Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Kranioektodermale Dysplasie und Intelligenzminderung - molekulargenetische Untersuchungen bei zwei autosomal-rezessiv vererbten Krankheitsbildern

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Leonie Hoffer

aus Bergisch-Gladbach

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis **iv**

Tabellenverzeichnis **v**

Abkürzungsverzeichnis **vi**

Abstrakt **x**

Abstract **xii**

1 Einleitung **1**

1.1 Intelligenzminderung 1

1.1.1 Definition 1

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie 3

1.1.3 Genetik der Intelligenzminderung 5

1.1.4 Diagnostik 8

1.2 Kranioektodermale Dysplasie im Spektrum der Ziliopathien 8

1.2.1 Ziliopathien 8

1.2.2 Kranioektodermale Dysplasie 10

1.3 Diagnostische Mittel in der Humangenetik 14

1.3.1 Genetische Kopplung und Autozygotie-Analyse 14

1.3.2 Next Generation Sequencing 16

1.3.3 Einzelgenanalyse 17

1.4 Ziel der Arbeit 17

2 Material und Methoden **18**

2.1 Patienten 18

2.1.1 Intelligenzminderung 18

2.1.2 Kranioektodermale Dysplasie 27

2.2 Material 34

2.2.1 Chemikalien und Kits 34

2.2.2 Puffer und Lösungen 34

2.2.3 Enzyme 35

2.2.4 Primer 35

2.2.5 Software 38

2.2.6 Internetquellen . . . 38
2.3 Methoden . . . 39
2.3.1 Autozygotie-Kartierung und Next Generation Sequencing . . . 39
2.3.2 Selektion von Kandidatengenen . . . 40
2.3.3 DNA-Gewinnung . . . 41
2.3.4 Prüfung der DNA-Konzentration, -Reinheit und Verdünnung . . . 42
2.3.5 Primerdesign . . . 42
2.3.6 Die Polymerase-Kettenreaktion . . . 43
2.3.7 Gelelektrophorese . . . 44
2.3.8 DNA-Sequenzierung nach Sanger . . . 46

3 Ergebnisse und Erörterung **48**
3.1 Konsanguine Familien mit autosomal-rezessiv vererbter Intelligenzminderung . . . 48
3.1.1 Familie G001 . . . 48
3.1.2 Familie G002 . . . 49
3.1.3 Familie G008 . . . 52
3.1.4 Familie G015 . . . 54
3.1.5 Familie G017 . . . 56
3.1.6 Familie G026 . . . 58
3.1.7 Familie G030 . . . 60
3.1.8 Kontroll-Screening für neu identifizierte Krankheitsgene der Intelligenzminderung . . . 61
3.2 Kranioektodermale Dysplasie . . . 62
3.2.1 *WDR35* . . . 62
3.2.2 *IFT43* . . . 64

4 Diskussion **65**
4.1 Nutzen einer genetischen Diagnostik . . . 65
4.2 Genetik der Intelligenzminderung . . . 67
4.2.1 Kritische Betrachtung zur Methodenwahl . . . 69
4.3 Kranioektodermale Dysplasie . . . 70
4.4 Syndromal versus nicht-syndromal? . . . 73
4.5 Zukunft der genetischen Diagnostik . . . 74

5 Anhang **77**

Literaturverzeichnis **84**

Eidesstattliche Versicherung **100**

Lebenslauf **102**

Publikationsliste **104**

Danksagung **105**

Abbildungsverzeichnis

2.1 Stammbaum der Familie G001 19
2.2 Merkmale Familie G001 20
2.3 Stammbaum der Familie G002 20
2.4 Stammbaum der Familie G008 21
2.5 Stammbaum der Familie G015 21
2.6 Stammbaum der Familie G017 23
2.7 Stammbaum der Familie G026 25
2.8 Patientin 2658/09 26
2.9 Stammbaum der Familie G030 27
2.10 Patientin 2191 29
2.11 Patientin 2561 30

3.1 Mutation in *C12orf57* bei Patient 2143/07, Familie G001 48
3.2 Mutation in *HIST3H3* bei Patientin 1853/06, Familie G002 52
3.3 Mutation in *SURF1* bei Patientin 2479/08, Familie G008 54
3.4 Mutation in *RABL6* bei Patient 2454/08, Familie G015 56
3.5 Mutation in *ELP2* bei Patient 2333/07, Familie G017 58
3.6 Mutation in *FAM126A* bei Patient 2256/07, Familie G026 60
3.7 Mutation in *LARP7* bei Patient 2658/09, Familie G030 61
3.8 Mutation in *WDR35*, Exon 25, Patientin 2191/07 63
3.9 Mutation in *WDR35*, Exon 6, Patientin 2561/08 64
3.10 Mutation in *WDR35*, Exon 18, Patientin 2561/08 64

5.1 Familie G001 Mutationen *C12orf57* 77
5.2 Familie G002 Mutationen *HIST3H3* 78
5.3 Familie G008 Mutationen *SURF1* 78
5.4 Familie G015 Mutationen *RABL6* 79
5.5 Familie G017 Mutationen *ELP2* 80
5.6 Familie G026 Mutationen *FAM126A* 80
5.7 Familie G030 Mutationen *LARP7* 81
5.8 *WDR35*-Mutation Exon 25 Eltern 81
5.9 *WDR35*-Mutation Exon6 Eltern 82
5.10 *WDR35*-Mutation Exon18 Eltern 82

Tabellenverzeichnis

1.1 Intelligenzminderung nach ICD-10 . . . 3
1.2 Relative Häufigkeit der Ursachen angeborener Intelligenzminderung . . . 4
1.3 Übersicht über die phänotypische Variabilität bei ausgewählten Ziliopathien . . . 10
1.4 Häufige Merkmale der Kranioektodermalen Dysplasie . . . 12
1.5 Proteinkomponenten des IFT-A Komplexes . . . 13
1.6 Molekulargenetische Ursachen der Kranioektodermalen Dysplasie . . . 13

2.1 Merkmale Familie G001 . . . 19
2.6 PCR-Ansatz . . . 44
2.7 Reaktanten und Bedingungen der PCR . . . 44
2.8 Reaktanten Agarose-Gel . . . 45
2.9 Reaktanten Gelelektrophorese . . . 45
2.10 Reaktanten und Bedingungen der Sequenzierung nach Sanger . . . 47

3.1 Kopplungsintervalle Familie G001 . . . 48
3.2 Kandidatengene Familie G001 . . . 48
3.3 Kopplungsintervall Familie G002 . . . 50
3.4 Kandidatengene Familie G002 . . . 50
3.5 Kopplungsintervalle Familie G008 . . . 52
3.6 Kandidatengene Familie G008 . . . 52
3.7 Kopplungsintervall Familie G015 . . . 54
3.8 Kandidatengene Familie G015 . . . 54
3.9 Kopplungsintervalle Familie G017 . . . 56
3.10 Kandidatengene Familie G017 . . . 57
3.11 Kopplungsintervalle Familie G026 . . . 59
3.12 Kandidatengene Familie G026 . . . 59
3.13 Kopplungsintervalle Familie G030 . . . 60
3.14 Kandidatengene Familie G030 . . . 61
3.15 Kontroll-Screening in gesunder Population . . . 62
3.16 Ergebnisse der genetischen Untersuchung im Kollektiv der CED-Patienten . . . 62
3.17 Mutationen in *WDR35* . . . 63

4.1 Merkmale der CED . . . 72

5.1 Zusätzliche Informationen zu Mutationen in Genen für Intelligenzminderung . . . 83

Abkürzungsverzeichnis

AAIDD ..... American Association on Intellectual and Developmental Disabilities

AS ..... Aminosäure

ATD-J ..... asphyxierende Thoraxdystrophie Typ Jeune

ATP ..... Adenosintriphosphat

b ..... benign

bp ..... Basenpaare

CED ..... Cranioectodermal Dysplasia

cM ..... Centimorgan

cm ..... Zentimeter

CT ..... Computertomographie

d ..... damaging

Da ..... Dalton

DBZ ..... Diagnose- und Behandlungszentrum für Entwicklung und Neurologie des Kindes- und Jugendalters

ddATP ..... Didesoxyadenosintriphosphat

ddCTP ..... Didesoxycytosintriphosphat

ddGTP ..... Didesoxyguanosintriphosphat

ddNTP ..... Didesoxyribonukleosidtriphosphat

ddTTP ..... Didesoxytyrosintriphosphat

DNA ..... Deoxyribonucleic acid

dNTP ..... Desoxyribonukleosidtriphosphat

EEG ..... Elektroenzephalogramm

ESHG ..... European Society of Human Genetics

EVC ..... Ellis-van Creveld Syndrom

FGFR ..... Fibroblast-growth-factor-receptor

fs ..... frameshift

GDP ..... Guanosin-Diphosphat

HGMD ..... Human Gene Mutation Data

HHRH ..... Hereditäre hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalziurie

HPO ..... Human Phenotype Ontology

ICD-10 ..... International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Revision 10

IDB ..... identical by descent

IFT-A ..... Intraflagellarer Transport Komplex A

IFT-B ..... Intraflagellarer Transport Komplex B

IM ..... Intelligenzminderung

IQ ..... Intelligenzquotient

IUGR ..... Intrauterine Growth Retardation

kDA ..... Kilodalton

kg ..... Kilogramm

lc ..... low confidence

MERAP ..... Medical Re-sequencing Analysis Pipeline

mRNA ..... messenger ribonucleic acid

MSS ..... Mainzer-Saldino Syndrom

NGS ..... Next Generation Sequencing

OD ..... Optische Dichte

OMIM ..... Online Mendelian Inheritance in Man

PCR ..... Polymerase chain reaction

rpm . . . . . Rotationen pro Minute

S-Phase . . . . . Synthese-Phase

SDS . . . . . Sodium-Dodecyl-Sulfat

SNP . . . . . Single Nucleotide Polymorphism

SRPS . . . . . Short Rib-Polydactyly Syndrome

SSW . . . . . Schwangerschaftswoche

t . . . . . tolerated

WES . . . . . whole exome sequencing

WGS . . . . . whole genome sequencing

WHO . . . . . World Health Organization

Die praktischen Arbeiten dieser Dissertation wurden vom 01.09.2010 bis 31.08.2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Mundlos, Prof. Dr. Andreas Tzschach und Prof. Dr. Thomas Wienker am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Berlin durchgeführt.

The work presented in this thesis has been conducted from September 1st 2010 to August 31th 2012 at the Max Planck Institute for Molecular Genetics Berlin under supervision of Prof. Dr. Stefan Mundlos, Prof. Dr. Andreas Tzschach and Prof. Dr. Thomas Wienker.

Abstrakt

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene autosomal-rezessiv vererbte Krankheitsbilder betrachtet. Es handelt sich dabei zum einen um eine syndromale Erkrankung, Kranioektodermale Dysplasie, die durch ein charakteristisches Muster an Symptomen definiert ist, zum anderen um eine nicht-syndromale Erkrankung, Intelligenzminderung, welche ohne wesentliche weitere Symptome auftritt. Dieser prinzipielle Unterschied in der klinischen Präsentation bedingt - so die These - eine unterschiedliche Methodik in der Aufdeckung der molekularen Ursachen der Krankheitsbilder. In der vorliegenden Arbeit wird das jeweils gewählte Prozedere beschrieben und kritisch betrachtet; die gewonnenen Erkenntnisse werden mitgeteilt und diskutiert.

Bei der Intelligenzminderung handelt es sich um ein weit verbreitetes Krankheitsbild, dessen Ursachen außerordentlich vielgestaltig sind; genetische wie nicht-genetische Faktoren können eine Rolle spielen. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung genetischer Ursachen nicht-syndromaler Intelligenzminderung. Mittels neuer molekulargenetischer Methoden können insbesondere in konsanguinen Familien mit autosomal-rezessivem Erbgang ursächliche Mutationen identifiziert werden. Durch Kopplungsanalyse, Anreicherung der betreffenden Regionen und Next Generation Sequencing wurden neue Kandidatengene und Mutationen identifiziert und durch Sequenzierung nach Sanger die Kosegregation von Genotyp und Phänotyp in den Familien bestätigt. Sieben konsanguine Familien wurden auf diese Weise untersucht. Jeweils eine mutmaßlich krankheitsverursachende Mutation in unterschiedlichen Genen konnte identifiziert werden. Das Ergebnis weist auf die große genetische Heterogenität autosomal-rezessiv vererbter Intelligenzminderung hin.

Die Kranioektodermale Dysplasie ist eine Erkrankung des ektodermalen Gewebes und wird den Ziliopathien zugeordnet. Die seltene Entwicklungsstörung äußert sich klinisch unter anderem durch skeletale Dysmorphien wie Dolichozephalie, rhizomelische Gliedmaßenverkürzung, Zahnfehlbildungen und Schädigung von Nieren- und Leberfunktion, welche zum frühzeitigen Organversagen führen kann. Dabei besteht eine ausgeprägte Variabilität hinsichtlich der einzelnen phänotypischen Merkmale. Bislang wurden wenige Mutationen in Genen des ziliären Proteinkomplexes IFT-A identifiziert. Dieser spielt im Aufbau von und Transport in Zilien eine wichtige Rolle. Die kleinen Zellorganellen haben vielfältige Funktionen in der Zellkommunikation und Gewebedifferenzierung. In dieser Arbeit wurden zwei Gene, *WDR35* und *IFT43*, die Proteine des Komplexes IFT-A codieren, bei neun Patienten untersucht. Es wurden in *WDR35* bei zwei Patientinnen insgesamt drei bislang nicht beschriebene Mutationen gefunden. Die Befunde bestätigen die These, dass es sich bei der Kranioektodermalen Dysplasie um eine genetisch heterogene Ziliopathie handelt. Der variable Phänotyp könnte in der Vielfalt der betroffenen Gene und Mutationen begründet sein. Eine

Analyse der an IFT-A beteiligten Proteine und Gene könnte weiteren Aufschluss über Pathogenese und Therapie der Erkrankung geben.
Die Erkenntnisse zu beiden Krankheitsbildern sind für die Pränataldiagnostik und die Erkennung des Trägerstatus gesunder Verwandter in diesen Familien von Bedeutung.

Abstract

This thesis focuses on the investigation and comparison of a non-syndromic and a syndromic genetic disorder, which both are of autosomal recessive inheritance: non-syndromic intellectual disability and cranioectodermal dysplasia.
Intellectual disability is a prevalent disorder attributable to various, genetic as well as non-genetic, origins. Non-syndromic intellectual disability designates the solitary symptom of intellectual disability without any other conspicuous malformations or dysmorphic signs presenting as features of a syndromic disorder. For this entity, underlying genetic mutations seem to be innumerable and spread over the whole genome.
In seven large consanguineous families with autosomal recessive intellectual disability, homozygosity mapping, targeted exon enrichment, and high throughput sequencing resulted in an identification of the underlying genetic defect in each of the seven families. These results demonstrate the vast heterogeneity of the underlying genetics.
The second disorder presented is cranioectodermal dysplasia, a rare syndromic disorder belonging to the group of ciliopathies. Symptoms comprise sceletal and ectodermal dysmorphia such as dolichocephaly, rhizomelic limb shortening, dental abnormalities and impairment of renal and liver function, causing early-onset organ failure. So far, a few mutations have been detected in the protein complex required for dynein-driven retrograde ciliary transport, IFT-A. Cilia are known as propulsive motors and organelles for cell communication. In nine patients with cranioectodermal dysplasia, two protein-coding genes of the IFT-A complex have been analyzed (*WDR35* and *IFT43*). Three different and yet unknown mutations were detected in *WDR35* in two patients. The findings indicate that cranioectodermal dysplasia is a genetically as well as phenotypically heterogenous ciliopathy. Future investigation on function and genetics of the IFT-A complex could further illuminate the underlying pathogenesis of cranioectodermal dysplasia. The affected families will benefit from a definite diagnosis often ending a diagnostic odyssey. The new insights will facilitate the understanding of the clinical course and could make possible prenatal diagnosis and carrier testing of unaffected individuals.

Kapitel 1

Einleitung

In dieser Arbeit sollen zwei verschiedene autosomal-rezessiv vererbte Krankheitsbilder betrachtet werden. Das originäre Interesse an der Untersuchung zweier unterschiedlicher Krankheitsbilder besteht darin, sich sowohl einer syndromalen Erkrankung, der Kranioektermalen Dysplasie, als auch einer nicht-syndromalen Erkrankung als Formen der nicht-syndromalen Intelligenzminderung auf molekulargenetischer Ebene zu nähern. Die Unterschiede zwischen den beiden Krankheitsentitäten, sowohl die eigentliche molekulargenetische Diagnose als auch die methodische Herangehensweise betreffend, sollen im Zentrum dieser Arbeit stehen.
Um zwischen einer isolierten Fehlbildung und einem Symptom im Rahmen einer syndromalen Erkrankung zu unterscheiden, bedarf es einer sorgfältigen Anamnese und klinischen Untersuchung. Um die hieraus resultierende Verdachtsdiagnose zu überprüfen, wird in der Regel eine genetische Diagnostik veranlasst. Eine Sicherung der Diagnose ist für das weitere Vorgehen entscheidend. Das klinisch richtige Erkennen einer syndromalen Erkrankung lässt häufig eine gezielte Diagnostik bei bekanntem genetischen Hintergrund zu. Eine nicht-syndromale Erkrankung hingegen kann bei unbekannter genetischer Ursache eine diagnostische Odyssee nach sich ziehen.
Durch Untersuchungen zur Genetik einer syndromalen und einer nicht-syndromalen Erkrankung sollen die Gemeinsamkeiten und die Unterschiede beider Entitäten beschrieben werden.

1.1 Intelligenzminderung

1.1.1 Definition

Eine stagnierende Entwicklung der geistigen Fähigkeiten während der kindlichen Entwicklung bis zum 18. Lebensjahr wird als Intelligenzminderung (IM) (HP:0001249) bezeichnet und umfasst neben der Einschränkung der kognitiven Leistungsfähigkeit, erfasst durch den Intelligenzquotienten (IQ), auch Funktionsstörungen der Sprache, des Affekts und der motorischen und sozialen Fähigkeiten. In der medizinischen Fachsprache werden die Termini ‘Intelligenzminderung’, ‘mentale Retardierung’ und ‘geistige Behinderung’ synonym verwendet. In den letzten Jahren war in der englischsprachigen Fachliteratur ein Wechsel von dem bis dahin vorherrschenden Begriff ’mental retardation’ zu der Bezeichnung ‘intellectual disability’ zu beobachten [1]. Weg von einer statischen, auf den reduzierten IQ des Betroffenen gerichteten Sicht der Erkrankung soll dieser Begriff auf eine neue Perspektive hinführen, die die Fähigkeiten und Möglichkeiten zu Interaktion und Förderung betont. Es gibt jedoch auch Stimmen, die diese Umbenennung als unsinnig kritisieren

und darauf hinweisen, dass die neue Bezeichnung der Diskriminierung von Betroffenen nicht entgegenwirkt und in wenigen Jahren ebenfalls als abwertend wahrgenommen wird [2]. Die Bezeichnung ‘intellectual disability’ wurde auch in die International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) aufgenommen.
Intelligenzminderung ist mit die häufigste Ursache für die Konsultation einer genetischen Beratung und Untersuchung [3]. Die Kosten für Unterstützung und Therapie der Betroffenen sind erheblich. Weltweit stellt Intelligenzminderung die in der ICD-10 kostenintensivste Diagnose bezüglich Behandlung und Folgeerscheinungen dar [3].

