

Aus dem  
CharitéCentrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit  
Perinatalzentrum und Humangenetik  
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie  
Direktor: Professor Dr. med. Christoph Hübner

## Habilitationsschrift

# Aufklärung genetisch determinierter neuropädiatrischer Krankheitsbilder mittels moderner molekulargenetischer Analysen

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Ellen Knierim**

Eingereicht: Oktober 2016

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Heymut Omran, Münster
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ulrich Stephani, Kiel

## ABKÜRZUNGEN

1. EINLEITUNG	3
2. EIGENE ARBEITEN	12

**Publikation 1:** KNIERIM E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D. Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. *PLoS One* 2011; 6:e28240. (IF=4,411)

**Publikation 2:** KNIERIM E, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D. CNVinspector - a web-based tool for the interactive evaluation of copy number variations in single patients and in cohorts. *J Med Genet.* 2013; 50: 529-33. (IF=6,340)

**Publikation 3:** KNIERIM E, Seelow D, Gill E, von Moers A, Schuelke M. Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous TK2 mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and status epilepticus. *Mitochondrion.* 2015; 20: 1-6. (IF=3.520)

**Publikation 4:** Rajab A, Morales-Gonzalez S, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Schuelke M, KNIERIM E. Recessive DEAF1 mutation associates with autism, intellectual disability, basal ganglia dysfunction and epilepsy. *J Med Genet.* 2015; 52: 607-611 (IF=6,340)

**Publikation 5:** KNIERIM E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner Ch, Stricker, S, Meierhofer D, Stenzel, W, Schuelke M. Mutations of the Activating Signal Cointegrator 1(ASC-1) Complex cause prenatal spinal muscular atrophy with congenital bone fractures. *Am J Hum Genet.* 2016; 98: 473-489 (IF=11,174)

3. DISKUSSION	58
4. ZUSAMMENFASSUNG	66
5. LITERATURANGABEN	67

DANKSAGUNG

ERKLÄRUNG

## ABKÜRZUNGEN

- CGH** Comparative Genomic Hybridization (vergleichende genomische Hybridisierung zur Suche nach Variationen der Kopienzahl oder nach größeren Deletionen)
- DNA** Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure oder DNS)
- 1000G** 1000 Genomes Project (1000-Genom-Projekt zur Ermittlung häufiger Polymorphismen in der gesunden Normalbevölkerung)
- NGS** Next Generation Sequencing (Hochdurchsatzsequenzierung)
- CNV** Copy Number Variation (Variation der Kopienzahl eines Gens oder einer chromosomalen Region)
- PCR** Polymerase Chain Reaction
- WES** Whole Exome Sequencing (Sequenzierung aller kodierenden Abschnitte des Genoms, der Exons und ihrer flankierenden intronischen Regionen)
- WGS** Whole Genome Sequencing (Sequenzierung des gesamten Genoms)
- HGMD** Human Gene Mutation Database (Datenbank mit bekannten Krankheitsmutationen)
- ExAC** Exome Aggregation Consortium (Datenbank der Ergebnisse von ca. 60.000 WES)
- HPO** Human Phenotype Ontology (Ontologie, die menschliche Krankheitssymptome hierarchisch strukturiert)
- FHM** Familiäre Hemiplegische Migräne

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Aktueller Stand der Genomforschung - Next Generation Sequencing

In den letzten Jahren hat die Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren zur DNA-Sequenzierung (Next Generation Sequencing, NGS) zu einem exponentiellen Wissenszuwachs und besseren Verständnis der monogenetischen Erkrankungen geführt. Mit der NGS-Technologie können alle kodierenden Regionen des Genoms gleichzeitig untersucht werden. Dieses Verfahren, verglichen mit herkömmlichen Kandidatengensequenzierungen mittels automatischer Sanger Sequenzierung, hat sich bei Patienten, bei denen eine monogenetische Erkrankung vermutet wird, als eine kosteneffektive und effiziente Methode erwiesen. Monogenetische Erkrankungen sind Erkrankungen, die durch Mutationen in einem Gen verursacht und nach den Mendel'schen Regeln vererbt werden. Ein Beispiel hierfür ist die zystische Fibrose, deren Mutationen im *CFTR*-Gen einem autosomal rezessiven Erbgang folgen. Ein weiteres Beispiel ist die Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie CMT1A, die häufigste erblich bedingte Krankheit des peripheren Nervensystems, die durch dominant vererbte Punktmutationen, Deletionen und Duplikationen im *PMP22*-Gen verursacht wird (Hoyle et al., 2015). In Abhängigkeit des Pathomechanismus kann eine Krankheit dominant (ein Allel ist mutiert) oder rezessiv (beide Allele sind mutiert) vererbt werden. Von den bisher bekannten ca. 25.000 proteinkodierenden Genen konnten bisher 4.712 Gene Krankheitsbildern zugeordnet werden (Quelle OMIM, Abfrage April 2016).

Bisher war die Sequenzierung nach Sanger (Sanger 1975) der Goldstandard in der molekularen Diagnostik monogenetischer Erkrankungen. Sie ist bis heute die Methode der Wahl für die klinisch-genetische Testung, wenn der Phänotyp eindeutig einem oder wenigen Genotyp(en) zuzuordnen ist. Für diesen Ansatz benötigt man eine klare Vermutung über den zugrunde liegenden Gendefekt, den es zu bestätigen gilt (Kandidatengenhypothese). Jedoch kann mittels der klassischen Sanger-Sequenzierung nur ein DNA-Segment auf einmal untersucht werden, was die Sanger-Methode sehr arbeitsaufwendig und zeitintensiv macht. Für Erkrankungen mit hoher genetischer Heterogenität wie zum Beispiel die Neuropathien oder die kongenitalen Muskeldystrophien (Hoyle et al., 2015, Bönnemann et al., 2014) hat sich die Einzelgensequenzierung als zu kostenaufwendig und ineffizient erwiesen (Neveling, 2013).

Mit der Einführung der NGS lassen sich parallel DNA-Abschnitte in einem einzigen Sequenzierlauf untersuchen (Muzzey et al., 2015). Der Prozess der Hochdurchsatz-Sequenzierung beginnt mit der Extraktion der DNA des betroffenen Individuums, meistens aus Leukozyten, die aus EDTA-Blut isoliert werden. Andere mögliche Gewebe sind Mundschleimhaut, gezüchtete Hautfibroblasten, Biopsiematerial oder Speichel. Die DNA wird anschließend in kleine Stücke von ca. 500 bp fragmentiert, mit Adaptoren versehen und dann in einer sogenannten Flow-Cell mittels PCR amplifiziert.

Die zu amplifizierenden Genabschnitte können entweder eine Auswahl von Genen repräsentieren (targeted approach) oder die kodierenden Regionen aller bekannten Gene des Genoms beinhalten. Die erste Strategie wird als **Panel Sequenzierung** und die zweite als **Whole-Exome-Sequencing (WES)** bezeichnet. Das Exom umfasst nur  $\approx 2,7\%$  des menschlichen Genoms. Man vermutet, dass ungefähr 85% aller krankheitsverursachenden Mutationen monogener Erkrankungen in den proteinkodierenden Abschnitten des Genoms zu finden sind. Ist das ganze Genom Ziel der Sequenzierung, sprechen wir von Whole-Genome Sequencing (WGS).

Es gibt verschiedene Sequenzierungsplattformen, die mit unterschiedlichen Technologien für die Parallelsequenzierung zur Verfügung stehen, z.B. Illumina (Synthese), Roche (Pyrosequencing) oder Life Technologies (Ligation). Im ersten Schritt werden dabei Millionen von kurzen Sequenzabschnitten, sogenannte „reads“ produziert, die eine Länge von 200-400 bp haben. Diese Sequenzabschnitte werden nun mit Hilfe bioinformatischer Programme interpretiert.

Zunächst werden sie an einem Referenzgenom ausgerichtet (Alignment), dann werden Übereinstimmungen und Abweichungen vom Referenzgenom an jeder einzelnen Basenposition überprüft (variant calling). Basen, die von der Referenzsequenz abweichen, werden „Varianten“ genannt, müssen nun nach ihrer Relevanz für die Entstehung der Krankheit beurteilt werden. Hierbei müssen für eine WES etwa 50.000 und für eine WGS etwa 3 Mio Varianten beurteilt werden.

In diesem Verfahren kommen verschiedene Filtermöglichkeiten zum Einsatz. Die Kunst besteht nun darin, sich in der Datenflut pathogener Veränderungen, Varianten mit unklarer Signifikanz und harmlosen Polymorphismen zu orientieren und auf der

Basis der genetischen Rohdaten in Zusammenschau mit dem Krankheitsphänotyp des Patienten eine molekulargenetische Diagnose zu stellen.

In meiner Habilitationsschrift beschäftige ich mich mit der Aufklärung genetisch determinierter neuropädiatrischer Krankheitsbilder mittels moderner molekulargenetischer Analysen. Hierbei handelt es sich überwiegend um Projekte, bei denen der Einsatz der NGS ein entscheidender Schritt zur Diagnosestellung war. In Publikation 1 beschäftige ich mich mit grundlegenden methodischen Aspekten, die davon handeln, mit welchen Verfahren DNA für die Hochdurchsatzsequenzierung aufbereitet werden kann und welchen Einfluss die jeweilige Aufbereitungsmethode auf das Ergebnis der Hochdurchsatz-Sequenzierung hat. In den Publikationen 3, 4 und 5 beschreibe ich unterschiedliche Vorgehensweisen und Auswertestrategien, die jeweils dazu geführt haben, den zugrundeliegenden krankheitsverursachenden Gendefekt aufzudecken. In Publikation 5 beschreibe ich ein neues Krankheitsbild und identifiziere als Erstbeschreiberin den zugrundeliegenden, bislang unbekanntem Gendefekt. In weiterführenden zellbiologischen Experimenten habe ich die dem neu beschriebenen Gendefekt zugrundeliegenden Pathomechanismen untersucht.

