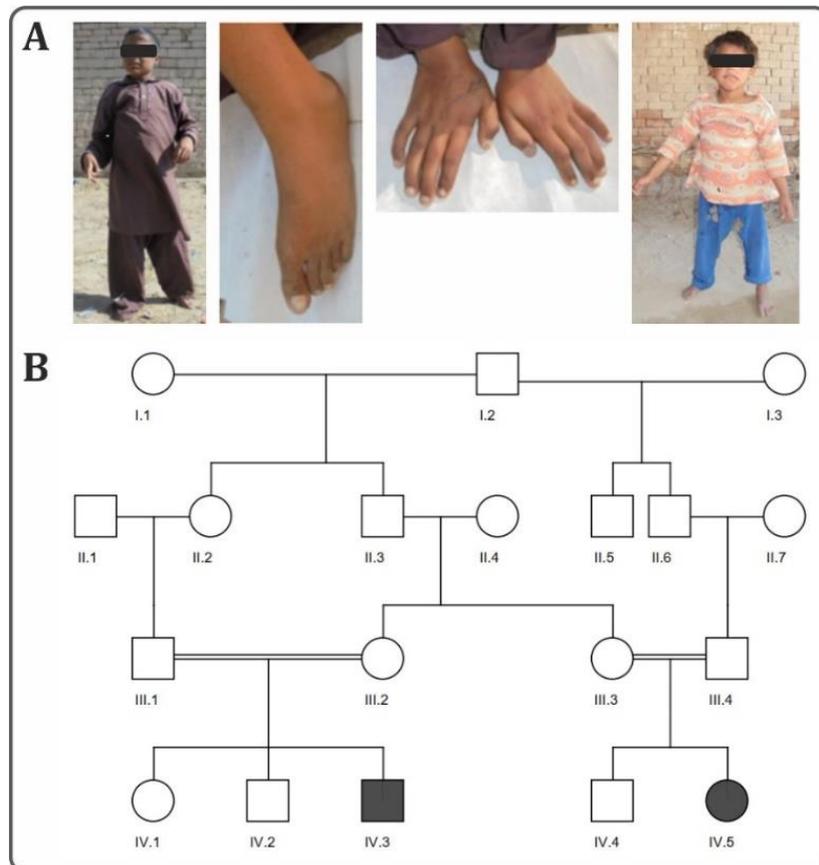


Abbildung 14.19: Informationen zu Familie PAK_24. (A) Patient IV.3 (links, mitte links, mitte rechts) und Patientin IV.5 (rechts). (B) Stammbaum von Familie PAK_24. Die jeweiligen Eltern der Betroffenen (III.1 und III.2; III.3 und III.4) sind Cousin und Cousine ersten Grades.

14.4.20. Familie PAK_26

Laut Angaben des Kollaborationspartners zeigen die Betroffenen aus Familie PAK_26 (Abbildung 14.20; IV.3, IV.4 und IV.5) eine Skelettdysplasie mit Fingergelenkkontrakturen, eingeschränkter Beweglichkeit des Ellenbogengelenks und des Halses, sowie einer Brustkorbfehlbildung (*Pectus excavatum*). Die Eltern (Abbildung 14.20; III.1 und III.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades. Weitere klinische oder anamnestische Informationen lagen nicht vor.

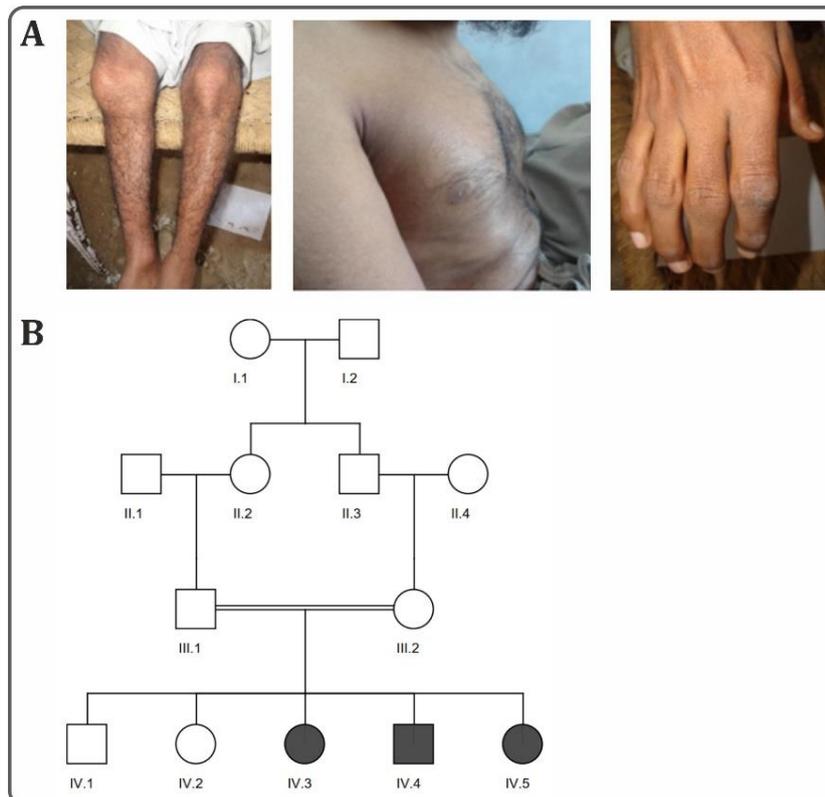


Abbildung 14.20: Informationen zu Familie PAK_26. (A) Patient IV.4. (B) Stammbaum von Familie PAK_26. Die Eltern (III.1 und III.2) der betroffenen Geschwister sind Cousin und Cousine ersten Grades.