Der Begriff ‘Intelligenz’ (lateinisch *intelligentia* ’Verständnis’, ’Einsicht’) umschreibt eine Vielzahl von Fähigkeiten und wird in den verschiedenen wissenschaftlichen Fachbereichen uneinheitlich definiert. Logisches Verständnis, Abstrahierungsvermögen, Kreativität, Sprachvermögen und räumliche Vorstellungskraft sind nur einige Beispiele dafür, was im Allgemeinen unter dem Begriff "Intelligenz" subsummiert wird. Entsprechend kritisch ist eine Objektivierung und Messung von Intelligenz mittels eines Intelligenzquotienten zu werten. Soziale und emotionale Kompetenz aber auch musische Begabung werden im IQ-Test beispielsweise nicht erfasst. Dennoch ist die Erhebung eines Intelligenzquotienten aus Gründen der Praktikabilität und Vergleichbarkeit ein wichtiges wissenschaftliches und diagnostisches Mittel. Ein IQ von 100 entspricht definitionsgemäß dem Modalwert der Altersgruppe. Es ist zu berücksichtigen, dass ein IQ-Test für Menschen mit einem IQ in der Nähe des zu erwartbaren Mittelwertes entworfen wurde und daher bei der genaueren Beurteilung von Leistungen an den Enden der Skala an seine Grenzen stößt. Ein IQ im Bereich von 84-70 Punkten wird als Lernbehinderung bezeichnet und entspricht dem Bereich zwischen der ersten und zweiten Standardabweichung unterhalb des Mittelwertes. In Tabelle 1.1 ist die Klassifikation der Intelligenzminderung (IM) nach ICD-10 dargestellt [4].

Es wird zwischen leichter Intelligenzminderung mit einem IQ zwischen 50 und 69 und schwerer Intelligenzminderung mit einem IQ kleiner 50 unterschieden. Diese Unterteilung ist sinnvoll, da sich zwischen beiden Gruppen ätiologische Unterschiede zeigen [5, 6], siehe Kapitel 1.1.2. Die American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD) fordert, bei der Evaluation und Diagnostik von Intelligenzminderung sich nicht auf die Erhebung des Intelligenzquotienten zu beschränken, sondern diesen als Baustein der Diagnostik gemeinsam mit weiteren klinischen Explorationen zu verwenden.

Aus klinischer Sicht kann man Intelligenzminderung in syndromale und nicht-syndromale Formen einteilen. Bei der syndromalen Form ist die Intelligenzminderung Teil eines Syndrom-spezifischen Symptomenkomplexes, welcher Fehlbildungen, neurologische Veränderungen und Dysmorphiezeichen beinhalten kann. Häufig ist die zugrunde liegende genetische Ursache bekannt. Betroffene können durch ihre charakteristischen syndromalen Merkmale manchmal bereits klinisch einem Krankheitsbild zugeordnet werden. Beispielhaft sei hier die Trisomie 21 (Down-Syndrom) genannt. Patienten mit nicht-syndromaler Intelligenzminderung weisen keine charakteristischen zusätzlichen Symptome auf. Epilepsie (HP:0001250) oder Mikrozephalie (HP:0000252) sind in vielen Fällen als begleitende unspezifische Merkmale mit Intelligenzminderung assoziiert;

jedoch wird dies nicht als syndromal bezeichnet.

Grad der Intelligenzminderung	IQ-Bereich	Mentales Alter	Unterstützungsbedarf
Leichtgradige Intelligenzminderung (HP:0001256)	50-69	9 - <12 Jahre	Viele Erwachsene können arbeiten, gute soziale Beziehungen unterhalten, ihren Beitrag zur Gesellschaft leisten
Mittelgradige Intelligenzminderung (HP:0002342)	35-49	6 - <9 Jahre	Unterschiedliches Maß an Unterstützung notwendig; die meisten können gewisses Maß an Unabhängigkeit erreichen
Schwere Intelligenzminderung (HP:0002187)	20-34	3 - <6 Jahre	Andauernde Unterstützung notwendig
Schwerste Intelligenzminderung (HP:0010864)	< 20	< 3 Jahre	Die eigene Versorgung, Kontinenz, Kommunikation und Beweglichkeit sind hochgradig beeinträchtigt

Die Klassifizierung der Human Phenotype Ontology wird in Kapitel 2.1 vorgestellt

Tabelle 1.1: Intelligenzminderung nach ICD-10

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Die Prävalenz von Intelligenzminderung variiert in der Literatur stark und wird zwischen 0,6% [7] und 13,9% angegeben [5]. Eine Meta-Analyse von 43 Studien verschiedener Länder aus den Jahren 1981-1995 ergab eine geschätzte Prävalenz von circa 2,9% bei Kindern im Alter von 5-19 Jahren [8]. In ihrer Übersichtsarbeit weisen die Autoren aber insbesondere auf Ungenauigkeiten bei der Datenerhebung in weniger entwickelten Ländern hin [8]. Eine neuere Meta-Analyse von 52 Studien der Jahre 1980-2009 ergab eine Prävalenz von 1,04% [9]. Besonders für die Prävalenz geringfügiger Intelligenzminderung (IQ-Bereich 69-50) werden in Studien variierende Angaben gemacht. Von verschiedenen Autoren wird eine Prävalenz von etwa 1-3% angegeben [8, 10].

Bemerkenswert erscheint, dass die Prävalenz schwerer Intelligenzminderung (IQ<50) (HP:0002187, HP:0010864) jedoch relativ konstant bei 0,4% erhoben wird [8, 11]. In den Entwicklungs- und Schwellenländern wurde eine mehr als doppelt so hohe Prävalenz von 0,9% bei schwerer Intelligenzminderung gemessen [8], möglicherweise bedingt durch mangelnde Vorsorge, Mangelernährung, schlechtere perinatale Versorgung und häufigere konsanguine Eheschließungen.
Die Ursachen für Intelligenzminderung sind höchst heterogen und können endogen, genetischer, wie auch exogen, nicht-genetischer Natur sein. Folgende Ursachengruppen können bei Intelligenzminderung nach Curry et al., 1997, unterschieden werden [12]:

Ursachen	*%*
Chromosomale Anomalien	4-28
Erkennbare Dysmorphie-Syndrome	3-7
Bekannte monogene Erkrankungen	3-9
Strukturelle ZNS-Fehlbildungen	7-17
Komplikation bei Frühgeburt	2-10
Umweltbedingte und teratogene Ursachen	5-13
Kulturell-familiäre Ursachen	3-12
Bislang unbekannte, monogene Erkrankungen	1-5
Metabolisch/endokrine Ursachen	1-5
Unbekannt	30-50

Tabelle 1.2: Relative Häufigkeit der Ursachen angeborener Intelligenzminderung

Demnach bleibt bei bis zu der Hälfte der Betroffenen die Ursache unerkannt. Möglicherweise werden auch einige Patienten trotz Unklarheiten fälschlicherweise einer bestimmten Ätiologie zugeordnet. In solchen Fällen könnte eine weitergehende genetische Analyse neue Erkenntnisse fördern [13]. Eine weitere Möglichkeit in der Einteilung der Genese ist die zeitliche Kategorisierung. Einige Autoren unterscheiden mögliche pränatale, perinatale und postnatale Ursachen für IM:

- **pränatal**: genetische Veränderungen, Drogen und Medikamentenabusus der Mutter, maternale Infektionen, Fehlbildungen, Stoffwechselerkrankungen, Krankheit der Mutter
- **perinatal**: Frühgeburtlichkeit (<32. Schwangerschaftswoche), Geburtsgewicht <1500g, Minderversorgung unter der Geburt, Infektionen, Stoffwechselerkrankungen
- **postnatal**: Infektionen, Stoffwechselerkrankungen, Traumata, Mangelernährung, psychosoziale Faktoren

Strømme (2000) wies in einer Studie mit 176 Kindern mit Intelligenzminderung bei denjenigen, bei denen eine Diagnose erhoben werden konnte (80,5%), eine Häufigkeitsverteilung von pränatal 59%, perinatal 4,5% und postnatal 3% nach. Unklarheit zum Zeitfenster der Schädigung bestand bei 14% [6]. Betrachtet man Patienten mit schwerer oder geringfügiger Intelligenzminderung getrennt, zeigt sich bei der schwereren Form eine deutlich höhere Zahl pränataler Schädigungen: 70% versus 51% [6], bzw. 60% versus 22% [5].
Umwelteinflüsse gelten als wichtige Ursache für Intelligenzminderung. Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft ist unter den Umwelteinflüssen ein wichtiger vermeidbarer Faktor. Unter den von Alkoholkonsum geschädigten Kindern weisen die meisten eine leichtgradige Intelligenzminderung auf [14]. In den Industriestaaten ist Alkoholmissbrauch der Mutter während der Schwangerschaft die häufigste Ursache für eine Intelligenzminderung des Kindes [3].
Beispiele für eine erfolgreiche Maßnahme zur Prävention und Reduktion von kongenitaler Intelligenzminderung sind die Iodierung von Speisesalz und die Aufnahme der Jodsupplementierung in

die Mutterschaftsrichtlinien zur Prävention der Hypothyreose und die präkonzeptionelle Folsäureeinnahme zur Reduktion der Inzidenz der Spina bifida [15].
Zudem weisen Studien auf den Zusammenhang zwischen niedrigem sozioökonomischen Status und erhöhter Prävalenz von geringgradiger Intelligenzminderung hin (HP:0001256) [8, 16]. Geringgradige Ausprägung von Intelligenzminderung könnte vorwiegend durch exogene Faktoren wie Alkohol, Mangelernährung und frühkindliche Deprivation bedingt sein, sofern eine gewisse endogene Disposition besteht. Manche Autoren betrachten die milde Form der Intelligenzminderung als untere Normvariante, deren Ausprägung von externen Faktoren beeinflusst wird. Es wird hierbei von einem komplexen Zusammenspiel aus Umweltfaktoren und genetischer Veranlagung ausgegangen, eine multifaktorielle Verursachung mit komplexer Genetik, da seltener eine eindeutige biologische Ursache identifiziert werden kann als bei schweren Formen [17, 18, 6]. Menschen mit Intelligenzminderung leiden signifikant häufiger an chronischen Krankheiten als der Rest der Bevölkerung und bedürfen daher einer besonderen medizinischen Aufmerksamkeit [19]. Die Intelligenzminderung ist somit ein wichtiges gesundheitliches Problem, für welches bislang nur geringe präventive und therapeutische Interventionsmöglichkeiten bestehen.

1.1.3 Genetik der Intelligenzminderung

In den vergangenen Jahren wurden erfolgreich erhebliche Anstrengungen unternommen, um die genetischen Ursachen von Intelligenzminderung zu erforschen. Zwillingsstudien weisen darauf hin, dass der Intelligenzquotient in hohem Prozentsatz genetischer Konstitution zuzuschreiben ist [20, 21]. Man unterscheidet unter den genetischen Veränderungen chromosomale Ursachen wie Aneuploidie oder submikroskopische chromosomale Aberrationen von monogenen Veränderungen. Lichtmikroskopisch sichtbare chromosomale Aberrationen sind mit 15% die häufigste genetische Ursache von IM [22]. Hier bildet Trisomie 21 (Down-Syndrom) mit circa 9% die größte Gruppe (siehe Tabelle 1.2, S.4) [23]. Möglicherweise können bislang ungeklärte Fälle von Intelligenzminderung künftig durch eine Vielzahl unterschiedlicher monogener Veränderungen und Rearrangements von Subtelomer-Regionen erklärt werden [24]. Im Folgenden werden die unterschiedlichen genetischen Vererbungsmuster und ihre Bedeutung für die Aufklärung von Intelligenzminderung erläutert.

Homozygotie und Heterozygotie

Der Mensch ist ein diploider Organismus und trägt als solcher 23 Chromosomenpaare. Auf den Chromosomen befindet sich in Form von Basensequenzen der Desoxyribonucleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid, DNA) die Erbinformation. Diploidie bedeutet, dass jedes Chromosom zweifach vorliegt (von griech. Diploe, 'Doppelheit'); von jedem Elternteil erhält der Mensch eines. Jedes Gen liegt also in zweifacher Ausführung, in zwei Kopien, vor. Diese Kopien, auch Allele genannt, können sich gleichen oder unterscheiden. Handelt es sich bei beiden Allelen um die gleiche Variante des Gens, spricht man von Homozygotie oder 'Reinerbigkeit'. Unterscheiden sich die

Allele voneinander, wird dies als Heterozygotie oder 'Mischerbigkeit' bezeichnet. In der Genetik unterscheidet man beim Vorliegen heterozygoter Allele hinsichtlich der Merkmalsausprägung zwischen dominant/rezessiver, kodominanter und intermediärer Vererbung.
Bei Ersterem setzt sich das dominante Allel vor dem rezessiven Allel durch und wird phänotypisch sichtbar, während die Erbinformation des rezessiven Allels nicht ausgeprägt wird. Allele, welche als kodominant gelten, führen bei Heterozygotie zur Ausprägung beider Allele. Zurückzuführen ist das Wissen um den Zusammenhang von Allelen und phänotypischer Segregation auf Gregor Mendel, welcher im Jahr 1866 seine 'Versuche über Pflanzen-Hybriden' publizierte [25]. Der Augustinermönch beobachtete anhand der Färbung von Blüten der Erbsenpflanze über mehrere Generationen bestimmte Gesetzmäßigkeiten und beschrieb als Ergebnis seiner Forschung erstmals die Konkurrenz und Durchsetzungsfähigkeit verschiedener Merkmale untereinander sowie die unabhängige Vererbung von Merkmalen. Erst sehr viel später wurde durch die Identifizierung der Chromosomen als Träger der Erbinformation der Beleg für seine Thesen erbracht.
Für das Vorliegen von Homozygotie gibt es zwei mögliche Erklärungen: Zum einen ist in einer Verwandtenehe die Möglichkeit gegeben, dass eine chromosomale Region von einem gemeinsamen Vorfahr über die miteinander verwandten Eltern an ein Kind weitergeben wurde: Autozygotie ("identical by descent"). Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass Homozygotie durch das häufige Vorkommen des Allels in der Population zufällig bedingt ist ('identical by state'). Je seltener jedoch ein bestimmtes Allel in der Population, desto wahrscheinlicher ist in einer konsanguinen Familie die Vererbung durch einen gemeinsamen Vorfahren der verwandten Eltern.

X-chromosomal vererbte Intelligenzminderung

Das Geschlechterverhältnis bei den Betroffenen (männlich : weiblich = 1,4 : 1) zeigt, dass Jungen signifikant häufiger von IM betroffen sind. Bei schwerer Intelligenzminderung ist das Ungleichgewicht noch größer (männlich : weiblich = 1,9 : 1) [26]. Dies ist mutmaßlich auf X-chromosomale Gendefekte zurückzuführen, da Intelligenzminderung bei Jungen in etwa 10% auf X-chromosomale Gendefekte zurückzuführen ist. Bei syndromalen Formen sind eine kleine Zahl ursächlicher Gene bekannt, welche für einen großen Prozentsatz der X-gebundenen Intelligenzminderung verantwortlich sind. So ist das *FMR1*-Gen, dessen Mutation zum Fragiles-X-Syndrom führt, für 25% der X-chromosomalen Fälle von IM verantwortlich. Weitere Beispiele für syndromale Gendefekte auf dem X-Chromosom mit Intelligenzminderung sind unter anderen das Coffin-Lowry- und das Lesch-Nyhan-Syndrom [27]. Mutationen im gleichen Gen können jedoch zu unterschiedlichen Phänotypen führen. Ein Beispiel hierfür ist das *ARX*-Gen, in dem Mutationen zum einen zu verschiedenen schwerwiegenden syndromalen Erkrankungen wie dem West-Syndrom, einer frühkindlichen Epilepsieerkrankung, führen und zum anderen auch unspezifische Intelligenzminderung bedingen können. Unspezifische, nicht-syndromale Formen der X-gebundenen Intelligenzminderung sind von den syndromalen Formen auf genetischer Ebene daher nicht scharf abgrenzbar. Bei einigen Erkrankungen werden die syndromalen Merkmale tatsächlich erst mit höherem Lebensalter apparent (z.B. Coffin-Lowry-Syndrom). Die genetischen Ursachen für nicht-

syndromale X-gebundene Intelligenzminderung sind vielfältig. Von den 110 bislang entdeckten Genen sind nur wenige für eine größere Zahl von Erkrankungen verantwortlich (Kalscheuer et al. unpublizierte Daten).

Autosomal-dominant vererbte Intelligenzminderung

Vermutlich handelt es sich bei der autosomal-dominant vererbten Intelligenzminderung in der Mehrzahl der Fälle um Neumutationen auf Grund einer verminderten Fekundität der Erkrankten. Daher ist die Suche nach genetischen Defekten mittels genetischer Kopplungsanalyse kaum möglich. In Studien konnten mittels Bruchpunkt-Analyse und Kandidaten-Gen-Sequenzierung in den unterbrochenen Chromosomenabschnitten Gene für autosomal-dominante nicht-syndromale Intelligenzminderung identifiziert werden [28]. Zuletzt konnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, die auf eine erhebliche Rolle der de novo-Mutationen hinweisen: Durch Exom-Sequenzierung konnte in bisher ungeklärten Fällen vielfach Neumutationen nachgewiesen werden, die für die Erkrankung als ursächlich angesehen werden, ohne dass bei den Eltern ein verändertes Allel gefunden wurde. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass autosomal-dominante Neumutationen für die Genese der Intelligenzminderung eine größere Rolle spielen als bisher angenommen. Exom-Sequenzierung könnte in Zukunft in der klinischen Diagnostik häufiger Verwendung finden [29, 30].