## **1.2 Array CGH**

Ein weiteres Verfahren, das in den letzten Jahren Einzug in die Diagnostik zur Aufklärung neuropädiatrischer Erkrankungen gehalten hat, ist die genomweite Analyse mittels Array-CGH (array-basierte Comparative Genom-Hybridisierung). Die Array-CGH ermöglicht den Nachweis von Verlusten und Gewinnen an genomischer DNA. Gegen ein Raster immobilisierter DNA-Fragmente wird eine vergleichende genomische Hybridisierung durchgeführt und das Verhältnis der Fluoreszenzsignale der Patienten- und Referenz-DNA bestimmt (Pinkel et al., 2005). Der Einsatz hochauflösender molekular-zytogenetischer Methoden wie der Array-CGH erlaubt die genomweite Detektion submikroskopischer Chromosomenveränderungen wie Mikrodeletionen oder Mikroduplikationen, sogenannter „Copy Number Variations“ (CNVs), die insbesondere bei komplexeren Krankheitsbildern, Dysmorphien und Syndromen eine große Rolle spielen. Bei Kindern mit mentaler Retardierung und unauffälliger konventioneller Chromosomenanalyse findet sich bei etwa 10-20% der Patienten eine mit-

tels Array-CGH nachweisbare Mikroaberration, durch welche die klinische Symptomatik sich erklären lässt (Cooper et al., 2011).

Auch bei dieser Methode gilt es, die Datenflut gegen Variationen, die in der Normalbevölkerung vorkommen, abzugleichen und dadurch eine valide Beurteilung der vorliegenden Variante sicherzustellen. In Publikation 2 beschäftige ich mich mit der Visualisierung und Interpretation der Daten, die mit dieser Technologie generiert werden.

### 1.3 Welche Untersuchung ist für meine Bedürfnisse geeignet?

Unter einem Diagnostik-Panel versteht man die gleichzeitige Sequenzierung aller Gene, die an der Entstehung einer bestimmten Gruppe von Erkrankungen beteiligt sind. Die Methode der **Panelsequenzierung** ist deutlich schneller und kostengünstiger als die herkömmlichen Einzelgensequenzierungen. Durch die parallele Sequenzierung von bis zu mehreren hundert Genen findet man die genetische Ursache der Krankheiten wesentlich häufiger.

So werden mittlerweile zahlreiche Genpanel aus den unterschiedlichsten Bereichen, zum Beispiel aus der Gruppe der neuromuskulären Erkrankungen oder der Epilepsien, angeboten. Ist das Krankheitsbild umschrieben und einer übergeordneten Krankheitsgruppe zuzuordnen, ist die Panel-Sequenzierung die Methode der Wahl zur Sicherung der molekularen Diagnose. Durch die Panel-Diagnostik können Veränderungen in den untersuchten Genen mit hoher Genauigkeit ausgeschlossen oder identifiziert werden, da die jeweiligen Gene gut abgedeckt und die technischen Voraussetzungen optimiert sind. Diese hohe Genauigkeit ist ein großer Vorteil gegenüber der Gesamtgenom/-exom-Sequenzierung. Zudem wird das Auffinden von Zufallsbefunden, die nicht im Zusammenhang mit der untersuchten Erkrankung stehen, praktisch ausgeschlossen. Insgesamt führen die Diagnostik-Panels zu deutlich höheren Aufklärungsquoten als die Kandidatengensequenzierung, stehen als schnelle, effiziente und kostengünstige Methode zur Verfügung und werden inzwischen auch von den Kostenträgern erstattet.

Beim **WES**, bei dem alle proteinkodierenden Bereiche des menschlichen Genoms gleichzeitig sequenziert werden, hat man im Vergleich zur Panel-Sequenzierung, die Möglichkeit, auch neue Erkrankungen und Gendefekte zu entdecken, da die Se-

quenzierung nicht auf schon bekannte krankheitsverursachende Gene beschränkt ist.

Für die hierbei gewonnenen Vorteile nimmt man an anderen Stellen Nachteile in Kauf. Die Abdeckung bei der Exomsequenzierung ist längst nicht so hoch und homogen wie bei der Panelsequenzierung. Es kommt vor, dass nicht alle Bereiche ausreichend abgedeckt sind. Aufgrund der vielen Bereiche im Genom, deren Veränderungen bei der Entstehung von Krankheiten unbekannt sind, werden viele Daten generiert, die schwierig zu interpretieren sind. Neben den vielen unklaren Varianten besteht bei der Exomsequenzierung die Möglichkeit, dass unbeabsichtigt Zufallsbefunde erhoben werden können, die mit dem eigentlichen Krankheitsbild nichts zu tun haben. Wie mit solchen Befunden zu verfahren ist, muss im Vorfeld mit den Patienten und deren Eltern geklärt werden. Das WES ist demzufolge zu empfehlen, wenn eine genetische Ursache vermutet wird, sich die Symptome jedoch nicht sicher einer bestimmten Erkrankungsgruppe zuordnen lassen und die Möglichkeit besteht, dass es sich um eine bislang unbekannte genetische Erkrankung handelt.

Im Vergleich zum WES, bei der alle proteincodierenden Bereiche der ca. 25.000 bekannten Gene angereichert und sequenziert werden, wird beim **Clinical Exome Sequencing** nur ein Teil des Exoms angereichert. Hierbei fokussiert man sich auf bekannte krankheitsassoziierte Gene, die in der Human Gene Mutation Database (HGMD) und der OMIM Datenbank beschrieben sind. Die so angereicherte Region umfasst derzeit fast 5.000 Gene und damit fast 62.000 Exons. Bei dieser Variante, einem Mittelweg zwischen Exomsequenzierung und Panelsequenzierung, bleibt die Möglichkeit, neue Phänotypen einer schon bekannten Krankheitsentität zu entdecken und somit das Wissen um die Genotyp-Phänotyp Relation einer bestimmten Erkrankung zu erweitern. Hierzu läuft an unserer Klinik derzeit eine große Studie als Kooperationsprojekt zwischen dem Institut für Humangenetik / medizinische Genetik und der Kinderklinik der Charité (MENDEL-Studie, siehe Diskussion).

#### **1.4 Auswertestrategien der Ergebnisse einer Exom-Sequenzierung und Interpretation der Varianten**

Neue Gensequenzierungstechniken bieten die Möglichkeit, genetische Krankheitsursachen auch in Einzelfamilien aufzuklären, bei denen entweder mehrere Kinder be-

troffen sind oder die Eltern blutsverwandt sind. Wir wählen hierfür eine Kombination aus Genmapping und Exom-Sequenzierung. Es handelt sich um einen effektiven Ansatz, da erst krankheitsverursachende Abschnitte des menschlichen Genoms zu identifiziert werden und dann die darin liegenden klinisch relevanten Krankheitsmutationen aufgespürt werden. In diesem Verfahren wird in einem ersten Schritt das Exom mittels NGS sequenziert. In einem zweiten analytischen Schritt werden mittels Homozygotie-Kartierung oder „Identity-by-state“ Analyse größere Regionen, die immer noch mehrere hundert Gene umfassen können, herausgefiltert und analysiert. Hierdurch gelingt eine deutliche Reduktion der zu untersuchenden Varianten.

Klassischerweise gilt für eine erfolgreiche Homozygotie-Kartierung die Voraussetzung, dass die Eltern eines erkrankten Kindes blutsverwandt sein müssen. Die Methode der Homozygotie-Kartierung kann jedoch auch bei einzelnen Betroffenen aus nicht konsanguinen Familien erfolgreich angewandt werden kann, wenn es sich um Founder-Mutationen in einer bestimmten Bevölkerungsgruppe handelt (Hildebrandt et al., 2009). Mit Hilfe des „Identity-by-state“ Konzeptes können genomische Bereiche, die bei mehreren Betroffenen übereinstimmen, in nicht konsanguinen Familien ermittelt werden (Thompson et al., 2013). In diesen Bereichen verbergen sich dann auch die Krankheitsmutationen, meistens als compound heterozygote Mutationen. So können auch bei Kindern nicht verwandter Eltern die Bereiche, in denen sich die krankmachende Veränderung befindet, eingeeengt werden und die Krankheitsursache identifiziert werden (Knierim et al., 2015). Wir nutzen für die Homozygotie-Kartierung das im Internet frei zugängliche Programm HomozygosityMapper, welches durch unsere Arbeitsgruppe entwickelt wurde. Der HomozygosityMapper (<http://www.homozygositymapper.org>) ermöglicht die rasche Identifizierung gemeinsamer homozygoter Regionen in einer Gruppe von Patienten (zum Beispiel aus der gleichen Familie oder Personen mit klinisch ähnlichen Krankheitsbildern; Seelow und Schuelke, 2012). Hierfür können Daten genutzt werden, die auf Affymetrix® SNP Chip-basierten Verfahren gewonnen wurden, ebenso können NGS-generierte Daten eingespeist werden.

Ein großes Problem der Hochdurchsatzsequenzierung ist die Menge an Daten, aus denen einzelne krankheitsverursachende Varianten herausgefiltert werden müssen. Bereits bei der WES werden in der Regel  $\approx 50.000$  Varianten identifiziert. Zunächst filtern wir die vorhandenen Varianten gegen Varianten aus Datenbanken wie zum

Beispiel der ExAC Datenbank (Exome Aggregation Consortium, <http://ExAC.broadinstitute.org/>) oder dem 1000 Genomes Projekt (1000 Genomes Project, Nature 2015). Es handelt sich um Daten, die im Rahmen groß angelegter Sequenzierungsprojekte gesammelt wurden. Durch einen Abgleich der Allelfrequenzen mit den in den Datenbanken vorhandenen Varianten können häufige und harmlose Polymorphismen als Krankheitsursache ausgeschlossen werden. Bei der Filterung und Priorisierung der verbleibenden Varianten kommen bioinformatische Programme zum Einsatz, welche mit Hilfe eines naiven Bayes-Klassifikators auf der Basis bekannter Genmutationen Vorhersagen über die funktionellen Auswirkungen unbekannter Varianten treffen können. In erster Linie arbeiten wir mit dem **MutationTaster2**, der von unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde (Schwarz et al., 2014, <http://www.mutationtaster.org>). MutationTaster2, ein Programm zur automatischen Evaluierung von Genvarianten, ist insbesondere geeignet, die zahlreichen Sequenzvarianten, die mittels neuer Sequenzierungstechnologien gefunden werden, hinsichtlich ihrer möglichen Pathogenität zu bewerten. MutationTaster2 ist web-basiert, kostenlos und wird von Gruppen aus aller Welt verwendet. Der Webservice zur automatischen Analyse von Varianten (\*.VCF)-Dateien wurde bislang zur Auswertung von mehr als 1,5 Milliarden Varianten genutzt bei ca. 2 Millionen Einzelabfragen pro Tag. Neben der Möglichkeit zur Bewertung synonyme und nicht-kodierender Varianten ist MutationTaster2 auch in der Vorhersagegenauigkeit anderen Programmen wie SIFT oder PolyPhen-2 überlegen (Schwarz et al., 2014). Die Varianten aus einer vollständigen Exomsequenzierung können in 10 Minuten analysiert werden. Dank der Verwendung effektiver Filterstrategien wird dabei eine Falsch-Positiv-Rate von nur  $\approx 1\%$  erreicht.

**GeneDistiller** (<http://www.genedistiller.org>) ist eine Geninformation-basierte Datenbank, die bei der Priorisierung von Genen, die in einem bestimmten Intervall oder einer Region liegen, behilflich ist. Unter Berücksichtigung von Expressionsdaten und Interaktionspartnern kann somit eine Reihenfolge der Gene erstellt werden, die möglicherweise als Krankheitsgen in Frage kommen (Seelow et al., 2008).

Ein Programm, das im Rahmen unserer gemeinsamen Studie mit der Humangenetik zum Einsatz kommt, ist **PhenIX**. Das Programm ist ebenfalls im Internet frei zugänglich (<http://compbio.charite.de/PhenIX/>) und ermöglicht eine Priorisierung der genetischen Varianten anhand der klinischen Symptome des Patienten. Bei der Priorisie-

rung mit PhenIX wird zum einen die vorhergesagte Auswirkung auf molekularer Ebene berücksichtigt. Zum anderen wird die Übereinstimmung der assoziierten Krankheitsbilder mit den phänotypischen Merkmalen des Patienten gewertet. Die phänotypischen Eigenschaften wurden anhand der **“Human Phenotype Ontology”** (HPO) kodiert. Die HPO ist ein semantisches hierarchisches Netzwerk zur Abbildung aller klinischen Symptome, die bei Patienten mit genetischen Erkrankungen gefunden werden können (Köhler et al., 2014). Die PhenIX Software ermöglicht eine Priorisierung der genetischen Varianten anhand des klinischen Phänotyps und dient somit der Aufdeckung krankheitsverursachender Varianten in unseren Patienten (Zemojtel et al., 2014).

### **1.5 Funktionelle Verifizierung gefundener Varianten**

Zunächst werden mögliche pathogene Veränderungen mittels konventioneller Sanger Sequenzierung bestätigt. Zudem untersuchen wir damit die Segregation der Variante mit dem Phänotyp in der Familie. Weitere Tests sind die Konservierung der betroffenen Aminosäureposition in der Evolution durch Multispecies-Alignment und die Bestimmung der Allelfrequenz für die jeweilige Variante in unterschiedlichen ethnischen Gruppen, insbesondere aber in der Herkunftsgruppe des Patienten.

In Abhängigkeit der gefunden genetischen Veränderungen erfolgt eine funktionelle Verifizierung der Krankheitsmutationen in Patientenzellen, z.B. durch Western Blot (Abwesenheit des Proteins bei nonsense-Mutationen) oder durch eine Wiederherstellung der biochemischen Zellfunktion durch Einbringen einer korrekten Genkopie mittels Transfektion.

Weitere Möglichkeiten, die Pathogenität eines Gendefektes zu bestätigen ist das Tiermodell. Je nach Vorhandensein kann man gelegentlich auf ein schon existierendes Mausmodell zurückgegriffen werden, welches man einfach beim Jackson Laboratory (Maine) bestellen kann. Oft kommt es jedoch vor, dass für den neu entdeckten Gendefekt noch kein Tiermodell etabliert ist. Hierbei bietet sich bei entwicklungsneurologischen Fragestellungen, wo häufig der Fokus auf dem korrekten Zusammenspiel von Nerven und Muskeln liegt, der Zebrafisch als Tiermodell an. Im Zebrafisch ist das vorübergehende Abschalten bestimmter Gene durch die Injektion von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden (kurz „Morpholinos“), in die befruchtete Oozyte

möglich. Diese binden an die prä-mRNA eines bestimmten Gens und verhindern damit das korrekte Splicing und somit Produktion des entsprechenden Proteins. Im Gegensatz zur knockout-Maus, deren Erzeugung langwierig ist, können mit der Morpholino-Methode innerhalb kurzer Zeit eine Vielzahl relevanter Genen abgeschaltet und die Auswirkungen untersucht werden (Schredelseker et al, 2009). Diese Methode ist besonders attraktiv für Gene, die in der Entwicklung des Nervensystems oder des neuromuskulären Systems eine Rolle spielen, da man aufgrund der schnellen Entwicklung des Zebrafischembryos über nur wenige Tage, einen Effekt auf den Phänotyp rasch beobachten kann.

## 2. EIGENE ARBEITEN

**Publikation 1: KNIERIM E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D. Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. PLoS One 2011; 6:e28240. (IF=4,411)**

Durch Whole Exome Sequencing (WES) wurden viele genetische Defekte aufgedeckt. Damit die NGS-Technologie in die klinische Diagnostikroutine Einzug halten kann, ist es wichtig, Arbeitsabläufe für Hochdurchsatzverfahren zu vereinfachen. Es gibt verschiedene Verfahren, die Proben für die Sequenzierung aufzuarbeiten. Nahezu allen Verfahren ist die Fragmentierung der hochmolekularen doppelsträngigen DNA zu Beginn des Aufbereitungsprozesses gemein. Folgende mögliche Techniken kommen zum Einsatz: **(1) Nebulisierung:** Hier wird die DNA mit Hilfe komprimierten Stickstoffs durch eine kleine Öffnung gedrängt und somit zufällig mechanisch zerkleinert. **(2) Sonifikation:** Hierbei wird die DNA mittels Ultraschallwellen geschert und in kleinere Stücke zerteilt. **(3) Enzymatischer Verdau:** Hierbei wird die DNA mit Hilfe einer Endonuklease zufällig in 100-800 bp lange Stücke zerteilt. In dieser Arbeit untersuche ich den Einfluss der drei Fragmentierungsmethoden von Longe-Range PCR-Produkten auf das Sequenzierungsergebnis. Durch alle drei Methoden wurden qualitativ hochwertige Sequenzierungsbibliotheken produziert und gute Ergebnisse bezüglich der Sequenzierungsqualität gemessen am PHRED-Score und der Read-Länge erzielt. Mit der enzymatischen Fragmentierung wurden die beständigsten Ergebnisse innerhalb der drei Bibliotheken erstellt, waren aber im Vergleich zur Sonifikation oder Nebulisierung in den Rohsequenzen etwas schlechter bezüglich der Insertions-/ Deletionsfehler. Nach dem Filtern auf Homopolymerfehler führte die enzymatische Fragmentierung verglichen mit dem Goldstandard der Sanger-Sequenzierung zu den besten Ergebnissen. Zusammenfassend kommen wir zu der Aussage, dass alle drei Methoden geeignet sind, PCR-Produkte zu fragmentieren, und dass der Einsatz ganz nach den Bedürfnissen des jeweiligen Labors oder entsprechend dem experimentellen Design gewählt werden kann.

**Knierim E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D (2011)**

Systematic Comparison of Three Methods for Fragmentation of Long-Range PCR Products for Next Generation Sequencing.

PLoS ONE 6(11): e28240.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028240>

**Knierim E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D (2011)**

Systematic Comparison of Three Methods for Fragmentation of Long-Range PCR Products for Next Generation Sequencing.

PLoS ONE 6(11): e28240.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028240>

**Knierim E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D (2011)**

Systematic Comparison of Three Methods for Fragmentation of Long-Range PCR Products for Next Generation Sequencing.

PLoS ONE 6(11): e28240.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028240>

**Knierim E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D (2011)**

Systematic Comparison of Three Methods for Fragmentation of Long-Range PCR Products for Next Generation Sequencing.

PLoS ONE 6(11): e28240.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028240>

**Knierim E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D (2011)**

Systematic Comparison of Three Methods for Fragmentation of Long-Range PCR Products for Next Generation Sequencing.

PLoS ONE 6(11): e28240.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028240>

**Knierim E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D (2011)**

Systematic Comparison of Three Methods for Fragmentation of Long-Range PCR Products for Next Generation Sequencing.

PLoS ONE 6(11): e28240.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028240>

**Publikation 2: KNIERIM E, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D. *CNVinspector* - a web-based tool for the interactive evaluation of copy number variations in single patients and in cohorts. J Med Genet. 2013; 50: 529-33. (IF=6,340)**

Viele genetische Erkrankungen sind durch Veränderungen der Kopienanzahl (CNV) im menschlichen Genom verursacht und spielen in der genetischen Diagnostik bei Kindern mit Entwicklungsstörungen und/oder geistiger Behinderung eine große Rolle. Jedoch erschwert die große Anzahl "gutartiger" CNV-Polymorphismen das Auffinden krankheitsverursachender Varianten. Um CNVs in Patienten leichter auf ihr Krankheitspotential hin beurteilen zu können, haben wir eine Web-basierte Software mit dem Namen *CNVinspector* entwickelt. Mit Hilfe einer benutzerfreundlichen Oberfläche kann man eigene Daten einladen und somit Patienten-spezifische mit bekannten CNVs vergleichen. Man kann sowohl Übereinstimmungen mit bekannten krankheitsverursachenden CNVs suchen als auch CNVs herausfiltern, die nicht bei gesunden Probanden auftreten. Die Software greift auf große internationale Datenbanken zu, die Ergebnisse genomweiter Studien zu komplexen Erkrankungen gesunder und erkrankter Personen enthalten. Des Weiteren sind Daten aus der DECIPHER-Datenbank (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) integriert, in der CNVs von Patienten und die damit verbundenen Phänotypen erfasst sind.