Autosomal-rezessiv vererbte Intelligenzminderung

Bei der autosomal-rezessiv vererbten Form der Intelligenzminderung zeichnet sich eine große genetische Heterogenität ab. Zum einen sind hierunter Stoffwechseldefekte wie die Phenylketonurie zu nennen. Kinder leiden unter Epilepsie (HP:0001250), Verhaltensauffälligkeiten (HP:0012433) und Intelligenzminderung (HP:0001249), wenn der Enzymdefekt nicht rechtzeitig behandelt wird. Diese Erkrankung wird in Deutschland durch das Neugeborenen-Stoffwechselscreening frühzeitig erkannt und deshalb wirksam behandelt. In anderen Ländern ist die Phenylketonurie weiterhin ein großes gesundheitliches Problem.
Andere autosomal-rezessiv vererbte genetische Defekte führen zu syndromalen wie nicht-syndromalen Formen der Intelligenzminderung. Es zeigen sich auch hier genetische Überschneidungen zwischen den beiden Gruppen [31, 32]. Keines der bislang identifizierten Gene für nicht-syndromale Intelligenzminderung scheint für eine größere Zahl von Erkrankungen ursächlich zu sein. Vielmehr kann eine große Zahl von Genen bei Störung ihrer Struktur zu nicht-syndromaler IM führen [33]. Wegen der ausgeprägten Locus-Heterogenität mit über das gesamte Genom verteilten Loci, stellen sich besondere diagnostische Herausforderungen. Besonders günstig erscheint die Untersuchung von großen konsanguinen Familien, in denen mehrere Kinder von Intelligenzminderung betroffen sind. Unter der Annahme, dass bei den Betroffenen innerhalb einer Geschwisterreihe das gleiche Gen in seiner Struktur und Funktion gestört sein muss, kann eine besondere Methode zur Eingrenzung des mutmaßlich betroffenen Chromosomenabschnitts angewandt werden.

In diesen Familien wird durch Autozygotie-Kartierung des Genoms ein gemeinsamer, autozygoter Genabschnitt bei den Betroffenen identifiziert, in dem sie sich von den gesunden Familienmitgliedern unterscheiden. Der zu untersuchende Bereich, in dem die DNA analysiert werden soll, wird so eingegrenzt. Die Methodik wird in Kapitel 2.3.1 vorgestellt. Mehrere Studien konnten durch diese Herangehensweise neue Gene für Intelligenzminderung identifizieren [33, 34]. Die Ergebnisse der Sequenzierung und die Zahl der Gen-Loci machen die große Vielfalt der involvierten Gene kenntlich [33, 35, 34, 31].

1.1.4 Diagnostik

Der häufigste Anlass für eine Konsultation in der humangenetischen Beratung ist Intelligenzminderung. Zu den Schwierigkeiten bei der Diagnostik äußerten Opitz et al., 1982 [36]:

> *"the pathogenetic/causal biology of mental retardation is forbiddingly complex and encompasses hundreds, perhaps several thousand, different entities. This realization frequently produces a virtual panic in attending medical personnel and consequently leads to... diagnostic evaluation of unnecessary complexity, invasiveness, expensiveness, and hurt to the patient"*

Die ätiologische Heterogenität von Intelligenzminderung stellt Ärzt_Innen und Beratende vor die schwierige Aufgabe, bei einer Vielzahl von möglichen Untersuchungen den betroffenen Familien beratend zur Seite zu stehen. Verschiedene Autoren haben bereits Empfehlungen für die strukturierte Anamnese, klinische Untersuchung und genetische Analyse erstellt [12, 37, 38]. Die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Diagnose wird durch folgende Umstände erhöht: Es ist sinnvoll, dass der Untersuchende das Kind von einem frühen Lebensalter an über einen längeren Zeitraum betreut und Veränderungen regelmäßig begutachtet. Zudem spielt der Kontakt zu und Wissen über Familienangehörige eine wichtige Rolle [12]. Erschwerend für die Diagnostik ist, dass Mutationen in solchen Genen, welche in vielen Fällen eine syndromale und durch den Phänotyp richtungsweisende Erkrankung verursachen, in einigen Fällen nicht-syndromale Intelligenzminderung hervorrufen [39]. Die phänotypische Variabilität ist ein weiteres Problem für die korrekte ätiologische Zuordnung von Symptomen: Bei zwei Familien mit identischer Mutation im *ARX*-Gen, siehe Kapitel 1.1.3, zeigten die Betroffenen gänzlich unterschiedliche Phänotypen [40]. Das Fehlen von eindeutigen Symptomen oder hinweisgebenden Dysmorphiezeichen kann so die Diagnostik erschweren und im Extremfall auf Abwege führen.

1.2 Kranioektodermale Dysplasie im Spektrum der Ziliopathien

1.2.1 Ziliopathien

Zilien sind Zellorganellen, die in vielen Zellarten des Körpers vorkommen und wichtige Funktionen durch die Fähigkeit zu Signaltransduktion, Motilität und Sensorik erfüllen. Olfaktorische

Rezeptoren in Zilien der Nase befähigen den Menschen zum Riechen; der Urinstrom wird in der Niere durch sensomotorische Zilien detektiert. Auch Schleim der Atemwege, zerebraler Liquor und Eizellen werden durch ziliare Motilität bewegt. Zudem werden die Organellen für die skeletale Entwicklung als wichtig eingeschätzt [41]. Bislang ist das Zusammenwirken der ziliaren Proteinbausteine wenig verstanden. Jedoch sind die vielfältigen Auswirkungen auf verschiedene Organsysteme bei Funktionsstörungen von Zilien hinweisgebend für die Bedeutung dieser Zellorganellen.

Man unterscheidet bei Zilien bewegliche Zilien (Kinozilien), die eine zentrale Mikrotubuli-Struktur haben, von nicht-beweglichen, sogenannten "primären Zilien". Letztere sind von einer Plasmamembran umgeben, in deren Innerem mehrere Mikrotubuli ein Axonem bilden. Die Mikrotubuli bilden neun Dubletts aus je einem A- und einem B-Tubulus, sodass ein 9x2-Muster entsteht, welcher im Basalkörper der Zilie verankert ist. Kinozilien verfügen des weiteren über ein zentrales Mikrotubulus-Paar (9x2+2 -Muster). Über das Axonem werden Zellproteine transportiert. Dieser Prozess heißt intraflagellarer Transport. Für den antegraden Transport von der Basis zur Spitze ist der intraflagellare Transport Komplex B (IFT-B) zusammen mit dem Motorprotein Kinesin-2 verantwortlich. Der retrograde Transport wird durch den intraflagellaren Transport Komplex A (IFT-A) und Dynein-2 gewährleistet [42].

Ziliopathien sind Erkrankungen, die auf pathologischen genetischen Veränderungen beruhen und die Dysfunktion ziliärer Proteine zur Grundlage haben. Neben den benannten Makromolekülen IFT-A und IFT-B sind eine Vielzahl weiterer Proteine an Zilienaufbau und Funktion beteiligt. Das breite Spektrum ziliarer Funktionen wirkt sich bei Defekten dieser Proteine insofern aus, als dass die Krankheitssymptome vielfältig sind und unterschiedliche Organsysteme betreffen. Veränderungen in verschiedenen Proteinen, die auf biologischer Ebene in ihrer Funktion eng verknüpft sind, können ungeachtet dessen zu ganz unterschiedlichen Symptomen führen. Drei mögliche Erklärungen benennt Marshall für dieses Phänomen: Ziliare Gene haben möglicherweise abseits dieses Zellorganells weitere Funktionen, deren Störungen zu bestimmten Symptomen führt. Zudem betreffen Veränderungen möglicherweise nur einen kleinen Teil der Zilien des Körpers, da die Genexpression in verschiedenen Zellen unterschiedlich ist. Außerdem könnten genetische Veränderungen immer zu anderen molekularen Veränderungen in Proteinstruktur und Funktion führen und so nur bestimmte Teilbereiche der Zilienfunktion betreffen [43]. ‘Moonlighting’ (engl. Ausüben mehrerer Tätigkeiten) beschreibt das Phänomen, dass ein einziges Protein mehrere Funktionen ausüben kann und bietet eine weitere Erklärung für die vielfachen Auswirkungen bei der Veränderung ziliärer Proteine [44].

Es werden eine Vielzahl von Syndromen unter dem neuen Krankheitsbegriff der Ziliopathien zusammengefasst. Bei den verschiedenen Krankheitsentitäten zeigen sich überlappende Symptome, wie aus folgender Tabelle ausgewählter Ziliopathien hervorgeht. Die gelisteten Symptome sind unter dem Gesichtspunkt der Vergleichbarkeit gewählt:

Ziliopathie	variable Symptome
Laurence-Moon-Biedl-Bardet-Syndrom	Polydaktylie, Retinitis pigmentosa, tief sitzende Ohren, lateral abfallende Lidachse, Nierenhypoplasie, Adipositas, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Minderwuchs
Joubert Syndrome 21	Zerebelläre Ataxie, muskulären Hypotonie, okulomotorische Apraxie, Polydaktylie, Intelligenzminderung, retinale Degeneration
Ellis-van Creveld-Syndrom	Postaxiale Polydaktylie, dysplastische Nägel, kongenitale Herzfehler, Osteochondrodysplasie, Kleinwuchs
Mainzer-Saldino-Syndrom (SRTD9)	Zapfenförmige Epiphysen, Retinitis pigmentosa, Nephronophthise, Ataxie, Leberfibrose
Kranioektodermale Dysplasie	Dolichozephalie, prominente Stirn, Rhizomelie, Brachydaktylie, enger Thorax, Nephronophthise

Tabelle 1.3: Übersicht über die phänotypische Variabilität bei ausgewählten Ziliopathien

1.2.2 Kranioektodermale Dysplasie

Die Kranioektodermale Dysplasie (engl. Cranioectodermal Dysplasia, CED), nach der Erstbeschreiberin auch Sensenbrenner-Syndrom genannt, ist eine seltene genetische Erkrankung aus der Gruppe der Ziliopathien. Skeletale Anomalien wie ein enger Thorax, Rhizomelie (HP:0008905), Brachydaktylie (HP:0001156) und ektodermale Merkmale wie weit auseinanderstehende hypoplastische Zähne (HP:0000691), dysplastische Nägel (HP:0002164), feines, dünnes Haar (HP:0008070), überdehnbare Haut (HP:0000973) und Gelenke (HP:0001388) sowie eine typische Gesichts- und Kopfform mit Dolichozephalie (HP:0000268), vorgewölbter Stirn (HP:0002007), niedrig ansetzenden Ohren (HP:0000369) und evertierter Unterlippe (HP:0000232) sind die charakteristischen Kennzeichen der CED. Die Datenbank Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) führt vier verschiedene Subtypen auf Grund der vier beteiligten Gene: CED Typ 1 (OMIM #218330), verursacht durch Mutationen in *IFT122*, CED Typ 2 (OMIM #613610) verbunden mit Mutationen in *WDR35*, CED Typ 3 (OMIM #614099), verursacht durch Mutationen in *IFT43* (alte Bezeichnung *C14ORF179*) und CED Typ 4 (OMIM #614378) mit beschriebenen Mutationen in *WDR19*. Eine eindeutige phänotypische Unterscheidung zwischen den genetischen Unterformen ist auf Grund der Variabilität der Merkmalsausprägung nicht möglich [45]. Im Kapitel 4.3 sind in Tabelle 4.1, S.72, die gemeinsamen Merkmale der verschiedenen Subtypen der CED anhand der ‘Clinical Synopsis’ nach OMIM aufgeführt.

Erstmals wurde das Syndrom im Jahr 1975 von Judith A. Sensenbrenner et al. anhand eines Geschwisterpaares beschrieben [46]. Bruder und Schwester litten seit der Geburt an den gleichen Symptomen: Langschädel durch frühzeitige Verknöcherung der Sagittalnaht (Dolichozephalie, HP:0000268), armbetont verkürzte Gliedmaßen (Rhizomelie, HP:0008905), schmaler Thorax (HP:0000774) mit Trichterbrust (Pectus excavatum, HP:0000767), Spitzknickfuß (Pes equinova-

rus, HP:0001762), weit auseinanderstehende, kleine Zähne (Mikrodontie, HP:0000691), hoher Gaumen (HP:0000218), kurzes, spärliches Haar (HP:0008070), eine prominente Stirn (HP:0002007) und lateral abfallende Lidachsen mit doppelter medialer Lidfalte (Epikanthus, HP:0000286). Zudem litt der Bruder an muskulärer Hypotonie (HP:0001252). Levin et al. fassten 1977 in ihrer Arbeit die Symptome jener von Sensenbrenner et al. beschriebenen Kinder und die dreier weiterer Betroffener zusammen. Aus der klinischen Symptomatik mit knöchernen fazialen und die Extremitäten betreffenden Dysmorphien sowie den pathologischen Veränderungen an ektodermalem Gewebe (Zähne, Haut und Hautanhangsgebilde) leiteten sie die Bezeichnung 'Kranioektodermale Dysplasie' ab [47]. Die Wortschöpfung besteht aus drei Begriffen, die vom Duden folgendermaßen definiert werden: Kranium - knöcherner Schädel, ektodermal- vom äußeren Keimblatt abstammend- und Dysplasie - Fehl-/Unterentwicklung [48]. Inzidenz und Prävalenz der Erkrankung sind nicht bekannt, jedoch wurden in der Folge bislang 42 Patienten in der Literatur genannt, davon 34 mit genauer klinischer Beschreibung [46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 45, 64]. Mit der steigenden Zahl an Publikationen wurde die Heterogenität des Phänotyps deutlicher (siehe Tabelle 4.1 auf S.72). Für Morbidität und Mortalität bedeutsam sind die Nieren- und Leberbeteiligung. Häufig führt die meist als interstitielle Tubulonephropathie (HP:0001970) beschriebene Veränderung der Nieren zu chronischer renaler Niereninsuffizienz (HP:0003774) [46, 47, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 45, 64]. Die älteste bekannte Patientin ist eine 22jährige Frau mit progredientem chronischen Nierenversagen [64]. Patienten mit Kranioektodermaler Dysplasie erreichen meist nur das Kindesalter auf Grund der schwerwiegenden Nierenbeteiligung [45]. Drei der bislang beschriebenen Kinder litten zudem an Retinopathia pigmentosa (HP:0000510) [65, 54]. Costet et al. stellen die CED daher in Verbindung zu okulorenalen Syndromen, wie dem Jeune- oder dem Senior-Loken-Syndrom [54]. Amar et al. berichteten 1997 von einem Mädchen, welches neben Dolichozephalie (HP:0000268) und Rhizomelie (HP:0008905) weitere Auffälligkeiten aufwies: Mikrozephalie (HP:0000252), Störung der Kalzium-Homöostase (HP:0004363), Kleinwuchs (HP:0004322), Photophobie (HP:0000613) und Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) [52]. In einigen Fällen wurden Anomalien der Leber wie Hepatomegalie (HP:0002240), zystische Veränderungen (HP:0006706), Fibrose (HP:0001395) und Malformationen des biliären Systems (HP:0012440) [47, 58, 66, 62] beschrieben. Auch kongenitale Herzfehler (HP:0002564) werden bei einigen Betroffenen beobachtet [47, 56, 66, 62]. Zerebrale Anomalien wurden von verschiedenen Autoren beschrieben, unter anderem kortikale Atrophie (HP:0002120) [62, 64], vergrößerte Cisterna magna (HP:0002280) [67] oder eine Hypoplasie des Corpus callosum (HP:0002079) [51, 55]. Die Tabelle 1.4 fasst die häufigsten Merkmale der Kranioektodermalen Dysplasie zusammen (nach Arts und Knoers, 2013).

Genetische Ursachen der Kranioektodermalen Dysplasie

Erstmals konnte im Jahr 2010 von Walzcak-Sztulpa et al. eine genetische Ursache für das Sensenbrenner-Syndrom gefunden werden [60]. Die Autoren untersuchten 13 Patienten aus zwölf verschiedenen Familien. Die Eltern des einzigen Geschwisterpaares entstammten der gleichen Fami-

Merkmal	**Detailliert beschriebene Patienten (N=34)**	**Davon mit genetischer Diagnose (N=18)**
Charakteristisches Gesicht	32	18
Brachydaktylie (HP:0001156)	32	18
Enger Thorax, kurze Rippen (HP:0000773, HP:0000774)	30	17
Rhizomelie (HP:0008905)	29	15
Dolichozephalie (HP:0000268)	29	14
Zahnanomalien (HP:0000164)	26	15
Feines dünnes Haar (HP:0008070)	21	7
Kleinwuchs (HP:0004322)	20	11
Nephronophthise (HP:0000090)	20	15
Überdehnbare Gelenke (HP:0001388)	17	15
Lebererkrankung (HP:0001392)	16	12
Syndaktylie (HP:0010554, HP:0010621)	13	5
Nagelanomalien (HP:0002164)	12	9

Tabelle 1.4: Häufige Merkmale der Kranioektodermalen Dysplasie

lie. Auf Basis der Annahme der Konsanguinität der Eltern wurde über genomweite Autozygotie-Kartierung bei dem Geschwisterpaar eine autozygote Region auf Chromosom 3q21 - 3q24 gefunden, die mehr als 16 Megabasen umfasst. Nach Sequenzierung aller 124 Protein-kodierenden Gene einschließlich ihrer Exon-Intron-Grenzbereiche, wurde eine autozygote missense-Mutation (sinnverändernde Mutation) in *IFT122* (p.V553G) gefunden, die mit der Erkrankung segregierte. Unter den anderen elf Kindern der Studie konnten bei zwei weiteren Kindern pathogenetisch relevante Mutationen in *IFT122* festgestellt werden.
Die von Walzcak-Sztulpa et al. publizierten Daten bildeten die Grundlage für die weitere molekulargenetische Erforschung des Sensenbrenner-Syndroms. Hinweisgebend war die Funktion des durch *IFT122* codierten Proteins. Das Transkript des Gens umfasst 1292 Aminosäuren und bildet ein Protein, welches in zytoplasmatische Transportvorgänge involviert ist: Es ist Teil des sogenannten intraflagellaren Transport Komplexes A (IFT-A), welches in primären Zilien den retrograden Transport mit Dynein-2 gewährleistet (siehe Kapitel 1.2.1]. Der Proteinkomplex besteht aus sechs Komponenten: IFT43, IFT121, IFT122, IFT139, IFT140 und IFT144 [41]. Tabelle 1.5 stellt die Komponenten und die bis heute veröffentlichten Veränderungen beim Menschen dar und verdeutlicht die genetischen Überschneidungen und Gemeinsamkeiten der CED mit anderen Ziliopathien wie den Kurzrippen-Polydaktylie-Syndromen (engl. Short Rib-Polydactyly Syndrome, SRPS), darunter das asphyxierenden Thoraxdystrophie Typ Jeune (ATD-J), das Ellis-van Creveld Syndrom (EVC) und das Mainzer-Saldino Syndrom (MSS) .