Neben der Analyse einzelner Patienten können auch Kohorten miteinander verglichen werden. Es ist möglich, Maximal- und Mindesthäufigkeiten sowie-frequenzen in Patienten und Kontrollen anzugeben. Somit können Zugewinn oder Verlust bestimmter CNVs als Krankheitsursache identifiziert werden. Der Benutzer kann sich auch nur solche CNVs anzuzeigen lassen, die in einer Kohorte deutlich häufiger auftreten als in einer anderen. Um artifizielle Unterschiede durch den Einsatz verschiedener technischer Plattformen und Untersuchungsmethoden auszuschließen bietet das Programm die Möglichkeit, den Vergleich auf die CNVs zu begrenzen, die mit einer identischen Methode detektiert wurden. Die gefundenen CNVs werden sowohl als Liste als auch visuell an ihrer genomischen Position dargestellt. Zusätzlich werden die in den Regionen liegenden Gene angezeigt, um rasch mögliche Krankheitsgene zu erkennen.

Durch verschiedene Filtermöglichkeiten vereinfacht *CNVinspector* die tägliche Arbeit des klinischen Genetikers und beschleunigt die Zuordnung bekannter und neuer syndromaler Erkrankungen und Genfunktionen. *CNVinspector* ist unter <http://www.cnvinspector.org> frei im Internet zugänglich.

**CNVInspector: a web-based tool for the interactive evaluation of copy number variations in single patients and in cohorts**

Ellen Knierim, Jana Marie Schwarz, Markus Schuelke, Dominik Seelow

J Med Genet 2013;50:8 529-533 Published Online First: 31 May 2013

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101497>

**CNVinspector: a web-based tool for the interactive evaluation of copy number variations in single patients and in cohorts**

Ellen Knierim, Jana Marie Schwarz, Markus Schuelke, Dominik Seelow

J Med Genet 2013;50:8 529-533 Published Online First: 31 May 2013

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101497>

**CNVinspector: a web-based tool for the interactive evaluation of copy number variations in single patients and in cohorts**

Ellen Knierim, Jana Marie Schwarz, Markus Schuelke, Dominik Seelow

J Med Genet 2013;50:8 529-533 Published Online First: 31 May 2013

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101497>

**CNVinspector: a web-based tool for the interactive evaluation of copy number variations in single patients and in cohorts**

Ellen Knierim, Jana Marie Schwarz, Markus Schuelke, Dominik Seelow

J Med Genet 2013;50:8 529-533 Published Online First: 31 May 2013

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101497>

**CNVinspector: a web-based tool for the interactive evaluation of copy number variations in single patients and in cohorts**

Ellen Knierim, Jana Marie Schwarz, Markus Schuelke, Dominik Seelow

J Med Genet 2013;50:8 529-533 Published Online First: 31 May 2013

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101497>

**Publikation 3: KNIERIM E, Seelow D, Gill E, von Moers A, Schuelke M. Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous *TK2*-mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and *status epilepticus*. Mitochondrion. 2015; 20: 1-6. (IF=3.520)**

Kennzeichen mitochondrialer Depletionssyndrome ist eine massive Reduktion des Gehalts an mitochondrialer DNA. Das Krankheitsbild dieser im frühen Kindesalter auftretenden Erkrankungsgruppe ist heterogen, und somit kann man kaum vom klinischen Phänotyp auf den genetischen Defekt schließen. Zahlreiche Gendefekte wurden bisher beschrieben, die bei der Synthese und dem Erhalt mitochondrialer DNA eine Rolle spielen. Die beiden Brüder nicht-konsanguiner Eltern, deren Gendefekt ich in dieser Publikation identifiziere, wurden über mehrere Jahre aufgrund einer schweren Muskelerkrankung mit konsekutiver Ateminsuffizienz sowie einer komplizierten Epilepsie in der Kinderklinik der Charité behandelt. Die Muskeln degenerierten vollständig zu Fettgewebe, die Patienten befanden sich im anhaltenden *Status epilepticus* und das Gehirn zeigte einen dramatischen Verlust an grauer und weißer Substanz. Trotz umfangreicher Diagnostik konnte die Ätiologie der zum Tode führenden Amyotrophie für lange Zeit nicht geklärt werden. Mit Hilfe des Einsatzes der NGS-Technologie und spezieller Datenanalyseverfahren habe ich den zugrundeliegenden Gendefekt gefunden und den Phänotyp des Krankheitsbildes genauer definieren können. Mit Hilfe der „Identity-by-state“-Analyse lassen sich die Regionen ermitteln, die von beiden Betroffenen geteilt werden. Durch diesen Algorithmus kann man auch in nicht konsanguinen Familien die Region eingrenzen, in der sich die krankheitsverursachende Mutationen befinden müssen, vorausgesetzt mindestens zwei Kinder der Familie sind erkrankt. Mittels WES habe ich dann eine compound heterozygote Mutation im Tymidinkinase-2 (*TK2*) Gen gefunden. Der Gehalt mitochondrialer DNA im Muskel der Patienten war auf 8,5% vermindert. Durch diese Arbeit konnte der Phänotyp des Krankheitsbildes erweitert werden und wir konnten zeigen, wie der Einsatz moderner molekulargenetischer Untersuchungstechniken eine genetische Diagnose auch in nicht konsanguinen Familien ermöglicht. Durch den frühzeitigen Einsatz genetischer Diagnostik können in Zukunft Patienten-belastende diagnostische Eingriffe wie Muskelbiopsien und Untersuchungen in Narkose vermieden werden.

**Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous TK2-mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and status epilepticus**

Ellen Knierim, Dominik Seelow, Esther Gill, Arpad von Moers, Markus Schuelke

Mitochondrion. 2015 Jan;20:1-6.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.10.007>

**Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous TK2-mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and status epilepticus**

Ellen Knierim, Dominik Seelow, Esther Gill, Arpad von Moers, Markus Schuelke

Mitochondrion. 2015 Jan;20:1-6.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.10.007>

**Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous TK2-mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and status epilepticus**

Ellen Knierim, Dominik Seelow, Esther Gill, Arpad von Moers, Markus Schuelke

Mitochondrion. 2015 Jan;20:1-6.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.10.007>

**Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous TK2-mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and status epilepticus**

Ellen Knierim, Dominik Seelow, Esther Gill, Arpad von Moers, Markus Schuelke

Mitochondrion. 2015 Jan;20:1-6.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.10.007>

**Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous TK2-mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and status epilepticus**

Ellen Knierim, Dominik Seelow, Esther Gill, Arpad von Moers, Markus Schuelke

Mitochondrion. 2015 Jan;20:1-6.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.10.007>

**Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous TK2-mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and status epilepticus**

Ellen Knierim, Dominik Seelow, Esther Gill, Arpad von Moers, Markus Schuelke

Mitochondrion. 2015 Jan;20:1-6.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.10.007>

**Publikation 4: Rajab A, Morales-Gonzalez S, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Schuelke M, KNIERIM E. Recessive *DEAF1* mutation associates with autism, intellectual disability, basal ganglia dysfunction and epilepsy. J Med Genet. 2015; 52: 607-611 (IF=6,340)**

In dieser Veröffentlichung charakterisiere ich einen 2014 beschriebenen neuen Gendefekt genauer und erweitere den klinischen Phänotyp. Zum ersten Mal beschreibe ich einen autosomal-rezessiven Erbgang für diese Erkrankung, bei der Patienten an autistischem Verhalten, geistiger Behinderung, einer Bewegungsstörung und epileptischen Anfällen leiden. Es gibt zahlreiche Gendefekte, die mit Autismus, mentaler Retardierung und Epilepsie assoziiert sind. Kombiniert man diese drei Suchbegriffe und sucht in der Datenbank OMIM, findet man 34 Einträge. Das Gen *DEAF1* ist nicht darunter, denn es war bisher nur unter dem autosomal-dominant vererbten Krankheitsbild mit mentaler Retardierung, Autismus und Sprachentwicklungsverzögerung beschrieben. *DEAF1* kodiert für ein Zinkfingerprotein, das in der Regulation und Repression von Transkription eine Rolle spielt. In unserer aus dem Oman stammenden, konsanguinen Familie sind drei Kinder erkrankt. Sie leiden unter einer schweren extrapyramidalen Bewegungsstörung, Krampfanfällen, mentaler Retardierung und autistischem Verhalten. Um den Gendefekt zu finden, verfolgten wir eine Strategie aus einer Kombination von Homozygotie-Kartierung und WES. Mithilfe der Homozygotie-Kartierung gelang es uns, in der konsanguinen Familie den Bereich einzugrenzen, in dem sich die krankheitsverursachende Mutation befinden musste. Mittels WES gelang es dann, die homozygote Splice-site Mutation im *DEAF1*-Gen zu finden. Durch die Mutation kommt es zu einem Exon-skipping auf der mRNA Ebene, und wir konnten nachweisen, dass bei den Betroffenen nur noch 5% der Kopienzahl des Wildtyps vorlagen. Bisher war für Erkrankungen, ausgelöst durch Mutationen im *DEAF1*-Gen, ein dominante Vererbungsmodus beschrieben, möglicherweise durch einen dominant negativen Effekt bedingt. In unserer Familie tragen die Eltern der betroffenen Kinder die Mutation ebenfalls heterozygot, sind jedoch vollständig gesund. Wir konnten damit zeigen, dass eine Gendosisreduktion auf ca. 50% noch keinen krankheitsverursachenden Effekt hat, eine Reduktion auf 5 % der Gendosis jedoch einen schweren Phänotyp verursacht.

**Recessive DEAF1 mutation associates with autism, intellectual disability,  
basal ganglia dysfunction and epilepsy.**

Rajab A, Schuelke M, Gill E, Zwirner A, Seifert F, Morales Gonzalez S, Knierim  
E.

J Med Genet. 2015 Sep;52(9):607-11.

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103083>

**Recessive DEAF1 mutation associates with autism, intellectual disability,  
basal ganglia dysfunction and epilepsy.**

Rajab A, Schuelke M, Gill E, Zwirner A, Seifert F, Morales Gonzalez S, Knierim  
E.

J Med Genet. 2015 Sep;52(9):607-11.

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103083>

**Recessive DEAF1 mutation associates with autism, intellectual disability,  
basal ganglia dysfunction and epilepsy.**

Rajab A, Schuelke M, Gill E, Zwirner A, Seifert F, Morales Gonzalez S, Knierim  
E.

J Med Genet. 2015 Sep;52(9):607-11.

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103083>

**Recessive DEAF1 mutation associates with autism, intellectual disability,  
basal ganglia dysfunction and epilepsy.**

Rajab A, Schuelke M, Gill E, Zwirner A, Seifert F, Morales Gonzalez S, Knierim  
E.

J Med Genet. 2015 Sep;52(9):607-11.

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103083>

**Recessive DEAF1 mutation associates with autism, intellectual disability,  
basal ganglia dysfunction and epilepsy.**

Rajab A, Schuelke M, Gill E, Zwirner A, Seifert F, Morales Gonzalez S, Knierim  
E.

J Med Genet. 2015 Sep;52(9):607-11.

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103083>.

**Publikation 5: KNIERIM E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner Ch, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel, W, Schuelke M. Mutations of the Activating Signal Cointegrator 1 (ASC-1) Complex cause prenatal spinal muscular atrophy with congenital bone fractures. Am J Hum Genet. 2016; 98: 473-489 (IF=11,174)**

Die willkürliche Bewegung von Menschen und Tieren erfordert das hochpräzise Zusammenspiel von Nerven, Muskeln und Knochen. Doch wie entsteht diese „neuromuskuläre Einheit“ während der frühen Embryonalentwicklung, und welche Gene spielen hierbei eine Rolle? Diese Fragen stellten wir uns insbesondere bei Patienten, die bereits mit Knochenbrüchen auf die Welt kamen und sich schon als Neugeborene weder richtig bewegen noch selbständig atmen konnten.

Bei dem Versuch, die Ursachen der Krankheit aufzuklären, haben uns moderne Sequenzieretechniken wie das WES und Bioinformatik geholfen. Auf diese Weise identifizierten wir im Erbgut der Patienten Mutationen in dem Eiweißkomplex ASC-1, über dessen Funktion wenig bekannt war. Wir fanden heraus, dass der ASC-1-Komplex für die Steuerung zahlreicher Nervenwachstumsfaktoren verantwortlich ist, die den peripheren motorischen Nerv bei seinem Wachstum aus dem Rückenmark zu der für ihn bestimmten Muskelgruppe leiten. Als Transkriptionsfaktor steuert der ASC-1-Komplex das exakte An- und Ausschalten von Nervenwachstumsfaktoren.

Parallel dazu untersuchten wir gemeinsam mit unseren Kooperationspartnern aus Japan die Funktion des ASC-1-Komplexes bei Zebrafischen. Dessen künstliche Ausschaltung führt zur Lähmung der Fische. Wir konnten in den fast durchsichtigen Fischlarven zeigen, dass die aus dem Rückenmark auswachsenden Nerven ihre Muskeln (Myotome) nicht auffinden. In weiteren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der ASC-1-Komplex mit einem bestimmten Protein (CSR1P1) kooperiert. Aus der Forschung an Zebrafischen war dieses Molekül schon länger bekannt. Dort spielt es nach Verletzungen des Rückenmarks eine wichtige Rolle bei der Heilung. Im Gegensatz zum Menschen kann der Zebrafisch sein Rückenmark selbst nach vollständiger Durchtrennung wieder regenerieren. Bei diesem Prozess scheint das CSR1P1-Protein eine wichtige Rolle zu spielen.

Diese Ergebnisse liefern ein gutes Beispiel dafür, wie man durch die Aufklärung seltener genetischer Krankheiten Erkenntnisse über allgemeine Mechanismen gewinnen kann, die auch bei anderen Krankheiten, wie beispielsweise der Querschnittlähmung, eine wichtige Rolle spielen und künftig für die Entwicklung regenerativer Therapien genutzt werden können.

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

**Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures.**

Knierim E, Hirata H, Wolf NI, Morales-Gonzalez S, Schottmann G, Tanaka Y, Rudnik-Schöneborn S, Orgeur M, Zerres K, Vogt S, van Riesen A, Gill E, Seifert F, Zwirner A, Kirschner J, Goebel HH, Hübner C, Stricker S, Meierhofer D, Stenzel W, Schuelke M.

Am J Hum Genet. 2016 Mar 3;98(3):473-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.006>

### **3. DISKUSSION**

#### **Die Notwendigkeit der genetischen Diagnostik bei seltenen Erkrankungen**

Über 70% der Patienten mit einer seltenen Erkrankung haben eine angeborene oder genetische Erkrankung. Bei vielen wird eine molekulare Diagnose nicht oder erst sehr spät im Krankheitsverlauf gestellt. Selbst für den klinischen Spezialisten ist der molekulare Defekt oft nicht direkt aus dem klinischen Phänotyp ableitbar. Die Folge sind lange Latenzzeiten zwischen Manifestation und molekularer Diagnose, falls überhaupt eine Diagnose gestellt werden kann, zahlreiche Konsultation verschiedener Ärzte, das Nichternstnehmen der Patienten und die Ablehnung der Leistungspflicht durch die Krankenkassen.

Eine Erkrankung wird als „Seltene Erkrankung“ eingestuft, wenn eine Prävalenz von unter 1:2.000 vorliegt. Im Einzelfall sind von der jeweiligen Erkrankung dann nur wenige Menschen betroffen. In ihrer Gesamtheit jedoch leiden in Deutschland mehr als 4 Millionen Menschen an „Seltene Erkrankungen“. Aus der Heterogenität der Erkrankungsgruppe ergibt sich eine Vielfalt individueller Probleme den Einzelnen betreffend. Diese stellen eine große Herausforderung sowohl für das Gesundheitssystem als auch die medizinische Forschung dar. Es haben sich verschiedenen Interessengruppen und Aktionsbündnisse zusammengefunden, um gemeinsam für die Belange von Menschen mit Seltene Erkrankungen einzutreten. So findet man zum Beispiel die Vereinigung NAMSE - Nationales Aktionsbündnis für Menschen mit Seltene Erkrankungen (<http://www.namse.de/seltene-erkrankungen.html>) und die Allianz Chronischer Seltener Erkrankungen ACHSE e.V (<http://www.achse-online.de/>). Ziel der Vereinigung ist es unter anderem eine bessere Patientenversorgung für Menschen mit Seltene Erkrankungen auf den Weg zu bringen. Dazu bündelt es bestehende Initiativen, vernetzt Forscher und Ärzte und führt Informationen für Ärzte und Patienten zusammen.

Die Vorteile einer eindeutigen molekularen Diagnose liegen auf der Hand. Oft bedeutet sie für die Betroffenen das Ende einer diagnostischen Odyssee mit zahlreichen invasiven und zum Teil schmerzhaften und teuren diagnostischen Prozeduren. Besteht endlich Gewissheit über die exakte Diagnose, gibt es eine Möglichkeit einer Prognoseabschätzung des Krankheitsverlaufs, ebenso ist die Familienplanung erleichtert durch die Möglichkeit einer Pränataldiagnostik im Falle einer weiteren

Schwangerschaft. Steht endlich die genaue Diagnose fest, ist es einfacher, einen geeigneten Spezialisten für die jeweilige Erkrankung ausfindig zu machen und von dessen Expertise zu profitieren. Für die behandelnde Ärztin im Gegenzug ist es im Folgenden einfacher, eine Kostenübernahme durch öffentliche oder private Kostenträger bei Sondermedikamenten, -behandlungen und –hilfsmittelversorgung durchzuführen, wenn ein klar definiertes Krankheitsbild vorliegt.

Derzeit läuft ein gemeinsames Kooperationsprojekt der Kinderklinik und dem Institut für Humangenetik / medizinische Genetik der Charite zur Aufklärung seltener genetischer Erkrankungen. Die MENDEL-Studie (**M**utation **E**xploration in **N**on-acquired, genetic **D**isorders and its impact on health **E**conomy and **L**ife quality) beinhaltet eine Mutationssuche mittels Panelsequenzierung von 3.098 bekannten Krankheitsgenen bei nicht erworbenen genetischen Erkrankungen. Ziel dieser Studie ist zum einen die Stellung einer genauen molekularen Diagnose, zum anderen sollen die Auswirkungen einer früh bzw. spät gestellten molekularen Diagnose auf die Gesundheitsökonomie und Lebensqualität gemessen werden. In die Studie wurden nun bereits schon 200 Patienten aus den unterschiedlichen Bereichen der Pädiatrie eingeschlossen, bei denen im Vorfeld eine genetische Diagnose noch nicht zu stellen war, jedoch von einer vererbten Erkrankung auszugehen war. Die Auswertung ist derzeit noch in Arbeit, so dass noch keine endgültigen Zahlen über die Aufklärungsquote vorliegen. Wünschenswert wäre, wenn es durch diese großangelegte Studie gelingen würde, den Krankenkassen gegenüber ein starkes Argument zu liefern, dass eine frühe molekulargenetische Aufklärung für alle Beteiligten einen großen Vorteil darstellt und dass die Kosten für solche Untersuchungen in Zukunft einfacher von den Krankenkassen übernommen werden.