Es wird aus Tabelle 1.5 ersichtlich, dass verschiedene Ziliopathien wie die Short Rib-Polydaktylie-Syndrome und die Kranioektodermale Dysplasie durch Mutationen in ein und denselben Genen verursacht werden können. Dieses Phänomen, die phänotypische Ausprägung verschiedener Merkmale durch einen Genotyp, wird als Polyphänie bezeichnet.

Protein	**Gen**	**Genlocus**	**Assoziierte Erkrankung**	**Publikation**
IFT43	*IFT43*	14q24.3	CED	[66]
IFT121	*WDR35*	2p24.1	CED, SRPS	[68, 69, 62, 63]
IFT122	*IFT122*	3q21.3-q22.1	CED	[60, 64]
IFT139	*TTC21B*	2q24.3	Nephronophthisis, ATD-J	[70]
IFT140	*IFT140*	16p13.3	MSS	[71]
IFT144	*WDR19*	4p14	CED, SRPS, Nephronophthisis	[61, 72]

Tabelle 1.5: Proteinkomponenten des IFT-A Komplexes

Alle in der Folge für das Sensenbrenner-Syndrom identifizierten genetischen Veränderungen betreffen vier Gene und ihre Proteine, die am IFT-A beteiligt sind: *IFT122*, *WDR35*, *IFT43* und *WDR19*. Bei vielen der identifizierten Defekte handelt es sich um compound-heterozygote Defekte. Zwischen diesen und den homozygoten Veränderungen konnten keine eindeutigen phänotypischen Unterschiede festgestellt werden. Keine der Mutationen sind biallelisch non-sense Mutationen oder Deletionen. Von den insgesamt 42 beschriebenen Patienten wurden in 18 Fällen die genetischen Ursachen identifiziert, siehe Tabelle 1.6.

Diagnose	**Gen**	**Patienten**	**Prozent**	**Publikation**
Rein klinisch		24	57,1%	[46, 47, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 62]
Klinisch & genetisch	*IFT122*	7	16,7%	[60, 64]
Klinisch & genetisch	*WDR35*	7	16,7%	[68, 62, 63, 45]
Klinisch & genetisch	*IFT43*	2	4,8%	[66]
Klinisch & genetisch	*WDR19*	2	4,8%	[61]

Tabelle 1.6: Molekulargenetische Ursachen der Kranioektodermalen Dysplasie

Mehrere Untersuchungen belegen, dass eine Funktionsstörung in IFT-A-Proteinen zu einer Störung des retrograden Transports von der Zilienspitze zur Basis führt. Walzcak-Sztulpa et al. konnten durch Kultur der Fibroblasten ihrer Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant reduzierte Zilienlänge feststellen. Auch die Analyse von renalen Zellen in Zebrafisch-Mutanten ergab eine deutliche Reduktion der Zahl primärer Zilien und ihrer Länge in der embryologischen Nierenanlage. Eine weitere Publikation bestätigt diese Befunde bei drei weiteren CED-Patienten mit Mutationen in *IFT122* [64]. Die Nierenbeteiligung bei einigen Patienten mit Sensenbrenner-Syndrom könnte hierdurch erklärt werden. Aber auch für den Aufbau der Zilie scheint das Makromolekül IFT-A wesentlich zu sein: Knock-out-Mutationen in den Genen *IFT122*,

IFT139 und *IFT144* lösten bei Algen wie auch bei Mäusen neben Defekten im retrograden Transport auch Störungen der Ziliogenese aus, was verkürzte und deformierte Zilien zur Folge hatte [69, 73]. In einem Maus-Modell zeigten die *IFT 122*-defizienten Tiere Entwicklungsstörungen verschiedener Organsysteme, wie Exenzephalie, Situs inversus, Blutungsstörung und Störungen der Extremitätenausbildung mit zum Teil letalen Folgen [74]. Es ist anzunehmen, dass auch beim Menschen eine Dysfunktion von Proteinen des IFT-A vielfältige Auswirkungen auf die Ziliogenese wie auch den Zellstoffwechsel haben kann.

1.3 Diagnostische Mittel in der Humangenetik

In diesem Abschnitt werden verschiedene diagnostische Instrumente der Humangenetik vorgestellt, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

1.3.1 Genetische Kopplung und Autozygotie-Analyse

Man spricht von Gen-Kopplung, wenn die Loci zweier Gene so nahe auf einem Chromosom beieinander liegen, dass sie mit hoher Wahrscheinlichkeit gemeinsam vererbt werden. Während der Reifeteilung der Keimzellen (Meiose) werden haploide Gameten mit einfachem Chromosomensatz gebildet (Eizellen, bzw. Samenzellen). Dabei kommt es zur Rekombination von Genen auf homologen Chromosomenabschnitten durch Crossing-Over. Diese evolutionäre ‘Finte’ erlaubt es, das Erbgut neu zu arrangieren. Das Rekombinationsmuster lässt bei Betrachtung mehrerer Loci Schlüsse zu deren Lage und Reihenfolge auf einem Chromosom zu.
Die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung steigt, je geringer der Abstand zwischen zwei Genorten auf einem Chromosom ist. Liegen die Genloci direkt nebeneinander, ergibt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Rekombinationsrate θ von 0. Die Rekombinationsrate ist definiert als die Anzahl der Rekombinationen zwischen zwei Genloci geteilt durch die Anzahl der betrachteten Meiosen. Im Umkehrschluss werden Genloci, die weit auseinander liegen, mit höherer Wahrscheinlichkeit bei der Meiose getrennt. Werden zwei Gene unabhängig voneinander vererbt, ergibt sich eine Rekombinationsrate θ von 0,5. Dabei können die Loci entfernt auf dem gleichen Chromosom oder auch auf völlig verschiedenen Chromosomen liegen. Die Rekombinationsrate kann also je nach Entfernung der Genloci Werte zwischen 0 und 0,5 annehmen und ist damit ein Maß für die Distanz. Thomas Hunt Morgan erarbeitete die Grundlage für die Kartierung von Genloci auf den Chromosomen. Die nach ihm benannte Maßeinheit Centimorgan (cM) beschreibt den Abstand von Genloci anhand ihrer Rekombinationshäufigkeit. Sind zwei Loci 1cM voneinander entfernt, ist die Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen diesen Loci 1% (eine beobachtete Rekombination in 100 Meiosen), also sehr gering. Die Maßeinheit 1 cM entspricht einer physikalischen Distanz von annäherungsweise 1 Megabase (Mb) gleich einer Million Basenpaare.
Der LOD-Score (engl. logarithmic odds ratio) ist ein statistisches Maß für die Wahrscheinlichkeit der Kopplung zweier Genloci. Der LOD-Score ist der dekadische Logarithmus der "odds ratio".

Die "odds ratio" ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer Rekombinationsrate $\theta < 0{,}5$ zwei Loci gekoppelt sind, geteilt durch die Wahrscheinlichkeit, dass die Loci nicht gekoppelt sind ($\theta = 0{,}5$). LOD = 3 bedeutet, dass bei einer beobachteten gemeinsamen Übertragung zweier Genorte die Wahrscheinlichkeit 1000 mal größer ist (Logarithmus zur Basis 10), dass beide Genorte aufgrund von Kopplung anstelle eines zufälligen Ereignisses gemeinsam übertragen wurden. Ein LOD-Score von > +3 spricht demnach für eine hohe Wahrscheinlichkeit der Kopplung. Ein LOD-Score unter -2 schließt eine Kopplung des untersuchten Markers mit dem Krankheitslocus aus. Ein so hohes Wahrscheinlichkeitsverhältnis von größer 1000:1 ist für den Nachweis einer Kopplung erforderlich, weil eine hohe a priori Wahrscheinlichkeit dagegen spricht.
Mittels Autozygotie-Analyse können chromosomale Regionen bei verschiedenen Personen als gekoppelt eingeordnet werden. Der diagnostische Ansatz zur genetischen Untersuchung eines mutmaßlich autosomal-rezessiv vererbten Gendefekts in einer Familie mit konsanguinen Verwandtschaftsverhältnissen beruht auf der Annahme, dass der Betroffene beide veränderten Allele von einem gemeinsamen Vorfahren seiner beiden Eltern geerbt hat.
Für die Identifizierung der Mutation spielt die Herkunft der mutierten Gensequenz eine große Rolle. Verfolgt man den Gedanken der Vererbung durch einen gemeinsamen Vorfahren weiter, führt dies zu der Erkenntnis, dass auch der Bereich um die Mutation herum autozygot von einem Vorfahren stammt; dies wird als identical by descent (IBD, engl. identisch durch Abstammung) bezeichnet. Im Genom verwandter Eheleute liegen mehrere Regionen, die beide von ihrem gemeinsamen Vorfahren geerbt haben. Bei der Suche nach einer pathogenen Mutation in einer solchen Familie nutzt man die Annahme, dass jene Region, in der die Mutation liegt, bei allen Betroffenen identical by descent, d.h. autozygot, vorliegt. Dieses Wissen kann unter Zuhilfenahme neuerer Erkenntnisse über genetische Marker genutzt werden, um den zu untersuchenden autozygoten Bereich im Genom einzugrenzen.
Im Zuge der Bestimmung der menschlichen Genomsequenz im Jahr 2001 im Rahmen des Human Genome Projects wurden genetische Polymorphismen identifiziert, in denen sich Individuen unterscheiden [75, 76]. Die Veränderung eines einzelnen Basenpaares durch Austausch einer Base in der Gensequenz wird als Single Nucleotide Polymorphisms (SNP, engl. Single Nucleotide Polymorphism) bezeichnet. Diese Polymorphismen charakterisieren jedes menschliche Genom und stellen etwa 90% der genetischen Variabilität dar. Monobasische Veränderungen werden als SNP bezeichnet, sofern sie bei mindestens 1% der Referenzgenome nachgewiesen wurde. SNPs bieten jedoch nur eine geringe Variabilität auf Grund der vier alternativen Einzelbasen. Vorteilhaft für die Analyse ist jedoch ihre hohe Dichte, wodurch eine sehr gute Auflösung in der Analyse erreicht werden kann. SNPs können als Marker für Kopplungsanalysen eingesetzt werden, denn diese Polymorphismen können bei autozygoter Vererbung den möglichen Krankheitslocus eingrenzen [77].
Andere genetische Marker sind Mikrosatelliten. Es handelt sich dabei um repetitive Basensequenzen von zwei bis vier Basen im menschlichen Genom, die von Individuum zu Individuum Unterschiede in der Zahl ihrer Wiederholung aufweisen. Durch die Variabilität der Zahl dieser Wiederholungen lassen sich Genome verschiedener Menschen unterscheiden. Mikrosatelliten liegen in

der Regel in nicht-kodierenden DNA-Abschnitten. Ihre Variabilität ist groß, jedoch sind sie in unregelmäßigen Abständen geringer Dichte über das Genom verteilt und bieten daher eine geringere Auflösung als SNPs. In dieser Arbeit wurden SNPs zur Autozygotie-Analyse genutzt. Den Vererbungsweg eines bestimmten Genabschnitts eines Individuums kann man durch die Analyse der SNPs bei den Eltern verfolgen. Genetische Polymorphismen eines Bereichs liegen dann beispielsweise autozygot bei dem Erkrankten und heterozygot bei seinen Eltern vor. Geht man bei einer Erkrankung in einer konsanguinen Familie von einer autosomal-rezessiven Vererbung aus, ist die Identifizierung autozygoter Regionen der erste Schritt, um den Locus der mutmaßlichen Mutation einzugrenzen.

1.3.2 Next Generation Sequencing

DNA-Sequenzierung ist die Darstellung der Basenfolge in einem DNA-Molekül. In den Protein-kodierenden Abschnitten des Genoms ist dies gleichbedeutend mit der Darstellung des genetischen Codes, da die Basenfolge bei korrekter Lesart die Aminosäurenfolge des Proteins darstellt. Insofern ist die Sequenzierung der Schlüssel zum Verständnis der Genfunktion. Auch bei nicht Protein-kodierenden Genomabschnitten spielt die Basenfolge eine Rolle, sind diese Abschnitte doch beispielsweise für Regulation und Aktivierung der Gentranskription maßgeblich.
Die frühere Sanger-Sequenzierung wurde in der Vergangenheit zu immer schnelleren und umfassenderen Sequenziermethoden modifiziert, sodass man heute mit Hilfe der neuen dritten Generation der Sequenzanalyse (‘Next Generation Sequencing’, NGS) mit bislang nicht erreichter Geschwindigkeit die genetische Basensequenz abbilden kann. Hierbei werden kurze Abschnitte der DNA mit hoher Geschwindigkeit immer wieder parallel sequenziert, daher auch die Bezeichnung ‘massive parallel sequencing’. Es gibt durch verschiedene Hersteller von Sequenzier-Systemen verschiedene Methoden. Bei dieser Arbeit wurde Illumina Genome Analyser II verwendet. Das Genom wird zunächst zufällig in kürzere Abschnitte gespalten, die eine parallel laufende Sequenzierung ermöglichen. Durch das Überlappen der einzelnen parallel sequenzierten Abschnitte und dem Vergleich mit einem Referenzgenom kann nachträglich eine kontinuierliche Sequenz bestimmt werden. Der Vorteil dieser Technologie ist ihre Anpassungsfähigkeit an die Erfordernisse. Je nach Bedarf kann mit hoher Auflösung eine kleinere Region oder aber ein gesamtes Genom geringerer Auflösung sequenziert werden. Dies gelingt durch die Einstellung der Häufigkeit der Sequenzierung eines Abschnitts. Im Englischen wird diese Genauigkeit mit dem Begriff ‘coverage depth’, oder kurz ‘coverage’ betitelt (zu Deutsch Abdeckung, Erfassung, Sicherung). Die coverage beschreibt, wie häufig eine Base durchschnittlich bei einem Sequenziervorgang dargestellt wird. Eine hohe coverage gewährleistet eine größere Genauigkeit und Sauberkeit der Daten, ist jedoch auch mit höheren Kosten verbunden. In der technischen Entwicklung wird die Verbesserung der coverage bei zugleich immer größeren parallel sequenzierten DNA-Mengen angestrebt.

1.3.3 Einzelgenanalyse

Um kleinste Sequenzveränderungen, wie beispielsweise den Austausch oder Verlust von einzelnen Nukleotiden im Genmaterial zu erkennen, werden ausgewählte Abschnitte des Genoms sequenziert. So wird die Nukleotidsequenz und damit der genetische Code für Aminosäuren lesbar. Die Methode nach Sanger bildete die Grundlage für die Sequenzanalyse und wurde in den vergangenen Jahren weiterentwickelt [78]. In Kapitel 2.3 wird diese Methode erläutert.

1.4 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit werden die Untersuchungen zu zwei autosomal-rezessiv vererbten Krankheitsbildern dargestellt. Zum einen werden molekulargenetische Untersuchungen in großen konsanguinen Familien mit autosomal-rezessiv vererbter nicht-syndromaler Intelligenzminderung beschrieben. Im Rahmen eines langjährigen Kooperationsprojekts zwischen dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin, Abteilung Molekulare Humangenetik (Direktor: Prof. H. H. Ropers) und dem Genetics Research Center (GRC) der University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran (Prof.H. Najmabadi) konnten Familien für die Untersuchung der Intelligenzminderung rekrutiert werden. Mittels Kopplungsanalyse, Exom-Anreicherung und Massen-Sequenzierung und Einzelgensequenzierung nach Sanger werden neue mögliche Gene für diese Erkrankung untersucht.
Zum anderen wird die molekulargenetische Untersuchung von neun Patientinnen und Patienten, die von Kranioektodermaler Dysplasie betroffen sind, dargestellt. Es werden zwei Gene, *WDR35* und *IFT43*, auf Veränderungen überprüft, die auf Grund des Zusammenwirkens der kodierten Proteine in dem Zilienkomplex IFT-A als ursächlich für die Erkrankung angesehen werden können.
Das Ziel dieser Arbeit ist es, für diese beiden Krankheitsentitäten neue Gene und ursächliche Mutationen zu identifizieren.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Patienten

Zur einheitlichen Beschreibung der klinischen Symptome habe ich mich in dieser Arbeit der Terminologie der Human Phenotype Ontology (HPO) bedient [79, 80]. Dieses datenbankgestützte System dient der Vereinheitlichung klinischer Bezeichnungen. So existieren im Englischen für die meisten Krankheitsmerkmale mehrere begriffliche Synonyme, die zum Teil nicht exakt das Gleiche beschreiben. Die Suche in Datenbanken wie OMIM wird somit erheblich erschwert. HPO schafft eine allgemeingültige Bezeichnungssystematik, deren Logik auf Grund der abgeleiteten Struktur leicht nachvollziehbar ist: So werden zunächst abstrakte Fehlbildungsbezeichnung immer weiter präzisiert und durch HPO-Nummern gekennzeichnet, welche in dieser Arbeit an die Symptombezeichnungen angefügt wurden. Die verwandte Datenbank Phenomizer führt die ursprüngliche Idee weiter und kann nach Benennung mehrere Symptome durch den Nutzer auch mögliche Differentialdiagnosen nennen (http://compbio.charite.de/phenomizer/) [81].

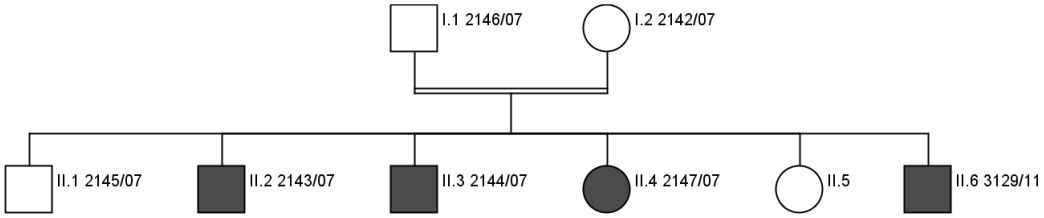
2.1.1 Intelligenzminderung

Diese Arbeit wurde im Rahmen einer langjährigen Kooperation zwischen dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin, Abteilung Molekulare Humangenetik (Direktor: Prof. H. H. Ropers) und dem Genetics Research Center (GRC) der University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran (Prof. H. Najmabadi) durchgeführt. Die in dieser Arbeit besprochenen Patienten und ihre Familien wurden in den Jahren 2004 bis 2010 durch klinische Genetiker für die Untersuchung rekrutiert. Alle in diesem Abschnitt aufgeführten Familien sind Teil der Publikation von Najmabadi et al., 2011 [35].
Im Iran entstammen in ländlichen Regionen etwa 40% der Kinder aus konsanguinen ehelichen Verbindungen; die Familien sind durchschnittlich deutlich größer als jene in westlichen Ländern [33]. Es wurden nur Patienten und Familien rekrutiert, die an nicht-syndromaler Intelligenzminderung leiden. Als Einschlusskriterien für die Untersuchung galten mindestens zwei von Intelligenzminderung betroffene Kinder in Familien konsanguiner Eltern. Die Bewertung der Entwicklung der Patienten konnte meist nur retrospektiv anamnestisch erfolgen, da sich die Betroffenen nicht seit den Kindertagen in ärztlicher Betreuung befinden. Häufig waren die Patienten schon im jungen Erwachsenenalter und wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht.