Neben den hier nun schon aufgezählten positiven Auswirkungen einer frühen molekularen Diagnosestellung auf die Lebensqualität der Patienten, muss man berücksichtigen, dass einige der mit Hilfe der Molekulargenetik gestellten Diagnosen direkten Einfluss auf die Therapiestrategie haben. Ein Beispiel hierfür kann ich aus der eigenen klinischen Forschung berichten. Der Fall wurde 2011 in Stroke veröffentlicht (Knierim et al., 2011). Die Familiäre Hemiplegische Migräne (FHM) ist eine selten autosomal dominant vererbte Erkrankung, die sich im Kindesalter manifestiert. Kennzeichen der FHM sind wiederkehrende Migräneanfälle mit Aura, Hemiparese während der Auraphase und eine ataktische Bewegungsstörung. Zusätzlich können wei-

tere neurologische Störungen wie zerebrale Krampfanfälle, Fieber oder Koma hinzukommen. Die Attacken können durch typische Migränetrigger wie Stress, Aufregung oder ein leichtes Kopftrauma ausgelöst werden. Ursächlich für dieses Krankheitsbild können Mutationen des Kalzium- oder Natriumkanals sein, ebenso kann eine Untereinheit der Na/K-ATPase betroffen sein. Eine Behandlung mit Kalzium-Antagonisten ist bei einigen Patienten erfolgreich. Diese Publikation beschäftigt sich mit der Aufdeckung eines neuen Defektes in der Kalziumkanal-Untereinheit CACNA1A bei einem Mädchen mit multiplen Schlaganfällen, Hemiparese, Fieber und Bewusstseinsstörung, die jeweils nach Bagatelltraumata aufgetreten sind. Mittels genetischer Analysen fand ich eine bisher unbekannte, dominante Spontanmutation im *CANA1A*-Gen (c.4046G>A, p.R1349Q), die ein funktionell wichtiges und in der Evolution hoch konserviertes Arginin im Bereich des Spannungssensors des P/Q Cav2.1 Kanals austauschte. Im Mausmodell hatte eine andere Arbeitsgruppe gezeigt, dass die homologe Mutation bei der tottering-5J Maus die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kalziumkanals erhöht und somit zu einem verstärkten Kalzium-Einfluss führt (Miki et al., 2008). Mit dieser Publikation beschreiben wir zum ersten Mal eine Maximalvariante der Ausprägung der FHM, bei der eine Attacke zu einer schweren und langdauernden Gefäßkontraktion und zu einem Schlaganfall führt. Ursächlich ist eine Fehlregulierung der Gefäße im Sinne einer inversen hämodynamischen Antwort auf die „spreading depolarisation“, einer anhaltenden Depolarisation von Neuronen über der Inaktivitätsschwelle ihres Aktionspotentials, die zu einer sich ausbreitenden Ischämie führt, die nicht mit den Versorgungsgebieten der Hirnarterien übereinstimmt. Durch die Kenntnis des Gendefektes konnten wir bei unserer Patientin eine gezielte Pathogenese-basierte experimentelle Therapie durch dauernde milde Blockierung des Kalziumkanals mit Verapamil einsetzen. Unter dieser Therapie sind seit nunmehr fünf Jahren keine weiteren Schlaganfälle mehr aufgetreten, obwohl die Patientin mehrfach Schädeltraumata erlitten hat. Ohne Kenntnis der molekulargenetischen Diagnose hätten wir uns nicht für diese Pharmakotherapie entscheiden können.

Dieser Fall steht natürlich nicht für sich alleine. Auch in der Literatur sind interessante Verläufe beschrieben, bei denen eine frühzeitige molekulargenetische Diagnose den Diagnostik- und Therapieplan entscheidend beeinflusst hat. Willig et al. (2015) berichten in *Lancet Respir Med* über eine Studie, in der kritisch kranke Kinder aus der

Neonatologie und der Intensivstation frühzeitig nach Erkrankungsbeginn mittels WES untersucht wurden. Durch eine hohe Aufklärungsrate der Diagnosen konnte das weitere Vorgehen entweder in diagnostischer oder therapeutischer Hinsicht entscheidend beeinflusst werden. Zwei Fälle werden besonders herausgehoben, da in diesen Fällen die frühzeitige Diagnose das Überleben der Patienten gesichert hat. Zum einen konnte bei einem Säugling, der ein postnatales Leberversagen bekam, frühzeitig die Diagnose einer Sonderform einer lymphophagozytischen Lymphohistiozytose gestellt werden. Somit bestand die Möglichkeit, eine krankheitsspezifische Therapie im Sinne einer Immunsuppression einzuleiten. Andere, nicht indizierte Therapien konnten frühzeitig abgesetzt werden. Durch dieses gute Management hat der Patient ohne große Nachteile überlebt und zeigt bis dato eine altersentsprechende Entwicklung. Bei einem anderen Säugling mit Hypoglykämien konnte eine familiäre Form des fokalen Hyperinsulinismus diagnostiziert werden. Mit einer Resektion des Pankreaskopfes konnte das Kind geheilt werden und weitere Hypoglykämien und deren Folgeschäden vermieden werden.

### **Strategien zur Verbesserung der Aufklärungsrate**

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche genetische Defekte mit Hilfe der NGS-Technologie identifiziert werden konnten, gelingt eine genetische Aufklärung nur bei 30-50% aller Patienten (Biesecker and Green, Zemojtel et al., 2014), wobei eine gewisse Schwankungsbreite in Abhängigkeit von der jeweiligen Erkrankungsgruppe besteht. Bis zu 50-70% der Fälle bleiben ungelöst. Es gibt mehrere Erklärungsansätze für die relativ niedrige Aufklärungsquote. Aktuell beschränkt sich die Mutationsanalyse hauptsächlich auf Protein-kodierende Varianten. Dies rührt daher, dass diese Veränderungen einfach zu verstehen und funktionell zu bewerten sind, zum Beispiel durch zellbasierte Assays, Tiermodelle und mittels der Standardmethoden der molekularbiologischen Forschung. Da Protein-kodierende Sequenzen nur ungefähr 2% des ganzen Genoms ausmachen, stellt sich die Frage, welche Rolle die nicht-Protein-kodierenden Regionen des Genoms bei der Krankheitsentstehung vererbbarer Erkrankungen spielen. Glaubt man dem großen Forscher-Konsortium ENCODE, das 2003 gegründet wurde, um die Funktion des menschlichen Genoms zu untersuchen, erfüllen 80% des menschlichen Genoms eine Funktion, wobei ein Großteil des Erbguts bei der Produktion von RNA eine Rolle spielt (ENCODE Project

Consortium, 2012). In zahlreichen Veröffentlichungen der letzten Zeit berichten Wissenschaftler, wie genetische Veränderungen in nicht Protein-kodierenden Bereichen ursächlich für die Krankheitsentstehung sein können. Hier spielen zum Beispiel Mutationen, die Promotorbereiche betreffen (Davidson et al., 2016, Flønes et al., 2016) eine wichtige Rolle, ebenso aber auch in Rearrangements genetischen Materials, welches Regionen betrifft, in denen regulatorische Elemente wie Enhancer oder Silencer liegen (Ibn-Salem et al., 2014, Lupiáñez et al., 2015, Spielmann et al., 2016, Franke et al., 2016). All diese funktionell und regulatorisch wichtigen Elemente werden mit den Möglichkeiten der WES nicht erfasst und können infolge dessen nicht detektiert werden.

Auch technische Schwierigkeiten im Bereich der Sequenzanreicherung bieten Erklärungsmöglichkeiten, weshalb die Aufklärungsrate nicht höher ist. So beinhaltet die Methode des WES einen Anreicherungsschritt, bei dem selektiv die zu untersuchenden Sequenzabschnitte angereichert werden müssen. Handelt es sich dabei um komplizierte Sequenzstrukturen wie zum Beispiel GC-reiche Abschnitte oder Bereiche mit vielen Repeats, führt dies dazu, dass diese Bereiche unterrepräsentiert sein können (Meienburg et al., 2015). Ebenso wenig ist es mit der WES-Technologie möglich, größere Deletionen und genomische Rearrangements zu erfassen. Dies liegt daran, dass durch die teilweise recht ungleiche Anreicherung der einzelnen Exone eine Detektion von Verlust oder Zugewinn an genomischem Material nicht detektierbar ist. Dies wäre nur mit einer kontinuierlichen Abdeckung wie beim Whole Genome Sequencing möglich.

Im Bereich des NGS war der technische Fortschritt in den letzten Jahren enorm. Die Preise, sowohl für das WES als auch für das WGS sind stark gefallen. Mittlerweile kostet die Sequenzierung eines Gesamtgenoms nur noch 1.200 Euro, demgegenüber stehen die Kosten für die Sequenzierung der kodierenden Bereiche mit 690 Euro. Der verhältnismäßig geringe Preisunterschied zwischen WES und WGS rührt daher, dass bei der Ganzgenomsequenzierung kein Anreicherungsschritt nötig ist und somit weniger Labor- und Materialkosten anfallen. So wie sich die Preise annähern, wird sich die WGS in der klinischen Routinediagnostik etablieren.

Dies hätte den Vorteil, dass Varianten in nicht-proteinkodierenden Regionen des Genoms und intergenische regulatorische Regionen erfasst und analysiert werden könnten. Des Weiteren können durch den Wegfall des Anreicherungsschritts, Aus-

sagen über größere Deletionen, Duplikationen und genomische Rearrangements getroffen werden. Auch wenn man momentan vielleicht noch nicht alle gefundenen Varianten interpretieren kann, da Referenzdaten für die nicht-kodierenden Bereiche fehlen, ist es dennoch sinnvoll, diese Daten jetzt schon zu generieren und vorzuhalten. Je nach Wissenszuwachs kann man auf diese Daten zurückgreifen und Varianten auch im Rückblick noch interpretieren und Diagnosen finden. Vorhersageprogramme wie zum Beispiel MutationTaster2 werden dahingehend verbessert, dass in Zukunft auch die Analyse extragenischer Varianten möglich sein wird. Dies geschieht derzeit in unserer Arbeitsgruppe, indem über die bioinformatische Auswertung experimenteller Daten ein Zusammenhang zwischen regulatorischen Regionen und den von ihnen regulierten Genen hergestellt wird. Durch das ENCODE-Projekt stehen inzwischen umfangreiche Daten zu regulatorischen Elementen wie Transkriptionsfaktorbindungs- oder Methylierungsstellen zur Verfügung.

### **Die funktionelle Charakterisierung pathogener Varianten aktuell und in Zukunft**

In Zukunft wird es auf Grund der vielen neuen molekularen Diagnosen, die gestellt werden und die funktionell teilweise noch nicht oder noch nicht ausreichend untersucht sind, immer wichtiger werden, die Kooperation zwischen Klinikern, Genetikern und Grundlagenwissenschaftlern auszubauen und die Vernetzung zu suchen. Keine Arbeitsgruppe beherrscht die Vielfalt von Methoden, die erforderlich ist, den Beweis anzutreten, dass die gefundene Variante, die pathophysiologische ist. In den letzten Jahren hat das Zebrafischmodell enorm an Bedeutung gewonnen, da es sich im Bereich der Entwicklungsbiologie als gutes Modellsystem herausgestellt hat. Beim Zebrafisch handelt es sich um ein Wirbeltier, das einfach zu halten ist und eine hohe Nachkommenzahl hat. Er zeigt eine rasche Embryonalentwicklung über wenige Tage und während der frühen Entwicklungsphasen bleibt die Larve transparent, so dass die Entwicklungsstadien gut am lebenden Tier zu analysieren sind. Neben diesen Eigenschaften bietet der Zebrafisch umfangreiche Möglichkeiten zur genetischen Manipulation. Zur Herstellung transgener Linien kann relativ einfach Fremd-DNA in die großen Eizellen injiziert werden, die anschließend in das Genom der heranwachsenden Larven eingebaut wird. Aus diesen Larven werden Zebrafisch-Stämme gezüchtet, die dauerhaft diese Fremd-DNA exprimieren. Somit können Untersuchungen zu Expression und Funktion bestimmter Proteine durchgeführt werden. Im Zebrafisch

ist auch das vorübergehende Abschalten bestimmter Gene durch den Einsatz von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden, kurz Morpholinos, möglich. Diese werden in die Eizelle injiziert, binden an die prä-mRNA eines bestimmten Gens, interferieren mit dem korrekten Splicing und verhindern damit die Produktion des entsprechenden Proteins. Im Gegensatz zur knockout-Maus, deren Erzeugung sehr langwierig ist, können mit der Morpholino-Methode innerhalb kurzer Zeit eine Vielzahl relevanter Gene abgeschaltet und die Auswirkungen untersucht werden. Diese Experimente haben wir für einige unserer neu entdeckten Varianten zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hiromi Hirata (Gakuin University, Aoyama, Japan) durchgeführt, so auch für die Publikation 5. Seit kurzer Zeit hat unsere eigene Arbeitsgruppe Zugriff auf eine Zebrafisch-Facility an der Charité und ist somit auch eigenständig in der Lage, diese Experimente durchzuführen und neue Krankheitsgene im Zebrafischmodell zu untersuchen.

Einen wichtigen Schritt zum Nachweis der Pathogenese einer Mutation, besonders dann, wenn sich die Mutation nicht in proteinkodierenden Genabschnitten befindet, ist die Etablierung eines Experimentalsystems, in dem ein Effekt nachweisbar ist. Wünschenswert wäre dabei die Erforschung der Erkrankung an den wirklich betroffenen Zellen des Patienten. Dies ist bei neurologischen Erkrankungen wegen der eingeschränkten Verfügbarkeit menschlichen Gehirn- und Nervengewebes schwierig. Hier besteht die Möglichkeit einen „Umweg“ zu nehmen und Patienten-Fibroblasten zu reprogrammieren und über die Generierung sogenannter induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen) daraus funktionell intakte Nervenzellen zu generieren (Zhang et al., 2013). Bei den iPS-Zellen handelt es sich um Zellen, die in ein sehr frühes, undifferenziertes Stadium zurückversetzt werden. Diese „Alleskönner“ lassen sich vermehren und durch Inkubation mit entsprechenden Wachstumsfaktoren oder durch Transfektion von Transkriptionsfaktor-mRNAs in verschiedenste Körperzellen ausreifen, zum Beispiel in Neurone. Da die Nervenzellen aus den Patienten selbst stammen, tragen sie dieselben genetischen Veränderungen und können so als Zellmodell der Erkrankung dienen.

Veröffentlichungen zeigen, welches Potential diese spezielle Art der Stammzellen für die neurologische Krankheitsforschung hat. Schon 2011 gelang es Wissenschaftlern aus Bonn mithilfe der iPSC-Technologie, die molekularen Vorgänge einer dominant vererbten Kleinhirn-Ataxie zu entschlüsseln. Die Patienten entwickeln zwischen dem

20.-40. Lebensjahr eine Störung der Bewegungskoordination und andere neurologische Symptome. Die Wissenschaftler konnten nun künstlich geschaffene Nervenzellen betroffener Patienten direkt in der Zellkulturschale untersuchen und eine Antwort finden, warum gerade die Nervenzellen von dieser Erkrankung betroffen sind (Koch et al., 2011).

Reprogrammierte und differenzierte Stammzellen haben für das Verständnis der Pathologie neurodegenerativer Erkrankungen ein enormes Potenzial. In einem nächsten Schritt können reprogrammierte Nervenzellen für die Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung neurologischer Erkrankungen eingesetzt werden. So lässt sich die „personalisierte Medizin“ auch auf seltene neurologische Krankheiten erweitern.

#### **4. ZUSAMMENFASSUNG**

In meiner Funktion als Ärztin arbeite ich in der klinischen Versorgung von Kindern mit neurologischen Erkrankungen. Als Wissenschaftlerin arbeite ich in einem Grundlagenlabor, das sich mit den genetischen Ursachen vererbter Erkrankungen befasst. Mein Tätigkeitsfeld liegt somit an der Schnittstelle zwischen Forschung und Versorgung und garantiert die rasche Umsetzung translationaler Forschungsprojekte aus der Klinik in die Grundlagenforschung und zurück.

Die hier vorgestellten Arbeiten dienen der Aufklärung krankheitsverursachender genetischer Defekte aus dem Fachgebiet der Neuropädiatrie. Angewendet wurden verschiedene moderne molekulargenetische Analyseverfahren. Es handelt sich bei den Projekten um forschungsträchtige Themen aus dem klinischen Alltag, die ich in die Grundlagenforschung eingebracht habe. Nach Aufdeckung des jeweiligen Gendefektes wurde die funktionelle Relevanz in zellbiologischen Experimentalsystemen untersucht. Die Ergebnisse der vorgestellten Arbeiten verbessern unsere Fähigkeiten, Familien mit seltenen Erkrankungen zu beraten und bereichern unser Wissen auf dem Gebiet der Entwicklungsstörungen des Nervensystems.

## 5. LITERATURANGABEN

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571):68-74. doi:10.1038/nature15393. PubMed PMID: 26432245; PubMed Central PMCID: PMC4750478.
- Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370: 2418–2425.
- Bönnemann CG, Wang CH, Quijano-Roy S, Deconinck N, Bertini E, Ferreiro A, Munttoni F, Sewry C, Bérout C, Mathews KD, Moore SA, Bellini J, Rutkowski A, North KN; Members of International Standard of Care Committee for Congenital Muscular Dystrophies. Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 2014 Apr;24(4):289-311. doi: 10.1016/j.nmd.2013.12.011. Epub 2014 Jan 9. PubMed PMID: 24581957.
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov D, Leppig K, Thiese H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011 Aug 14;43(9):838-46. doi: 10.1038/ng.909.
- Davidson AE, Liskova P, Evans CJ, Dudakova L, Nosková L, Pontikos N, Hartmanová H, Hodaňová K, Stránecký V, Kozmík Z, Levis HJ, Idigo N, Sasai N, Maher GJ, Bellingham J, Veli N, Ebenezer ND, Cheetham ME, Daniels JT, Thaug CM, Jirsova K, Plagnol V, Filipec M, Kmoch S, Tuft SJ, Hardcastle AJ. Autosomal-Dominant Corneal Endothelial Dystrophies CHED1 and PPCD1 Are Allelic Disorders Caused by Non-coding Mutations in the Promoter of OVOL2. *Am J Hum Genet.* 2016 Jan 7;98(1):75-89. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.11.018. Epub 2015 Dec 31. PubMed PMID: 26749309; PubMed Central PMCID: PMC4716680.
- ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012 Sep 6;489(7414):57-74. doi: 10.1038/nature11247. PubMed PMID: 22955616; PubMed Central PMCID: PMC3439153.
- Flønes I, Sztromwasser P, Haugarvoll K, Dölle C, Lykouri M, Schwarzlmüller T, Jonassen I, Miletic H, Johansson S, Knappskog PM, Bindoff LA, Tzoulis C. Novel SLC19A3 Promoter Deletion and Allelic Silencing in Biotin-Thiamine-Responsive Basal Ganglia Encephalopathy. *PLoS One.* 2016 Feb 10;11(2):e0149055. doi:10.1371/journal.pone.0149055. eCollection 2016. PubMed PMID: 26863430; PubMed Central PMCID: PMC4749299.
- Franke M, Ibrahim DM, Andrey G, Schwarzer W, Heinrich V, Schöpflin R, Kraft K, Kempfer R, Jerković I, Chan WL, Spielmann M, Timmermann B, Wittler L, Kurth I, Cambiaso P, Zuffardi O, Houge G, Lambie L, Brancati F, Pombo A, Vingron M, Spitz F, Mundlos S. Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature.* 2015 [Epub ahead of print] 2016 doi: 10.1038/nature19800.