Familie G001

Die Familie G001 stammt aus Saudi-Arabien. Die Eltern sind Cousins zweiten Grades und haben gemeinsam sechs Kinder, von denen vier von schwerer Intelligenzminderung (HP:0002187), verzögerter motorischer Entwicklung (HP:0001270) und Krampfanfällen (HP:0001250) betroffen sind. Diese Familie wurde bereits beschrieben [82].

Abbildung 2.1: Stammbaum der Familie G001



Bei der letzten Untersuchung der vier betroffenen Kinder waren diese 18 (Patient 2143/07), 16 (Patient 2144/07), 13 (Patientin 2147/07) und 2 Jahre alt (Patient 3129/11). Alle Kinder wurden nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf komplikationslos geboren. Die Tabelle 2.1 fasst die klinischen Befunde der Geschwister zusammen.

Patient	**2143/07**	**2144/07**	**2147/07**	**3129/11**
Alter bei Untersuchung	18	16	13	2
Kleinwuchs (HP:0004322)	+	+	+	+
Mikrozephalie (HP:0000252)	+	+	-	-
Intelligenzminderung (HP:0002187)	+	+	+	+
Verzög. motor. Entwicklung (HP:0001270)	+	+	+	+
Erhöhter Muskeltonus (HP:0007325)	+	+	+	-
Eingeschränkte Kommunikation (HP:0002474)	+	+	+	+
Iriskolobom (HP:0000612)	+	-	-	-
Chorioretinales Kolobom (HP:0000567)	+	+	-	-
Nystagmus (HP:0000639)	+	-	-	-
Progr. Visus - Verlust (HP:0000529)	+	+	+	-
Anomalie des Corpus callosum				
Komplette Agenesie (HP:0001274)	+	-	-	-
Partielle Agenesie (HP:0001338)	-	-	-	+
Verdickt (HP:0007074)	-	+	-	-
Krampfanfälle				
Komplex-fokal (HP:0003284)	+	+	+	-
Grand mal (HP:0002069)	-	-	-	+

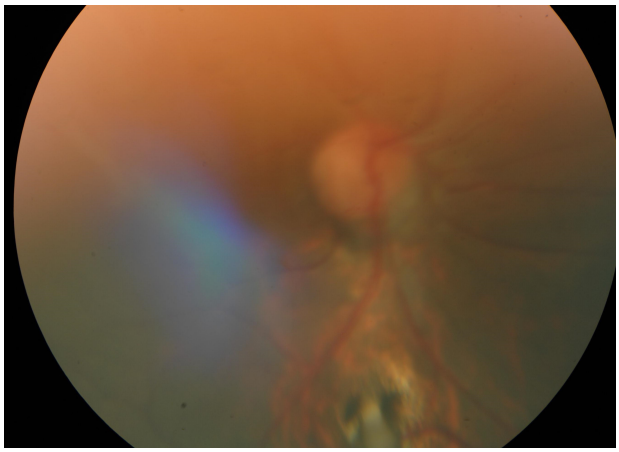
(+) Merkmal vorliegend; (-) Merkmal nicht vorliegend

Tabelle 2.1: Merkmale Familie G001

Ein progredienter Visus-Verlust (HP:0000529) zeigte sich bei den älteren Kinder mit zunehmendem Alter, so auch beim jüngsten Sohn der Familie. Bei ihm fällt jedoch das okulodigitale

Abbildung 2.2: Merkmale Familie G001

(a) Okulodigitales Zeichen Patient 3129/11



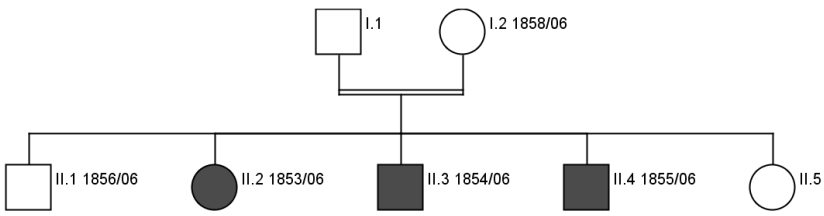
(b) Chorioretinales Kolobom Patient 2143/07

Zeichen auf, bei dem das Kind durch Kompression des Augapfels eine optische Wahrnehmung provoziert. Die ist ein Zeichen für eine eingetretene Erblindung, siehe Abbildung 2.2. Die Untersuchung von Elektrolyten, Kreatinin, Blutzellen und Leberwerten im Blut ergibt unauffällige Befunde. Ein Elektroenzephalogramm (EEG) des jüngsten Sohns weist auf eine erhöhte zerebrale Krampfbereitschaft (HP:0010841) hin.

Familie G002

Die Familie stammt aus dem Oman. Die Eltern sind Cousins ersten Grades. Von fünf Geschwistern, drei Jungen und zwei Mädchen, sind zwei Jungen und ein Mädchen von Mikrozephalie (HP:0000252) und Intelligenzminderung (HP:0002342) betroffen. Nach der Geburt des ersten Jungen, welcher sich normal entwickelt, folgt 1998 ein Mädchen. Neben einer Mikrozephalie fällt eine generalisierte Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) auf. Die zerebrale MRT wies keine Besonderheiten auf. Wegen eines Pes equinovarus (HP:0001762) wird das Mädchen im frühen Kindesalter operiert. Die beiden nachfolgenden Söhne, 2002 und 2004 geboren, weisen neben einer Entwicklungsverzögerung ebenfalls eine Mikrozephalie auf. Eine weitere Tochter der Familie, geboren 2008, ist gesund und entwickelt sich altersgerecht.

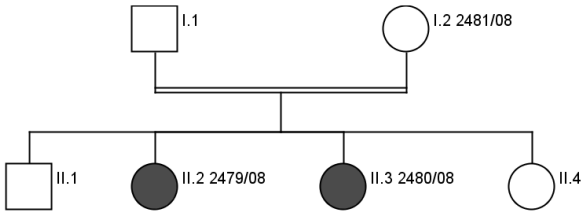
Abbildung 2.3: Stammbaum der Familie G002



Familie G008

Die Familie G008 stammt aus dem Iran. Die Eltern sind Cousins ersten Grades und haben gemeinsam drei Töchter und einen Sohn. Zwei der Töchter sind von leichtgradiger Intelligenzminderung (HP:0001256) betroffen. Geboren in den Jahren 1987 und 1990 leiden sie zudem an Ataxie (HP:0001251), Kleinwuchs (HP:0004322), Strabismus divergens (HP:0000577) und fazialer Dysmorphie: tief ansetzende Ohren (HP:0000369) und breite Nasenwurzel (HP:0000445). In der zerebralen MRT wurde eine zerebelläre Hypoplasie (HP: 0001321) diagnostiziert.

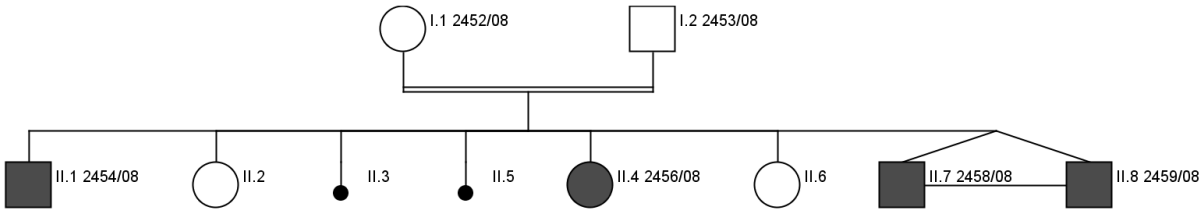
Abbildung 2.4: Stammbaum der Familie G008



Familie G015

Die Eltern dieser Familie stammen aus Pakistan und sind entfernt miteinander verwandt, ohne dass das Verwandtschaftsverhältnis genauer geklärt werden konnte. Die Familie bekam insgesamt sechs Kinder. Von den Geschwistern, drei Jungen und drei Mädchen, sind alle drei Jungen, darunter zwei monozygote Zwillinge, und eines der Mädchen von mittelgradiger Intelligenzminderung (HP:0002342) betroffen.

Abbildung 2.5: Stammbaum der Familie G015



Der erste Sohn kommt 1995 in Pakistan in der 40. Schwangerschaftswoche (SSW) nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf zur Welt. Bei der ersten Untersuchung wird ein Kryptorchismus (HP:0000028) festgestellt. Im Alter von wenigen Monaten fällt eine Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) auf. Der Junge lernt mit zweieinhalb Jahren zu laufen, erste Worte spricht er mit vier. Im Alter von drei Jahren wird eine MRT des Schädels veranlasst, welche die Erweiterung der äußeren Liquorräume (HP:0000238) und eine zerebrale Myelinisierungsverzögerung (HP:0012448) zeigt. Eine Chromosomenanalyse ist unauffällig, die Diagnostik auf fragiles X-Syndrom ebenso. Bei der Untersuchung im Alter von 12 ¾ Jahren liegen alle Körpermaße im Normbereich der Altersgruppe. Länge 153 Zentimeter (cm) (20.-25. Perzentile), Gewicht

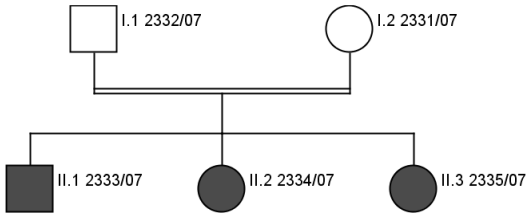
46,2 Kilogramm (kg) (50.-75. Perzentile), Kopfumfang 54cm (25.-50. Perzentile). Eine lateral abfallende Lidachse (HP:0000286), Hypertelorismus (HP:0000316) und fünf Café-au-Lait-Flecken (HP:0000957) sind die einzigen Auffälligkeiten bei der körperlichen Untersuchung. Dem ersten Sohn folgt 1997 ein gesundes Mädchen und darauf zwei Fehlgeburten.
Das dritte Kind der Familie, ein Mädchen, wird 1999 nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf spontan geboren. Gewicht, Länge und Kopfbereich liegen im Normbereich. Hinweise auf Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) finden sich in den ersten Lebensmonaten, ein Verdacht auf Blindheit sowie Taubheit bestätigt sich jedoch nicht. Eine muskuläre Hypotonie (HP:0001290) fällt auf. Eine MRT im Alter von acht Monaten ergibt einen Befund dem älteren Bruder ähnlich: erweiterte Liquorräume (HP:0000238) wie auch eine verzögerte Myelinisierung (HP:0012448). Das EEG ist unauffällig. Eine Chromosomenanalyse wie auch FISH-Subtelomer-Screening ergeben keinen Hinweis auf eine genetische Veränderung. Bei der Untersuchung im Alter von neun Jahren ist das Mädchen mit einer Größe von 125cm an der Grenze zur Kleinwüchsigkeit (Perzentile 3-10) (HP:0004322); Gewicht von 31kg (75.Perzentile) und Kopfumfang von 53cm (75.-90. Perzentile) sind jedoch normal. Das Mädchen leidet an mittelgradiger Intelligenzminderung (HP:0002342), weist jedoch keine fazialen oder anderen körperlichen Dysmorphie-Zeichen auf. Es ist im Alter von neun Jahren noch nicht kontinent.
Eine weitere Tochter, 2006 geboren, ist gesund.
Die zwei letztgeborenen Zwillingsbrüder kommen im Jahr 2007 in Großbritannien zur Welt. Die Entbindung erfolgt per Kaiserschnitt in der 31. SSW wegen diskordanten Wachstums. Der erste Junge liegt mit einem Gewicht von 1380g (20. Perzentile), einer Länge von 40cm (25. Perzentile) und einem Kopfumfang von 28,5cm (25. Perzentile) für dieses Gestationsalter im Normbereich. Der Apgar-Wert von 8/9/10 zeigt ein lebensfrisches Neugeborenes, der Nabelschnur-pH von 7,19 weist auf eine beginnende fetale Azidose hin. In den ersten Lebenstagen erleidet der Junge rezidivierende Bradykardien und Apnoen und wird zunächst per Sonde ernährt. Das Neugeborenenhörscreening gibt Anhalt für eine linksseitige Hörstörung. Bei der Augenuntersuchung fällt eine Papillenexkavation auf. Im Alter von sechs Monaten wird folgender Befund bei der körperlichen Untersuchung erhoben: Alle Körpermaße befinden sich unterhalb der 3. Perzentile: Gewicht 4200g, Länge 56cm, Kopfumfang 41cm. Der Säugling hat keine Kopfkontrolle (HP:0002421) und kann keine Objekte fixieren. Eine Klinodaktylie der Endphalangen V von Händen und Füßen beidseits fallen auf (HP:0004209, HP:0001864). Eine muskuläre Hypotonie (HP:0001290), Hypertelorismus (HP:0000316), nach lateral ansteigende Lidachsen (HP:0000492) und eine breite Nasenwurzel (HP:0000445) werden beschrieben. Im weiteren Verlauf bestätigt sich eine Entwicklungsverzögerung (HP:0001263).
Die Körpermaße des zweiten Zwillings liegen post partum im Normbereich: Gewicht 1680g (50. Perzentile), Länge 42cm (50. Perzentile), Kopfumfang 30cm (60. Perzentile). Der Apgar von 6/10/10 und ein pH von 7,30 zeigten eine gute fetale Oxygenierung und geben zunächst keinen Hinweis auf eine anhaltende Anpassungsstörung. Auch dieses Neugeborene erleidet zunächst rezidivierende Bradykardien und Apnoen und wird per Sonde ernährt. Das Neugeborenenhörscreening

weist auf eine Hörstörung hin. Wie bei seinem Zwillingsbruder ergibt die ophthalmologische Untersuchung eine Papillenexkavation. Eine Chromosomenanalyse ist unauffällig. Nach sechs Monaten wächst der Junge regelrecht, das Gewicht von 6200g entspricht der 60. Perzentile, die Länge von 60cm der 10. Perzentile, der Kopfumfang von 42cm liegt zwischen der 25.-50. Perzentile. Es wird eine Entwicklungsverzögerung festgestellt (HP:0001263): Wie bei seinem Zwillingsbruder gelingt ihm keine Kontrolle des Kopfes (HP:0002421) oder Augenfixation; der Muskeltonus (HP:0001290) ist vermindert. Eine Klinodaktylie fällt an der V. Zehe (HP:0001864) beidseits auf. Weitere Dysmorphiezeichen entsprechen jenen des Bruders: Hypertelorismus (HP:0000316), nach laterale ansteigende Lidachsen (HP:0000492) und eine breite Nasenwurzel (HP:0000445).

Familie G017

Die in Berlin lebenden libanesischen Eltern der Familie G017 sind Cousins ersten Grades. Alle drei Kinder der Familie sind von Intelligenzminderung (HP:0001249) und Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) betroffen.

Abbildung 2.6: Stammbaum der Familie G017



Der älteste Sohn der Familie wird 1997 geboren. Nach auffälliger Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) im Kleinkindalter wird er in eine Klasse für Sprachbehinderte mit Sonderförderung eingeschult. Die vorliegenden Untersuchungsbefunde stammen von der ersten ausführlichen Untersuchung aus dem Diagnose- und Behandlungszentrum für Entwicklung und Neurologie des Kindes- und Jugendalters (DBZ) des Klinikums Neukölln, wo der Junge im Alter von acht Jahren und acht Monaten von seinen Eltern vorgestellt wird. Länge, Gewicht und Kopfumfang liegen zu diesem Zeitpunkt im Normbereich. Bei der Untersuchung fallen verschiedene Dysmorphie-Zeichen auf: Vierfingerfurche beidseits (HP:0000954), plumpe Endphalangen (HP:0009880) sowie zwei Café-au-lait-Flecken (HP:0000957) an den Unterschenkeln. Bei der psychomotorischen Untersuchung sind Koordination und Balance nicht altersgerecht (HP:0002370), auch Kraft und Muskeltonus (HP:0001254) sind auffallend vermindert. Orientierung, Ausdauer, Belastbarkeit und Konzentrationsfähigkeit sind im Vergleich zur Altersgruppe im Intelligenztest vermindert. Verwendet wurde hier der Individualtest zur Messung von Intelligenz und Fertigkeit bei Kindern (Kaufman Assessment Battery for Children), welcher eine mittelgradige Intelligenzminderung (HP:0002342) zeigt. Der Patient zeigt kaum Sprachkompetenz (HP:0000750), spricht undeutlich mit vermindertem Wortschatz und hat kaum verbales Aufgabenverständnis. Das Sozialverhalten ist unauffällig, jedoch ist er nicht in der Lage nonverbale Kommunikation wie verschiedene Gesichts-

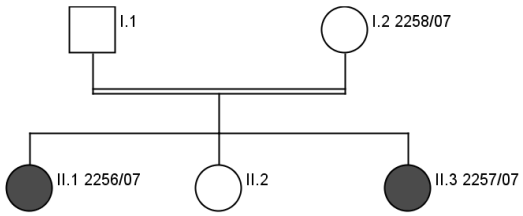
ausdrücke oder Gesten angemessen zu interpretieren und darauf zu reagieren (HP:0000758). Ein Wach-Schlaf-EEG ergibt einen Normalbefund. Eine Hals-Nasen-Ohrenärztliche Untersuchung erweist eine normale Hörfähigkeit. Die augenärztliche Untersuchung bestätigt eine Hyperopie mit Astigmatismus (HP:0000484) beidseits. Bei leicht erhöhter Kreatin-Kinase im Serum wurde eine Untersuchung auf häufige Stoffwechselerkrankungen veranlasst, welche jedoch, wie auch eine Chromosomenanalyse, unauffällig ausfällt. Abschließend wird den Eltern eine Umschulung in eine Förderschule für geistig Behinderte angeraten.
Die erste Tochter der Familie wird im Jahr 1999 nach unauffälliger Schwangerschaft verfrüht in der 37. SSW geboren, Apgar 9/10/10, Nabelschnur-pH 7,19. Bereits bei Geburt fallen Hautveränderungen am ganzen Körper auf. Das Mädchen leidet unter Ablösung von Hautarealen bei geringen Traumen, welche nach intensiver Hautpflege mit Hautatrophie, Hyper- und Hypopigmentation abheilen. Klinisch wird eine Epidermolysis bullosa junctionalis, Typ Non-Herlitz, diagnostiziert, welche in der genetischen Untersuchung durch eine homozygote Mutation (3098-3099insC) in Exon 45 im Kollagen XVII Gen (*COL17A1*) gesichert wird. Die genetische Analyse beider Eltern ergibt für beide einen heterozygoten Trägerstatus für das veränderte Allel. Mit zunehmendem Alter zeigen sich bei der Patientin Zahnschmelzdefekte fast aller Zähne (HP:0000682) sowie das vollständige Fehlen der Fuß- und Fingernägel von Digitus IV und V rechts (HP:0001802, HP:0001817). Massive Candida-Infektionen der Mundschleimhaut müssen wiederholt mit systemischen Fungiziden behandelt werden. Bis zum Alter von drei Jahren wird bei kinderärztlichen Vorstellungen auf Grund der Hauterkrankung eine altersgerechte Entwicklung festgestellt, wobei das Mädchen jedoch erst im Alter von drei Jahren mit dem Sprechen beginnt (HP:0002472). Eine logopädische Therapie wird daraufhin begonnen. Erste Laufversuche erfolgen im Alter von 30 Monaten (HP:0002194). Im Alter von fünf Jahren und neun Monaten wird schließlich eine weitergehende Untersuchung auf Grund von Entwicklungsverzögerung veranlasst. In der körperlichen Untersuchung zeigt sich ein normal gewachsenes Kind. Morphologisch auffällig ist eine Vierfingerfurche an der linken Hand (HP:0000954). Die Prüfung der groben Kraft gelingt nicht. Das allgemeine Sprachverständnis erscheint vermindert (HP:0010863). Bei der feinmotorischen Untersuchung fällt eine Dysdiadochokinese (HP:0002075) auf. In der Bewertung durch Eltern und Erzieher wird die sozio-emotionale Kompetenz des Mädchens als gering einschätzt. Eine audiologische Untersuchung ergibt ein normales Hörvermögen. Im Alter von sechs Jahren und fünf Monaten erscheint das Mädchen neben seiner sprachlichen, grob- und feinmotorischen Entwicklungsverzögerung und mittelgradigen Intelligenzminderung (HP:0002342) auch an einer emotionalen Störung mit Ängstlichkeit (HP:0100852) zu leiden. Die Einschulung wird zunächst zurückgestellt.
Eine weitere Tochter wird nach unkomplizierter Schwangerschaft 2001 vaginal-operativ mittels Forceps geboren. Die Körpermaße liegen im Normbereich. Die Apgar-Werte von 8/9/10 zeigen ein vitales Neugeborenes, der azidotische pH von 7,07 weist auf eine mäßige Sauerstoffmangelversorgung sub partu hin. Im Alter von 14 Monaten beginnt das Mädchen zu laufen, die ersten Worte spricht es mit 24 Monaten. In der U4 (Untersuchung im dritten bis vierten Lebensmonat) und U5 (sechster bis siebter Lebensmonat) wird eine zerebrale und zentrale Koordinati-

onsstörung festgestellt (HP:0002370). Im Kindergarten wird bis auf einen verzögerten Spracherwerb (HP:0000750) die Entwicklung des Kindes als unauffällig eingeordnet. Bei einer audiologischen Untersuchung wird ein normales Hörvermögen nachgewiesen. Bei der U8 (46. bis 48. Lebensmonat) wird auf Grund einer allgemeinen Entwicklungs-, Feinmotorik- und Sprachverzögerung (HP:0001263, HP:0010862, HP:0000750) die weitergehende neuropädiatrische Untersuchung im DBZ empfohlen: Dort wird im Alter von sieben Jahren und vier Monaten die Kaufmann-Assessment-Battery for Children angewandt, welches unterdurchschnittliche Werte im Sinne einer leichtgradigen Intelligenzminderung (HP:0001256) ergibt. Sprachlich zeigt sich bei dem Mädchen ein verminderter Wortschatz (HP:0002472), fehlerhafte Grammatik (HP:0006977) sowie multiple Dyslalie (HP:0009088). Grob- wie feinmotorische Fähigkeiten werden als nicht altersgemäß eingeschätzt (HP:0002194, HP:0007010), eine Dysdiadochokinese (HP:0002075) weist auf eine Einbeziehung des Kleinhirns hin. Ein Wach-EEG wie auch ein Schlaf-EEG zeigen auffällige Hirnstrommuster (HP:0003253).

Familie G026

Die Familie G026 stammt aus Berlin. Die Eltern sind Cousins ersten Grades. Von den drei Kindern der Familie sind zwei von schwerer Intelligenzminderung (HP:0002187), kongenitalem Katarakt (HP:0000519) und verzögerter neuronalen Myeliniserung (HP:0002188) betroffen. Weitere Befunde liegen nicht vor.

Abbildung 2.7: Stammbaum der Familie G026



Familie G030

Die türkischstämmigen Eltern sind Cousins ersten Grades. Von den drei Kindern sind der Sohn und eine Tochter von schwerer Intelligenzminderung (HP:0002187), Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) und Mikrozephalie (HP:0000252) betroffen.
Das erstgeborene Mädchen wird 1995 in der 35. SSW mit einem Geburtsgewicht von 1800g, einer Länge von 42cm und einem Kopfumfang von 30cm geboren. Zu den Ursachen für die Frühgeburtlichkeit werden keine Angaben gemacht. Der pH in der Nabelschnurarterie liegt im physiologischen Bereich bei 7,25; es wird ein Apgar von 7/10/10 vergeben, einem vitalen Neugeborenen entsprechend. Das Neugeborene muss jedoch beatmet werden und kann erst nach fünf Wochen aus dem Krankenhaus entlassen werden. Mit wenigen Monaten erhält das Mädchen Krankengymnastik und später Ergotherapie. Mit sieben bis acht Monaten kann die Patientin sitzen, mit

Abbildung 2.8: Patientin 2658/09

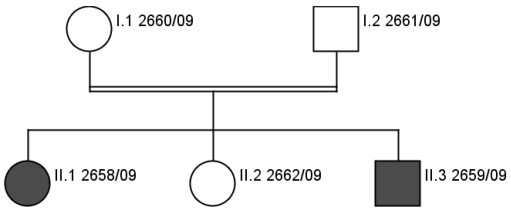
(a) Klinodaktylie (b) Brachydaktylie

18 Monaten frei laufen. Ihre ersten Worte spricht sie im Alter von drei Jahren (HP:0002472) und wird dann auf Grund von Intelligenzminderung (HP:0001249) und Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) in eine Förderschule eingeschult. Mit etwa zehn Jahren fällt den Eltern starkes Schwitzen (HP:0000957) und ein unangenehmer Körper- und Mundgeruch auf. Eine augenärztliche Untersuchung zeigt einen Astigmatismus (HP:0000483).

Im Alter von elf Jahren liegen Kopfumfang (49,7cm) und Körpergröße (130cm) der Patientin unter der dritten Perzentile (HP:0000252, HP:0003510). Das Körpergewicht liegt mit 29kg leicht darüber. Die Patientin hat ein schmales Gesicht mit einer breiten und flachen Nase (HP:0000445) mit fleischigen Nasenflügeln, ein kurzes Philtrum (HP:0000322), lange Handflächen (HP:0011302) und Finger (HP:0100807) sowie eine Brachydaktylie der Finger und Zehen (HP:0001156) und eine Klinodaktylie der fünften Finger beider Hände (HP:0004209).
Die nächste Tochter der Familie, geboren 1997, ist gesund.
Der jüngste Sohn der Familie zeigt ebenfalls Symptome von Entwicklungsverzögerung (HP:0001-263) und Intelligenzminderung (HP:0001249). Der Junge wird 2002 geboren, Gewicht, Länge und Kopfumfang liegen im Normbereich. Der Nabelschnur-pH von 7,34 und die Apgar-Werte von 9/10/10 zeigen ein lebensfrisches Neugeborenes. Der Junge trinkt schlecht (HP:0002033) und muss zeitweise per Nasensonde ernährt werden. Durch eine zerebrale MRT, die wegen Entwicklungsverzögerung veranlasst wird, kann eine verzögerte Myelinisierung (HP:0002188) festgestellt werden. In einer kardiologischen Untersuchung auf Grund eines systolischen Herzgeräusches wird ein Vorhofseptumdefekt vom Sekundumtyp (HP:0001684) sowie eine Reizleitungsstörung im Sinne eines inkompletten Rechtsschenkelblocks (HP:0011712) diagnostiziert. Kurz nach der Geburt wird mit Krankengymnastik begonnen. Sitzen kann der Patient mit etwa sechs Monaten, laufen mit ein bis eineinhalb Jahren. In seinem Sozialverhalten fällt ein nicht altersgemäßes Spiel- und Kontaktverhalten auf (HP:0012433). Im Alter von zwei Jahren und acht Monaten zeigt der Junge eine ataktische Bewegungsstörung mit Fallneigung und Unsicherheit beim Laufen und Treppen-

steigen (HP:0002066). Der Muskeltonus ist leicht reduziert (HP:0001252), Muskeleigenreflexe sind jedoch ungestört. Im Alter von vier Jahren spricht der Junge nur Einzelworte (HP:0002472) und erhält logopädische Therapie. Auf Grund seiner verzögerten Sprachentwicklung wird eine Hörstörung ausgeschlossen. Bei der augenärztlichen Untersuchung fällt ein deutlicher Strabismus (HP:0000486) auf. Im Alter von vier Jahren weist er eine Mikrozephalie auf, der Kopfumfang liegt mit 48,7cm unterhalb der 3. Perzentile (HP:0000252). Auch fällt sein Körperwachstum im Vergleich zu seinen Altersgenossen zurück und liegt mit 1,18m unter der 10. Perzentile, das Gewicht liegt mit 13,3kg unter der 3. Perzentile (HP:0004325). Im Gesicht zeigt der Junge diskrete Dysmorphie-Zeichen: Er hat eine ausgeprägte Mikroretrognathie (HP:0000308), seine Ohrmuscheln sitzen tief und sind groß und fleischig (HP:0000360). Eine breite und im Profil flache Nase mit fleischigen Nasenflügeln fallen auf (HP:0000445), ebenso wie lange schmale Hände (HP:0011302) mit Klinodaktylie des fünften Fingers (HP:0004209) und weit proximal ansetzendem Daumen (HP:0009618), ähnlich den Befunden seiner älteren Schwester. Der Patient hat ein Hämangiom (HP:0001048) an der rechten Thoraxseite und insgesamt wenig Unterhautfettgewebe (HP:0001002) und Muskulatur. Eine Chromosomenanalyse beider Geschwister ist unauffällig. Im Array-CGH (engl. Array Comparative Genomic Hybridization), einer Methode zum Nachweis von Kopienzahlveränderungen der DNA, wird bei beiden Kindern eine heterozygote Duplikation eines kurzen Abschnitts des dritten Chromosoms gefunden. Diese Veränderung ist ebenso beim gesunden Vater der Kinder, nicht jedoch bei der Mutter nachweisbar, sodass dieser Befund nicht als Ursache für die Symptomatik der Kinder angesehen wird .

Abbildung 2.9: Stammbaum der Familie G030



2.1.2 Kranioektodermale Dysplasie

Die neun Patientinnen und Patienten für die Untersuchung der Kranioektodermalen Dysplasie wurden über die Autoren der wissenschaftlichen Veröffentlichungen oder über Fallvorstellungen auf wissenschaftlichen Kongressen für diese Arbeit gewonnen. Das Einverständnis und die Genproben vieler Patienten lagen zu Beginn meiner Arbeit bereits vor, da in dieser Arbeitsgruppe zuvor Joanna Walczak-Sztulpa an diesem Thema geforscht und dazu publiziert hatte [60]. Einige in jüngster Vergangenheit beschriebene Erkrankte wurden über die jeweiligen Autoren kontaktiert und konnten so für diese Studie gewonnen werden. Zu den beiden Patientinnen, bei denen eine pathologische Veränderung identifiziert wurde, ist eine Publikation erschienen (Hoffer et al., 2013) [63].

In der Einleitung zu dieser Arbeit, Kapitel 1.2.2, wurden die bisherig bekannten Gendefekte der Kranioektodermalen Dysplasie beschrieben. Die weitere Untersuchung der genetische Hintergründe wurde in dieser Arbeit unter der Annahme durchgeführt, dass eine Dysfunktion im Proteinkomplex IFT-A für die Erkrankung verantwortlich ist. Bislang wurden in den Genen *IFT122*, *WDR35*, *WDR19* und *IFT43* Veränderungen bei Patienten mit CED gefunden. Das Makromolekül IFT-A besteht noch aus drei weiteren Proteinen der Gene *IFT140*, *TTC21B*. In dieser Arbeit wurden *IFT43* und *WDR35* bei den folgenden neun Patienten auf pathologische Veränderungen untersucht. Entsprechende Analysen von *IFT140* und *TTC21B* wurde begonnen, jedoch aus zeitlichen Gründen nicht zu Ende geführt und bleiben offen für weitere Untersuchungen. Für die molekulargenetische Untersuchung der beiden Gene wurden Exons und angrenzende Intronbereiche von *IFT43* und *WDR35* bei den Patienten zunächst per PCR vervielfältigt und dann durch die Sequenzierung nach Sanger auf Einzelbasenveränderungen untersucht.

Patientin 2191

Auf dem jährlichen Treffen der European Society of Human Genetics (ESHG) wurde 2006 der Fall einer griechischen Patientin mit Sensenbrenner-Syndrom vorgestellt. Über die Referentin konnte der Kontakt zu den Eltern hergestellt und die Familie für eine genetische Untersuchung gewonnen werden. Eine Untersuchung auf Veränderungen in *IFT122* zeigte einen unauffälligen Befund.
Das Mädchen wurde im Jahr 1999 als Tochter zweier griechischer Eheleute in der 38. Schwangerschaftswoche geboren. Die Eltern sind nach ihrem Wissen nicht verwandt und stammen beide aus demselben Dorf auf Kreta. Bereits während der Schwangerschaft fiel eine intrauterine Wachstumsretardierung (engl. Intrauterine Growth Retardation, IUGR; HP:0001511) und eine geringe Fruchtwassermenge (Oligohydramnion; HP:0001563) auf. Nach der Geburt wurde das Kind wegen Dysmorphie-Zeichen und progredientem Nierenversagen (HP:0003774) bei Diabetes insipidus (HP:0000873) und renaler Dysplasie (HP:0000110) zur genetischen Untersuchung überwiesen. Eine Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) und ein Wachstum unterhalb der 3. Perzentile (HP:0001510) wurden neben den folgenden Symptomen festgestellt: kurze Knochen der unteren wie oberen Extremität (HP:0008905), Ptosis (HP:0007911), Mikrognathie (HP:0000347), tiefer Ohransatz (HP:0000369), feines, dünnes Haar (HP:0008070), Brachydaktylie (HP:0001156), kutane Syndaktylie der Finger (HP:0010554) sowie der zweiten und dritten Zehen (HP:0005709) und dysplastische Nägel (HP:0002164).

Bei der röntgenologischen Untersuchung des Kopfes zeigte sich eine Kraniosynostose der rechten Koronarnaht (HP:0004440). Die Untersuchung des Thorax ergab kurze Rippen (HP:0000773) und eine engen Thorax (HP:0000774). Des Weiteren bestätigten sich radiologisch die klinisch diagnostizierten Knochenanomalien: gebogene Femora (HP:0002980), kurze Ulnae (HP:0003022) und Tibiae (HP:0005736), Brachydaktylie (HP:0001156), kurze Metatarsalia (HP:0010743) und ein dreigliedriger Hallux (HP:0010066); das Gesamtbild im Sinne einer akromesomelischen Dysplasie (HP:0003086) mit Kraniosynostose. In der abdominalen Sonographie zeigten sich kleine dysplastische Nieren (HP:0000110). Eine kraniale Computertomographie (CT) ergab eine vergö-

Abbildung 2.10: Patientin 2191

ßerte Cisterna magna (HP:0002280) und kortikale Atrophien (HP:0002120). Die detaillierte Auflistung der Merkmale sind der Tabelle 4.1 in Kapitel 4.3 zu entnehmen.
Eine Karyotypisierung ergab einen normalen Karyotyp 46, XX. Das Vorliegen eines Kraniosynostose-Syndroms wurde nach der Genanalyse der bekannten Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR), *FGFR1-4*, ausgeschlossen. Wie die zusammenfassende Arbeit von Ciurea und Toader beschreibt, sind Veränderungen in *FGFR*-Genen neben Mutationen in zwei weiteren Genen (*TWIST* und *MSX2*) als genetische Ursache der Kraniosynostose-Syndrome anzusehen [83].

Patient 2238

Patient 2238 wurde 1999 in Italien als erster Sohn eines nicht verwandten Paares nach unauffälliger Schwangerschaft geboren. Die Eltern entstammen demselben kleinen Dorf in Italien. Über diesen Fall berichteten Zaffanello et al. im Jahr 2006 [58]. Kurz nach der Geburt wurde auf Grund der auffälligen Befunde die Verdachtsdiagnose der Kranioektodermalen Dysplasie gestellt: Dolichozephalie (HP:0000268), Rhizomelie (HP:0008905), Brachydaktylie (HP:0001156), Epikanthus (HP:0000286), enger Thorax (HP:0000774), Hypodontie (HP:0000668), Mikrodontie (HP:0000691) und Wachstumsverzögerung (HP:0001510). Das verminderte Wachstum des Jungen wurde zeitweilig mit der Gabe von Wachstumshormonen behandelt, jedoch nach ausbleibendem Erfolg wieder eingestellt. Der Junge litt außerdem an einer Tracheomalazie (HP:0002779), die im vierten Lebensjahr zur operativen Anlage eines Tracheostomas führte. Eine beeinträchtigte Nierenfunktion wurde im Alter von zwei Jahren festgestellt. Die Blutanalyse zeigte eine Hypokalzämie (HP:0002901) und Hyperphosphatämie (HP:0002905). Im Urin fand sich eine Proteinurie (HP:0000093). Die abdominale Sonographie wies auf hyperechogene Strukturen in den Nieren und multiple zystische Strukturen in der Leber hin (HP:0001407). Die histopathologische Untersuchung eines Leberbioptats belegte eine kongenitale Leberfibrose (HP:0001395). Nach kurzfristiger Peritonealdialyse erhielt der Patient eine kombinierte Leber- und Nierentransplantation. Die kognitive und psychomotorische Entwicklung des Patienten war unauffällig. Bei diesem Patienten wurde in der genetischen Analyse durch Walczak-Sztulpa et al., 2010, ein compound-heterozygoter Genotyp im Gen *IFT122* entdeckt: eine maternal vererbte splicesite-Mutation in

Intron 6 (c.502+5G>A) und eine de novo-missense-Mutation in Exon 1 (p.W7C), welche nicht im paternalen Genom gefunden wurde [60]. Der Patient wurde in diese Arbeit eingeschlossen um eine weitere Mutation in den beiden häufigsten krankheitsverursachenden Genen der CED auszuschließen.