- Hildebrandt F, Heeringa SF, Ruschendorf F, Attanasio M, Nurnberg G, Becker C, et al., A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS Genet* 2009;5:e1000353
- Hoyle JC, Isfort MC, Roggenbuck J, Arnold WD. The genetics of Charcot-Marie-Tooth disease: current trends and future implications for diagnosis and management. *Appl Clin Genet*. 2015 Oct 19;8:235-43. doi: 10.2147/TACG.S69969. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26527893; PubMed Central PMCID: PMC4621202.
- Ibn-Salem J, Köhler S, Love MI, Chung H-R, Huang N, Hurles ME, et al., Deletions of chromosomal regulatory boundaries are associated with congenital disease. *Genome Biol*. 2014; 15: 423.
- Ishibashi M, Manning E, Shoubridge C, Krecsmarik M, Hawkins TA, Giacomotto J, Zhao T, Mueller T, Bader PI, Cheung SW, Stankiewicz P, Bain NL, Hackett A, Reddy CC, Mechaly AS, Peers B, Wilson SW, Lenhard B, Bally-Cuif L, Gecz J, Becker TS, Rinkwitz S. Copy number variants in patients with intellectual disability affect the regulation of ARX transcription factor gene. *Hum Genet*. 2015 Nov;134(11-12):1163-82. doi: 10.1007/s00439-015-1594-x. Epub 2015 Sep 4. PubMed PMID: 26337422.
- Knierim E, Leisle L, Wagner C, Weschke B, Lucke B, Bohner G, Dreier JP, Schuelke M. Recurrent stroke due to a novel voltage sensor mutation in Cav2.1 responds to verapamil. *Stroke* 2011; 42:e14-e17.
- Knierim E, Lucke B, Schwarz JM, Schuelke M, Seelow D. Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. *PLoS One*. 2011;6(11):e28240. doi: 10.1371/journal.pone.0028240. Epub 2011 Nov 30. PubMed PMID: 22140562; PubMed Central PMCID: PMC3227650.
- Knierim E, Seelow D, Gill E, von Moers A, Schuelke M. Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous TK2-mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and status epilepticus. *Mitochondrion*. 2015 Jan;20:1-6. doi: 10.1016/j.mito.2014.10.007. Epub 2014 Nov 4. PubMed PMID: 25446393.
- Köhler S, Doelken SC, Mungall CJ, Bauer S, Firth HV, Bailleul-Forestier I, Black GC, Brown DL, Brudno M, Campbell J, FitzPatrick DR, Eppig JT, Jackson AP, Freson K, Girdea M, Helbig I, Hurst JA, Jähn J, Jackson LG, Kelly AM, Ledbetter DH, Mansour S, Martin CL, Moss C, Mumford A, Ouwehand WH, Park SM, Riggs ER, Scott RH, Sisodiya S, Van Vooren S, Wapner RJ, Wilkie AO, Wright CF, Vulto-van Silfhout AT, de Leeuw N, de Vries BB, Washington NL, Smith CL, Westerfield M, Schofield P, Ruef BJ, Gkoutos GV, Haendel M, Smedley D, Lewis SE, Robinson PN. The Human Phenotype Ontology project: linking molecular biology and disease through phenotype data. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D966-74. doi: 10.1093/nar/gkt1026. Epub 2013 Nov 11. PubMed PMID: 24217912; PubMed Central PMCID: PMC3965098.
- Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, Wittler L, Borschiwer M, Haas SA, Osterwalder M, Franke M, Timmermann B, Hecht J, Spielmann M, Visel A, Mundlos S. Disruptions of topological chromatin domains

- cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*. 2015;161: 1012-25.
- Meienberg J, Zerjavic K, Keller I et al (2015) New insights into the performance of human whole-exome capture platforms. *Nucleic Acids Res* 43:e76
- Miki T, Zwingman TA, Wakamori M, Lutz CM, Cook SA, Hosford DA, Herrup K, Fletcher CF, Mori Y, Frankel WN, Letts VA. Two novel alleles of tottering with distinct Ca(v)2.1 calcium channel neuropathologies. *Neuroscience*. 2008; 155: 31– 44.
- Pinkel D, Albertson DG. Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:331-54. Review. PubMed PMID: 16124865.
- Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, Munar M, Rubio-Pérez C, Jares P, Aymerich M, Baumann T, Beekman R, Belver L, Carrio A, Castellano G, Clot G, Colado E, Colomer D, Costa D, Delgado J, Enjuanes A, Estivill X, Ferrando AA, Gelpí JL, González B, González S, González M, Gut M, Hernández-Rivas JM, López-Guerra M, Martín-García D, Navarro A, Nicolás P, Orozco M, Payer ÁR, Pinyol M, Pisano DG, Puente DA, Queirós AC, Quesada V, Romeo-Casabona CM, Royo C, Royo R, Rozman M, Russiñol N, Salaverría I, Stamatopoulos K, Stunnenberg HG, Tamborero D, Terol MJ, Valencia A, López-Bigas N, Torrents D, Gut I, López-Guillermo A, López-Otín C, Campo E. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015 Oct 22;526(7574):519-24. doi: 10.1038/nature14666. Epub 2015 Jul 22. PubMed PMID: 26200345.
- Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep*. 2015;3(4):158-165. Epub 2015 Sep 4. Review. PubMed PMID: 26566462; PubMed Central PMCID: PMC4633438.
- Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, Hoefsloot LH, Kamsteeg EJ, Mensenkamp AR, et al., A post-hoc comparison of the utility of Sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat*. 2013;34(12):1721–6.
- Koch, P., Breuer, P., Peitz, M., Jungverdorben, J., Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tüting, T., Hoffmann, P., Klockgether, T., Evert, B.O., Wüllner, U., Brüstle, O. (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* doi:10.1038/nature10671
- Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975 May 25;94(3):441-8. PubMed PMID: 1100841.
- Schredelseker J: „Der Zebrafisch als vielseitiges Modellsystem. Vom Zierfisch zum Forschungsobjekt“, *Biologie in unserer Zeit*, 12/2009.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014 Apr;11(4):361-2. doi: 10.1038/nmeth.2890. PubMed PMID: 24681721.
- Seelow D, Schuelke M. HomozygosityMapper2012--bridging the gap between homozygosity mapping and deep sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jul;40(Web

- Server issue):W516-20. doi: 10.1093/nar/gks487. Epub 2012 Jun 4. PubMed PMID: 22669902; PubMed Central PMCID: PMC3394249.
- Seelow D, Schwarz JM, Schuelke M. GeneDistiller--distilling candidate genes from linkage intervals. *PLoS One*. 2008;3(12):e3874. doi: 10.1371/journal.pone.0003874. Epub 2008 Dec 5. PubMed PMID: 19057649; PubMed Central PMCID: PMC2587712.
- Spielmann M, Mundlos S. Looking beyond the genes: the role of non-coding variants in human disease. *Hum Mol Genet*. 2016;25(R2):R157-R165
- Thompson EA. Identity by descent: variation in meiosis, across genomes, and in populations. *Genetics*. 2013 Jun;194(2):301-26. doi: 10.1534/genetics.112.148825. Review. PubMed PMID: 23733848; PubMed Central PMCID: PMC3664843.
- Willig LK, Petrikin JE, Smith LD, Saunders CJ, Thiffault I, Miller NA, Soden SE, Cakici JA, Herd SM, Twist G, Noll A, Creed M, Alba PM, Carpenter SL, Clements MA, Fischer RT, Hays JA, Kilbride H, McDonough RJ, Rosterman JL, Tsai SL, Zellmer L, Farrow EG, Kingsmore SF. Whole-genome sequencing for identification of Mendelian disorders in critically ill infants: a retrospective analysis of diagnostic and clinical findings. *Lancet Respir Med*. 2015 May;3(5):377-87. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00139-3. Epub 2015 Apr 27. PubMed PMID: 25937001; PubMed Central PMCID: PMC4479194.
- Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, et al., Rapid Single-Step Induction of Functional Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Neuron* 2013; 78: 785–798.
- Zemojtel T, Köhler S, Mackenroth L, Jäger M, Hecht J, Krawitz P, Graul-Neumann L, Doelken S, Ehmke N, Spielmann M, Oien NC, Schweiger MR, Krüger U, Frommer G, Fischer B, Kornak U, Flöttmann R, Ardeshirdavani A, Moreau Y, Lewis SE, Haendel M, Smedley D, Horn D, Mundlos S, Robinson PN. Effective diagnosis of genetic disease by computational phenotype analysis of the disease-associated genome. *Sci Transl Med*. 2014 Sep 3;6(252):252ra123. doi: 10.1126/scitranslmed.3009262. PubMed PMID: 25186178; PubMed Central PMCID: PMC4512639.

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Markus Schülke danke ich an allererster Stelle und von ganzem Herzen. Er hat mich in seine Laborgruppe aufgenommen, schrittweise an die Molekulargenetik herangeführt und mich mit seiner unglaublichen Expertise auf meinem Weg zur Habilitation in Wort und Tat begleitet. Mit seiner Begeisterungsfähigkeit und seinen Visionen war er ein immerwährender Motor für neue Projekte und Ideen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Hübner, dem Direktor der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie der Charité für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu habilitieren. Ich danke ihm sehr herzlich für die aktive Unterstützung meiner klinischen Ausbildung und wissenschaftlichen Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Priv.-Doz. Arpad von Moers, Chefarzt der DRK Kinderklinik Westend ganz herzlich danken, dass er mich seiner Zeit gedrängt hat, das gemütliche Nest der DRK-Kinderklinik zu verlassen und mit dem Forschungsprojekt an der Charité zu beginnen.

Mein spezieller und ausdrücklicher Dank gilt den aktiven und ehemaligen MitarbeiterInnen der AG Schülke/AG Seelow für all die Hilfe, die Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Der Einsatz eines jeden Einzelnen hat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Es bereitet mir große Freude, Teil dieser Arbeitsgruppe zu sein und ich danke allen ganz herzlich für das angenehme, freundschaftliche Arbeitsklima!

Den Verantwortlichen des Habilitationsprogramms „Rahel-Hirsch“ der Charité, das ich in Anspruch nehmen durfte, möchte ich ebenfalls meinen herzlichen Dank aussprechen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann und meinen Eltern, dass sie das Projekt „Habilitation“ uneingeschränkt unterstützt und somit zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

## **ERKLÄRUNG**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

[1] weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

[2] die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,

[3] mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....