Patientin 2561

Die Eltern der Patientin 2561 nahmen von sich aus Kontakt mit der Abteilung von Prof. Ropers im Max-Planck-Institut auf, um die genetischen Ursachen der Erkrankung ihrer Tochter zu klären. Eine Untersuchung auf Veränderungen in *IFT122* zeigte einen unauffälligen Befund.
Die Familie stammt aus den Vereinigten Staaten von Amerika; die Eltern sind nicht verwandt. Das Mädchen wurde 2005 nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf in der 39. SSW als drittes Kind ihrer Eltern geboren. Beide Geschwister sind gesund. Nach der Geburt fielen kurze Gliedmaße (HP:0008905), Brachydaktylie (HP:0001156) und eine Dolichozephalie (HP:0000268) auf. Die frühe Verknöcherung der Sutura sagitalis (HP:0004442) wurde mit einer minimal-invasiven Kraniektomie behandelt. Im Alter von vier Jahren litt die Patientin an bilateralem Nystagmus (HP:0000639). Weiterhin wurde ein spärlich-dünnes Haarwachstum (HP:0008070), Mikrognathie (HP:0000347), weit auseinanderstehende kleine Zähne (HP:0000691), eine vorgewölbte Stirnpartie (engl. frontal bossing; HP:0002007) und ein tiefer Ohransatz (HP:0000369) beschrieben.

Abbildung 2.11: Patientin 2561

Eine Fundoplicatio nach Nissen und die Anlage einer Magensonde wurden wegen Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme im Alter von 14 Monaten durchgeführt. Die Einschränkung der Nierenfunktion mit erhöhten Kreatininwerten fiel zu diesem Zeitpunkt erstmalig auf und verschlechterte sich rasch, sodass im Alter von 20 Monaten mit einer Peritonealdialyse begonnen wurde (HP:0003774). Mit fünf Jahren erhielt die Patientin eine Nierentransplantation. Zuvor hatte eine abdominalsonografische Untersuchung Zysten in der Leber (HP:0001407) ergeben. Die psychomotorische Entwicklung des Mädchens war verzögert (HP:0001263), die ersten Gehversuche

unternahm sie im Alter von drei Jahren, im Alter von fünf Jahren war sie noch nicht fähig zu sprechen. Die chromosomale Analyse zeigte einen normalen Karyotyp 46, XX.

Patientin 2792

Patientin 2792 wurde 1994 als erste Tochter zweier anamnestisch nicht verwandter portugiesischer Eltern geboren, die aus dem gleichen Dorf im Norden des Landes stammen. Die Entbindung fand per Kaiserschnitt in der 40. SSW wegen grünen Fruchtwassers statt, Geburtsgewicht 3982g, Größe 49,5cm, Kopfumfang 38cm, Apgar der Minuten 5 und 10: 7 und 10. Das Mädchen wurde wegen muskulärer Hypotonie (HP:0001319), Dysmorphiezeichen und persistierendem Foramen ovale (HP:0001655) auf die neonatale Intensivstation verlegt. Das offene Foramen ovale verschloss sich spontan. Als dysmorphe Zeichen fanden sich Dolichozephalie (HP:0000268), vorgewölbte Stirn (HP:0002007), Makrozephalie (HP:0004488), tiefer Ohransatz (HP:0000369), Telekanthus (HP:0000506), Epikanthus (HP:0000286), Hypertelorismus (HP:0000316), breite, flache Nasenwurzel (HP:0000431), hypoplastische Nasenflügel (HP:0000430), kurzes Philtrum (HP:0000332), Mikroretrognathie (HP:0000308), kleine, weit auseinanderstehende Zähne (HP:0000691), kurzer Nacken (HP:0000470), Brachydaktylie (HP:0001156) und Rhizomelie (HP:0008905). Zudem fiel eine erhöhte Dehnbarkeit der Haut und Gelenke auf (HP:0000973). Die Sonographie der Nieren zeigte keinen auffälligen Befund. Im Alter von sechs bis sieben Monaten wurde eine Kopfumfangszunahme durch eine subdurale Blutansammlung festgestellt und zunächst überwacht. Eine Röntgenaufnahme des Skeletts im Alter von 19 Monaten zeigte mehrere Auffälligkeiten: Das Fehlen der 12. Rippe (HP:0000878), raue Struktur der Phalangen (HP:0005920), Brachydaktylie (HP:0001156) sowie eine verminderte Knochendichte (HP:0000938). Bei der ophthalmologischen Untersuchung wurde eine hochgradige beidseitige Myopie diagnostiziert (HP:0011003). Eine rechtsseitige Inguinalhernie (HP:000023) wurde im Alter von drei Jahren operativ korrigiert. Die Urinbefunde waren stets normal; es wurde im Alter von drei Jahren eine erhöhte Echogenität der Nieren konstatiert, die sich schließlich auch klinisch als chronische Nephropathie (HP:0003774) und arterielle Hypertonie (HP:0000822) äußerte. Im Alter von fünf Jahren wurde zudem eine Hepatomegalie (HP:0002240) festgestellt. 2008 wurde schließlich die Diagnose einer polyzystische Nieren- und Lebererkrankung (HP:0000113; HP:0006557) gestellt. Die psychomotorische Entwicklung war zeitgerecht und unauffällig.

Patientin 2875

Der Kontakt zu der Familie wurde über den betreuenden Kinderarzt hergestellt. Patientin 2875 wurde nach unauffälliger Schwangerschaft in der 40. SSW als Tochter zweier nicht verwandter Eltern in der Türkei geboren. Im vierten Schwangerschaftsmonat wurde eine Amniozentese wegen sonographisch auffälliger Nackentransparenz-Messung durchgeführt, welche einen normalen Karyotyp 46, XX, ergab. Geburtsgewicht, -größe, und -kopfumfang lagen unterhalb der 3. Perzentile. Kurze Extremitätenknochen (HP:0008905) und eine Brachydaktylie (HP:0001156) fielen

bereits bei Geburt auf. Im Verlauf wurden weitere dysmorphe Merkmale identifiziert: Dolichozephalie (HP:0000268), kurzer Nacken (HP:0000470), breite Nasenwurzel (HP:0000431), vorgewölbte Stirn (HP:0002007), feines, dünnes Haar (HP:0008070), enger Thorax (HP:0000774), Mikrognathie (HP:0000347), weit auseinanderstehende und kleine Zähne (HP:0000691), tief ansetzende Ohren (HP:0000369) und ein hoher Gaumen (HP:0000218). Im vierten Lebensmonat folgten weitere Untersuchungen: Die ophthalmologische Untersuchung ergab einen Normalbefund. Bei einer Echokardiographie wurde ein kleiner atrialer Septumdefekt (HP:0001631) festgestellt. In der Blutuntersuchung zeigten sich erhöhte Kreatinin- und Harnsäure-Werte, woraufhin eine sonographische Untersuchung der Nieren eine erhöhte Echogenität und bilaterale Hydronephrose (HP:0000126) ergab. Nach der Diagnose eines chronischen Nierenversagens (HP:0003774) wurde die Patientin mittels Peritonealdialyse behandelt. Im Alter von 18 Monaten trat eine arterielle Hypertonie (HP:0000822) auf. Eine linksventrikuläre Hypertrophie (HP:0001712) wurde bei einer erneuten Echokardiographie diagnostiziert. Der persistierende atriale Septumdefekt wurde operativ versorgt. Im Alter von 22 Monaten zeigte eine ophthalmologische Untersuchung eine bilaterale peripapilläre Hyperpigmentation und Ausdünnung der Gefäße bei fehlendem Reflex der Fovea centralis der Retina. Zwei Monate später erblindete das Mädchen auf Grund einer Retinitis pigmentosa (HP:0000510) und hypertensiven Retinopathie (HP:0001095).

Patient 3059

Der Junge wurde 2001 als Sohn eines nicht verwandten Paares in den Niederlanden geboren. Es fallen eine Dolichozephalie (HP:0000268) und charakteristische Gesichtszüge auf: prominente Stirn (HP:0002007), wenig feines Haar (HP:0008070), weit auseinander stehende Zähne (HP:0000691). Weitere Merkmale sind Rhizomelie (HP:0008905), Brachydaktylie (HP:0001156), enger Thorax (HP:0000774) und eine progrediente Niereninsuffizienz (HP:0003774). Eine Störung der Leberfunktion oder Anomalien der Augen wurden nicht berichtet. Die Publikation des Falls und die genetische Untersuchung auf eine Mutation im Gen *IFT122* wurde bereits früher durchgeführt und ergab keinen pathologischen Befund [60].

Patient 3062

Der Junge wurde 1996 in Kanada als viertes Kind eines blutsverwandten deutsch-stämmigen Ehepaares, Cousin und Cousine zweiten Grades, geboren. Seine drei älteren Geschwister, ein Junge und zwei Mädchen, sind gesund. Die Mutter hatte zuvor vier Kinder in der Frühschwangerschaft verloren. Auf Grund von Dysmorphie-Zeichen wurde der Junge zur humangenetischen Untersuchung überwiesen, hierüber entstand der Kontakt zur molekulargenetischen Untersuchung in unserer Abteilung. Zu den auffälligen Merkmalen des Jungen zählen sagitale Synostose (HP:0004442), Kleinwuchs (HP:0011405), Epikanthus (HP:0000286), Nagelfehlbildungen (HP:0002164) und dünnes, feines Haar (HP:0008070). Zudem litt der Junge an epileptischen Anfällen (HP:0001250) und

wies eine kognitive Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) auf. Eine Mutation in *IFT122* wurde bereits ausgeschlossen.

Patientin 3063

Der Kontakt zu der Familie der Patientin wurde über den betreuenden Humangenetiker hergestellt, der von diesem Fall auf einer Konferenz berichtete. Das Mädchen wurde als zweites Kind eines blutsverwandten Paares, Cousins ersten Grades, in Ägypten geboren. Ihre drei Geschwister, zwei Brüder und eine Schwester, sind gesund. Das Mädchen zeigt eine Dolichozephalie (HP:0000268), feines dünnes Haar (HP:0008070), tief sitzende Ohren (HP:0000369), Mikrodontie (HP:0000691) und Brachydaktylie (HP:0001156). Eine ophthalmologische Untersuchung ergab keine Auffälligkeiten. In der CT zeigten sich periventrikulär hypodense Areale und eine kortikale Atrophie (HP:0002120). Elektrokardiographie, Audiometrie, IQ-Test und eine abdominale Sonographie von inneren Organen, einschließlich der Nieren, ergaben unauffällige Befunde. Auch die Blutuntersuchung des Nierenstoffwechsels (Kreatinin, Harnstoff, Calcium und Phosphat) waren im Normbereich. Zusätzlich zu den genannten Befunden fiel in der röntgenologischen Untersuchung eine dem Alter nicht entsprechende frühe Alterung der Knochenstruktur (HP:0005616) auf. Es erfolgte bereits eine Untersuchung auf eine Mutation in *IFT122* ohne Resultat.

Patient 3065

In dieser Familie handelt es sich um ein erkranktes Geschwisterpaar nicht verwandter britischer Eltern, wobei die ältere Schwester im Alter von fünf Jahren verstarb, siehe Veröffentlichung von Savill et al., 1997 [53]. In die Untersuchung einbezogen wurde daher nur der jüngere Bruder. Der Patient wurde bereits auf eine Veränderung in *IFT122* untersucht, jedoch zeigten sich hierbei keine Auffälligkeiten [60]. Hier seien jedoch auch die Krankheitsmerkmale des Mädchens erwähnt:
Sie kam als zweites Kind des Paares nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf mit einem Geburtsgewicht von 2140g zur Welt (<3. Perzentile). Es fielen kurze Extremitätenknochen (HP:0008905), Dolichozephalie (HP:0000268), ein enger Thorax (HP:0000774), feines, spärliches Haar (HP:0008070), weit auseinanderstehende kleine Zähne (HP:0000691), Klinodaktylie des fünften Fingers (HP:0004209) und Hepatosplenomegalie (HP:0001433) auf. Röntgenologisch wurde eine sagitale Kraniosynostose (HP:0004442), eine generalisierte Osteopenie (HP:0000938) und metaphysäre Erweiterungen (HP:0000944) festgestellt. Rezidivierende pulmonale Infekte (HP:0006532) wurden mit Langzeitantibiose und inhalativen Steroiden therapiert. Das Mädchen litt an Nachtblindheit (HP:0000662) auf Grund einer retinalen Dysplasie (HP:0007973) und Myopie (HP:0000545). Im Alter von zwei Jahren traten erstmals generalisierte epileptische Anfälle (HP:0002197) auf. Im Alter von drei Jahren wurde ein erhöhter Kreatinin-Wert im Blut festgestellt, rasch entwickelte sich ein chronisches Nierenversagen (HP:0003774). Als die Patientin fünf Jahre alt war, wurde eine Nierenbiopsie durchgeführt, die die Diagnose einer tubulo-interstitiellen Nephropathie (HP:0001969) ergab. Die Patientin erhielt nach Hämodialyse die Leichenspende einer Niere,

jedoch zeigte sich ein primäres Transplantatversagen, woraufhin die Patientin wegen Nierenversagens (HP:0003774) ein Lungenödem mit Sekundärinfektion entwickelte. Vier Tage nach der Transplantation verstarb die Patientin trotz maximaler intensivmedizinischer Therapie. Der jüngere Bruder, Patient 3065, kam 1990 als drittes Kind der Familie zur Welt. Die Schwangerschaft war sonographisch engmaschiger als bei seiner Schwester überwacht worden. Bis zur 27. SSW zeigte sich ein normales Wachstum. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft fiel das Wachstum der Extremitätenknochen im Vergleich zum Kopfumfang immer weiter zurück. Bei der Geburt bestätigten sich diese Beobachtungen. Es zeigten sich auch hier kurze Extremitätenknochen (HP:0008905), Dolichozephalie (HP:0000268), Zahnanomalien (HP:0000164), feines, spärliches Haar (HP:0008070), ein enger Thorax (HP:0000774) und Brachydaktylie (HP:0001156). Radiologisch war jedoch bei diesem Patienten keine Kraniosynostose nachweisbar. Der Patient entwickelte wie seine Schwester rezidivierende respiratorische Infekte (HP:0006532) und auf Grund der retinalen Dysplasie (HP:0007973) eine Nachtblindheit (HP:0000662). Im Alter von drei Jahren zeigte er Zeichen von Niereninsuffizienz (HP:0003774) mit erhöhten Kreatininwerten.

2.2 Material

Es wurde die Standardausstattung eines molekulargenetischen Labors Geräte, Elektrophoresesysteme, Zentrifugen, PCR-Cycler und Einwegartikel betreffend, verwendet.

2.2.1 Chemikalien und Kits

Produkt	**Hersteller**
Aqua ad iniectabilia	Baxter
Natriumacetat	Merck
Betaine	Sigma
Big Dye	Applied Biosciences
Big Dye Terminator	Applied Biosciences
dNTPs	Roth
EDTA	Merck
Ethanol 100%	Merck
Ethanol 70%	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas
Oligonukleotide	Eurofins MWG Operon
UltraPure™Agarose	Invitrogen
SDS 2%	Bio-Rad

2.2.2 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Ethidiumbromid	in H2O gelöst
MagerMix	50 µl dNTP Mix
	5ml 10x PCR Puffer
	5ml 25mM MgCl2
	34.3ml H2O
	500 µl MPI-Taq 10 U/µl
	14µl MPI-Pfu-Taq 10 U/µl
TAE 50x Puffer	50mM EDTA
	5.71% Acetat
	2M Tris-HCl

2.2.3 Enzyme

Produkt	Hersteller
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen
Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase	Agilent Technologies

2.2.4 Primer

Primer zur Untersuchung der Intelligenzminderung

Familie	Primer	Sequenz	Produktlänge
G001	C12orf57_for	TCCAAACACATACGCAGCAG	643 bp
	C12orf57_rev	GGTAGGCGTCGGAGAACAG	
G002	HIST3H3_for	AGCTGGCCTCCTAACTGGAC	594 bp
	HIST3H3_rev	AAGTCAACGGGTGGCAAG	
	OBSCN_for	GTGGAAGGGCTCAACTCAGG	392 bp
	OBSCN_rev	TCACCTTGCACTAGGAGCTG	
G008	SURF1_for	CAGGGACTGTGCTCTCTGTG	836 bp
	SURF1_rev	GCCTTTTACCAACCACGAAG	
G015	C9orf86_for	AAGTGGTAAGGGCAGGTGTC	588 bp
	C9orf86_rev	GGAAAGTCATCCTGGAGCAG	
	CACNA1B_for	AGGATCCGAGCAAGGAGTG	407 bp
	CACNA1B_rev	GTGAACGGCATGCAGAGAC	
	INPP5E_for	CTCCTGCTCCAGGATGAGTC	383 bp
	INPP5E_rev	GAGAACAGCAGGGAGGTGAG	
G017	ATP13_for	GATGGGGTTTTGCCATGTAG	458 bp
	ATP13_rev	CACCTGTCTCCCACAGACG	
	ELP2_for	GTATCAGCAGGTGGCCTTTC	377 bp

Familie	Primer	Sequenz	Produktlänge
	ELP2_rev	TCATTCCTTATGAAGAGCCACTAAG	
G026	FAM126A_for	GTCTCCCAATCCCCAGAAAG	391 bp
	FAM126A_rev	TTCCATTCAAATACAGTCCAGTTC	
G030	LARP7_for	TTCCAGCCTTAAGAGTTGTGG	546 bp
	LARP7_rev	GGCTGTGAAATGGGTGAAAC	

Primer zur Untersuchung der Kranioektodermalen Dysplasie *WDR35*

Primer	Sequenz	Produktlänge
WDR35_Ex1_for	GAACCGTTACTTGTCGAGGG	159 bp
WDR35_Ex1_rev	GCTTCTCGGGAAGGCAG	
WDR35_Ex2_for	CAGCTTTCATCTCCTGCAGAC	256 bp
WDR35_Ex2_rev	CGCACTGAACAAATAACATTAGC	
WDR35_Ex3_for	AAATATATCAGAATGGGGCATACTTAG	364 bp
WDR35_Ex3_rev	AACTTACAATGGGTTTATTGGAAC	
WDR35_Ex4_for	TGTACAGGAACCATATTGATTTTAAC	259 bp
WDR35_Ex4_rev	ACTGTGATCCAGATGCCAAC	
WDR35_Ex5_for	TTTATGGAATGCTTTCAATTCTTAAC	274 bp
WDR35_Ex5_rev	TCTAAAGAAGAAAACTGTCAGCC	
WDR35_Ex6_for	GATTTCGAAAGCCGTTGTTG	312 bp
WDR35_Ex6_rev	AAGACTTTAATTACACAAACCGCC	
WDR35_Ex7a_for	TTGCCACCTGATTTTTAGACTG	292 bp
WDR35_Ex7a_rev	CCTTACTTTGGTCATTCTCATGTC	
WDR35_Ex7b_for	TTGTTTGGTGAATGTCACTGG	274 bp
WDR35_Ex7b_rev	AAGTTGCCGTGAGCCAAG	
WDR35_Ex8_for	TTGGGATTATAGGCGTGAGC	395 bp
WDR35_Ex8_rev	TGTGATAAGTTTACACCGTTTCC	
WDR35_Ex9_for	TCTCTGTGAAGTGATTGGTGG	300 bp
WDR35_Ex9_rev	GCTCCTAAAACAAGACAGCTTTG	
WDR35_Ex10_for	TTTGCCTTCCCAATACTAAATAATTC	321 bp
WDR35_Ex10_rev	GGTAGAAAACTATAACCCAAGCAG	
WDR35_Ex11_for	TTTGTATATAAGCCACTTTCATTAGG	212 bp
WDR35_Ex11_rev	GCTACAGTTTCTGATCAGCTATAACC	
WDR35_Ex12_for	TTGCACGTAACAGTTTCATCAG	336 bp
WDR35_Ex12_rev	GGATCTGACAAAGTAGGAAGTATGG	
WDR35_Ex13_for	ATGAGGGGTTGAACTCCGTG	300 bp
WDR35_Ex13_rev	TGTCTGACTTCAATGTGATATGG	

Primer	Sequenz	Produktlänge
WDR35_Ex14_for	TTTGGTACAGCTTTCAGGAAC	412 bp
WDR35_Ex14_rev	TTGCTAAAATAATATCCTATTCACTGG	
WDR35_Ex15_for	AGAAATATTGACTGCTTAGTGAATTG	241 bp
WDR35_Ex15_rev	TACAGACATGGGGCACACAC	
WDR35_Ex16_for	TTTGCTGTGACATCACTTTGG	332 bp
WDR35_Ex16_rev	TTCATAATAGACACGCCCATC	
WDR35_Ex17_for	CCATTTCTACTGTATTCCAGGTTTC	414 bp
WDR35_Ex17_rev	ACAAAGGGGAATCATCCAGG	
WDR35_Ex18_for	CAGCCAAGAAGTTAAAGGAAGC	402 bp
WDR35_Ex18_rev	CAATAAGAGAGCAGGGCTGG	
WDR35_Ex19_for	AAAAGAAACACATACTCTAACGGC	272 bp
WDR35_Ex19_rev	GAGCAGAGGGACAAAACTGAG	
WDR35_Ex20_for	TTGTGATTCAAGACTAGTTTGTCAG	380 bp
WDR35_Ex20_rev	AAAAGGAACCATATGATACACCTAAC	
WDR35_Ex21_for	ACACACAGCAGGCTCTTGG	287 bp
WDR35_Ex21_rev	TCCTAGAGAAGTACTCAGGCAGC	
WDR35_Ex22_for	TGATGAAGGAACATTTTGGTTG	359 bp
WDR35_Ex22_rev	AAAAGCATCATTCCATGTCTAAG	
WDR35_Ex23_for	ACCAGTAAATTTAATACTCATACGTCC	297 bp
WDR35_Ex23_rev	CACTAGGGTGACTTTAACCTTGC	
WDR35_Ex24_for	TCTTTCTTGCTTGAAGTTTTGTAAG	643 bp
WDR35_Ex24_rev	AAACATCTTTGTTGGTAAAAGGC	
WDR35_Ex25_for	TTCCAACTCCTAGGGCTAAATAC	493 bp
WDR35_Ex25_rev	TCATTTAAGGAAACAAATGCAGAC	
WDR35_Ex26_for	TGACACTGTGTGTGCGTTTG	289 bp
WDR35_Ex26_rev	GCAAATTGAAGAAGCTAGCCC	
WDR35_Ex27_for	TGCAAGTTCAATGAAATCACC	431 bp
WDR35_Ex27_rev	TGCTTTAATTCCTACATTAAACATTG	
WDR35_Ex28_for	TTGATGTTCATCTCAGAAGTTTTATTC	394 bp
WDR35_Ex28_rev	AAAATTCAACTATAAATAATGAGGCTG	

Primer kranioektodermale Dysplasie *IFT43* (ehemals *C14orf179*)

Primer	Sequenz	Produktlänge
C14orf179_Ex1_for	ATTTTACCGTCTCGCAGGAG	578 bp
C14orf179_Ex1_rev	ACTCGGGGCTCTAGAAAACG	
C14orf179_Ex2_for	TCTGGATCTCCTGACCTTGTG	397 bp

Primer	Sequenz	Produktlänge
C14orf179_Ex2_rev	AAGGACAAATGCCAAGGAAG	
C14orf179_Ex3_for	AGGCTAAGGCAGGAGAATCG	387 bp
C14orf179_Ex3_rev	TGCATTTTAAGTGGGTGAATTG	
C14orf179_Ex4_for	TTCTCTCATGCTGGTTGTGG	351 bp
C14orf179_Ex4_rev	CCAAACCTTGGATTCAGCAG	
C14orf179_Ex5_for	TCAGGGACATTTTCATCTAGGAG	249 bp
C14orf179_Ex5_rev	ATGCTGCAGCCAACAGTG	
C14orf179_Ex6_for	CATGGCTGGTGTGTTGAAG	284 bp
C14orf179_Ex6_rev	GGAGCCCAACACCAGAAAG	
C14orf179_Ex7_for	TTATTCCCATTCTGGTCATCC	291 bp
C14orf179_Ex7_rev	TGGAGGCGCTGTATAGCTTG	
C14orf179_Ex8_for	CATTTCTCAGTGGGCATGTG	396 bp
C14orf179_Ex8_rev	AGGGTTTCGCTGGGTAAGAC	
C14orf179_Ex9_for	GGATGGGAGGGAGAAGTCAG	489 bp
C14orf179_Ex9_rev	AATCGAACTCTCCCACATGC	

2.2.5 Software

Programm	Anbieter	Verwendung
CodonCode Aligner	CodonCode Corporation	Darstellung der Sequenzen
Pedigree Chart Designer	CeGaT	Zeichnen von Stammbäumen

2.2.6 Internetquellen

Die Verwendung von Informationsquellen des Internets spielt bei dieser Arbeit eine unverzichtbare Rolle. Folgende Datenbanken und Websiten wurden genutzt:

Titel	URL	Referenz
	Datenbanken	
dbSNP	ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP	[84]
GeneCards	genecards.org	[85]
HGMD	biobase-international.com	[86]
HGVS	hgvs.org	[87]
HomoloGene	ncbi.nlm.nih.gov/homologene	[84]
HPO	human-phenotype-ontology.org	[79]
HUGO	genenames.org	HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute

Titel	URL	Referenz
Mutalyzer	lovd.nl/mutalyzer	[88]
Phenomizer	compbio.charite.de/phenomizer	[81]
Pubmed	ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	[84]
UCSC Genome Browser	genome.ucsc.edu	[89]
OMIM	omim.org	McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD)
Prädiktion von Pathogenität		
MERAP	sourceforge.net/projects/merap	Publikation ausstehend
PolyPhen2	genetics.bwh.harvard.edu/pph2	[90]
PhyloP	compgen.bscb.cornell.edu/phast	[91]
SIFT	sift-dna.org	[92]
Online-Arbeitsmittel		
Primer3	frodo.wi.mit.edu/primer3	[93]

2.3 Methoden

Von den im Folgenden genannten Methoden wurde die Autozygotie-Kartierung, das Next Generation Sequencing, die Pathogenitätsanalyse sowie die Kapillarelektrophorese durch andere Beteiligte vorgenommen, welche in den jeweiligen Abschnitten erwähnt werden. Von mir selbst wurde die Prüfung der DNA-Konzentration, Verdünnung, Primerdesign, Polymerasekettenreaktion, Gelelektrophorese und Aufbereitung der Produkte für die Kapillarelektrophorese vorgenommen.

2.3.1 Autozygotie-Kartierung und Next Generation Sequencing

Wie eingangs erläutert, siehe Kapitel 1.3.1, ist die Methode der Wahl zur Identifikation von autosomal-rezessiv vererbten Krankheitsloci in konsanguinen Familien die Autozygotie-Kartierung [94]. In der Regel ist das Erreichen eines signifikanten LOD-Scores bei wenigen Betroffenen in einer kleinen Familie schwierig oder unmöglich; wenn jedoch die Vorfahren der Patienten miteinander verwandt sind, wird ein Nachweis einfacher, da signifikante LOD-Scores mit weniger untersuchten Personen erzielt werden können [95]. Die Diagnostik fußt auf der Annahme, dass die gesuchte Mutation und die flankierenden Bereiche als autozygot "identical by descent" gelten, also von einem gemeinsamen Vorfahren vererbt wurden. Als genetische Marker können Einzelnukleotid-Polymorphismen, SNPs, genutzt werden. Liegen SNPs bei den Betroffenen homozygot vor, ist davon auszugehen, dass die von ihnen eingeschlossenen Bereich ebenfalls homozygot sind und das ursächliche Krankheitsgen dort zu suchen ist. In der sogenannten Mehrpunkt-

Kopplungsanalyse werden mehrere Marker benutzt, deren Reihenfolge und relative Entfernung voneinander bereits bekannt ist. Es ist dann möglich die Wahrscheinlichkeit (Likelihood) für jede Position des Krankheitslocus in der Markerregion zu berechnen. Die Position mit der höchsten Likelihood ist die wahrscheinlichste und oberhalb einer Likelihood-Ratios von 1:1000 (entsprechend einem LOD-Score von +3) ist dieses Ergebnis statistisch signifikant. Es kann vorkommen, dass hierbei mehrere Kopplungsintervalle identifiziert werden, wobei dann die Betrachtung des LOD-Scores gemeinsam mit der Größe des autozygoten Areals zielführend ist. Die Autozygotie-Kartierung wurde bei allen Familien mit nicht-syndromaler Intelligenzminderung durchgeführt um autozygote Abschnitte bei den von Intelligenzminderung betroffenen Angehörigen zu identifizieren und diese dann durch Sequenzierung näher zu untersuchen. Die im Rahmen dieser Arbeit berichteten Kopplungsanalysen wurden von Dr. Masoud Garshasbi durchgeführt. Zur Marker-Genotypisierung wurde der SNP-Microarray Human 610-Quad BeadChip (Illumina) nach dem Protokoll des Herstellers verwandt. Die identifizierten autozygoten genomischen Regionen wurden im Anschluss an die Kopplungsanalyse bei einem erkrankten Individuum, dem Index-Patienten der Familie, mittels maßgeschneiderten Agilent SureSelect DNA capture arrays angereichert und mittels Illumina Genome Analyser II sequenziert. Alle in der Region liegenden Exons und 60 Basenpaare der angrenzenden Intronregionen wurden auf diese Weise sequenziert. Um die Ergebnisse der SNP-Genotypisierung zu überprüfen, wurden zudem die SNP-Genotypen mittels NGS bei fünf Familien bestimmt und verglichen. Es fand sich eine Übereinstimmung von 773 von 776 Markern. Dieses Ergebnis erlaubt den Rückschluss, dass die Ergebnisse der Autozygotie-Kartierung in hohem Maße zuverlässig sind. Details zu Methodik und Verfahren wurden bereits anderweitig veröffentlicht [31].

2.3.2 Selektion von Kandidatengenen

In dieser Arbeit wurden die autozygoten Bereiche bei einem Indexpatienten jeder Familie durch Next Generation Sequencing auf Mutationen und Veränderungen untersucht. Durch den Vergleich mit den Datenbanken Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) und Human Gene Mutation Data (HGMD) konnte überprüft werden, ob eine genetische Veränderung bereits als ursächlich für eine Erkrankung bekannt ist. Im nächsten Schritt wurden die gefundenen homozygoten Aberrationen mit dbSNP130/131 verglichen. Auch circa 100 Chromosomen aus der iranischen Population wurden mittels Sanger Sequenzierung auf die fragliche Mutation untersucht. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei einer monobasischen Veränderung um einen bekannten SNP oder um eine populationsspezifisch häufige Variante handelt.
Anschließend wurden Veränderungen auf ihre Auswirkung auf Protein-Ebene untersucht: Bewirkt die Veränderung eine Veränderung in der Aminosäuresequenz eines Proteins? Handelt es sich dabei um eine silent, nonsense- oder missense-Mutation? Führt eine Insertion oder Deletion zu einer Veränderung des Leserasters (engl. frameshift)? Häufig führt der Austausch einer einzelnen Base zu einer Änderung der Aminosäurensequenz. Eine erste Einschätzung, ob eine solche Veränderung als pathogen angesehen werden kann und welche Auswirkung sie auf das Protein haben könnte,

bieten Scores, die verschiedene Merkmale des Genes und der bezeichneten Mutation berücksichtigen. Sie charakterisieren die Bedeutung einer solchen Mutation durch einen quantitativen Wert. Mehrere Prädiktionsprogramme wurden durch Dr. Hao Hu zur Bewertung der Mutation genutzt: Polyphen, phyloP, SIFT, und MERAP-Logit.
Der pyhloP-Score ("phylogenetic P-values") bewertet die evolutionäre Konservierung der Aminosäure in den orthologen Genprodukten bei verschiedenen Lebewesen. Dahinter steht die Annahme, dass eine hochgradige Konservierung, also evolutionäre Beständigkeit, Ausdruck der Bedeutung einer Aminosäure für die Proteinfunktion ist [91]. Der PolyPhen-Score bewertet die Position der Aminosäure im Protein und ihre Bedeutung für die dreidimensionale Molekülstruktur und -funktion. SIFT (SIFT = Sorting Intolerant From Tolerant) ist ein Programm, welches eine Aussage darüber trifft, ob ein Aminosäure-Austausch, also eine missense-Mutation, die Proteinfunktion beeinträchtigt oder nicht. Das Programm berücksichtigt hierbei die evolutionäre Konservierung, Position der Aminosäure in der Proteinsequenz sowie ihre Eigenschaften. Wird beispielsweise in einer Region hydrophober Aminosäuren eine solche durch eine eher hydrophile Aminosäure ersetzt, wirkt sich dies auf die Bewertung der Pathogenität der Mutation aus. Bei einem Score von <0,05 wird ein Aminosäureaustausch als Störung der Proteinfunktion angesehen [96]. Der Logit-Score ist ein neues Analyse-Instrument, welches die Pathogenität durch Zusammenfassung der Ergebnisse mehrerer Prädiktionsinstrumente beurteilt. Diese Medical Re-sequencing Analysis Pipeline (MERAP) stützt sich für die Berechnung des Logit-Scores auf die Analyse sieben verschiedener Algorithmen zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit der Pathogenität einer genomischen Veränderung. Dazu zählen Grantham score [97], phyloP [91], GERP [98], SIFT [96], PolyPhen2 [90], MutationTaster [99] und die Conserved Domains Database (CDD) [100]. Dabei berücksichtigt MERAP auch Phänotyp und Interaktion mit bekannten krankheitsverursachenden Genen und Proteinen. Je höher der berechnete Logit-Score desto größer wird die krankheitsverursachende Potenz einer Mutation eingeschätzt; für trunkierende und splice-site Mutationen kann kein Logit-Score angegeben werden (persönliche Kommunikation mit Dr. Hao Hu, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin) [101]. Das Programm MERAP wurde von Dr. Hao Hu entwickelt und er führte auch die hier berichteten Berechnungen durch.
Auf Basis dieser Instrumente und der Betrachtung der Proteinfunktion und -expression wurde unter den genomischen Mutationen jeder Familie ein Gen identifiziert, welches als krankheitsverursachend anzusehen ist. Durch Sanger-Sequenzierung dieses Kandidatengens, siehe Abschnitt 2.3.8, wurde bei jedem Familienmitglied das Vorliegen der Mutation überprüft und bestätigt. Der Trägerstatus der Eltern sowie gesunder Geschwister wurden ermittelt und die Co-Segregation von Genotyp und Phänotyp belegt.

2.3.3 DNA-Gewinnung

Die DNA wurde aus Lymphozyten der Patienten gewonnen. Sie wurde aus EDTA-Blut vor Ort extrahiert, in Wasser gelöst und in Kühltaschen versandt.

2.3.4 Prüfung der DNA-Konzentration, -Reinheit und Verdünnung

Mittels eines Spektrometers wurde die Konzentration der DNA und ihre Reinheit überprüft. Die Konzentration einer DNA-Probe wird durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Durch Vergleich mit der Leer-Probe (Aqua bidestillata) ermittelt das Gerät mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration der Probe. Es wird hierfür lediglich ein Volumen von 150µl benötigt. Eine optische Dichte von 1 (OD260 = 1) entspricht einer Konzentration von 50µg/ml Doppelstrang-DNA. Des Weiteren kann auf Grund des Absorptionsverhaltens verschiedener Moleküle die Reinheit der DNA im Spektrometer überprüft werden. Es gilt

230 nm: Absorptionsmaximum von Salzen und organischen Verbindungen
280 nm: Absorptionsmaximum von Proteinen

Auf Grund der Molekülstruktur von Desoxyribonucleinsäure ergibt sich bei reiner DNA ein Wert von OD260/280 = 1,8. Liegt der Wert (OD260/280) zwischen 1,8 bis 2,0, kann eine ausreichende Reinheit angenommen werden. Nur DNA-Proben dieser Qualität und mit einer Konzentration von über 30ng/µl wurden in dieser Arbeit verwendet. Werte unter 1,8 weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin. Bei Werten über 2,0 könnte eine Verunreinigung durch RNA oder denaturierte DNA bestehen. Für die weitere Verwendung zur Sequenzanalyse bedarf es DNA in einer Konzentration von ca. 30ng/µl. Nach Messung der Konzentration im Spektrometer wurde die DNA mit H2O auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.3.5 Primerdesign

Die für die PCR und die Sequenzierreaktion verwendeten Primer wurden mit dem Programm Primer3 entworfen. Als Primer bezeichnet man Oligonukleotide einer Länge von 16 bis 30 Basenpaaren, die komplementär an Bereiche der DNA binden, die am Beginn und Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes liegen. Durch Eingabe der Referenzsequenz des zu sequenzierenden Genabschnittes und benutzerdefinierter Kriterien gibt das Programm entsprechende Oligonukleotide an. Bei der Auswahl geeigneter Primer wurde auf die im Folgenden beschriebenen Kriterien geachtet: Die Schmelztemperatur von Forward- und Reverse-Primern sollte zwischen 56ºC und 63ºC, mit einem Optimum bei 59ºC, liegen und dabei um nicht mehr als 1,5ºC voneinander abweichen. Die Primer sollten zwischen 18 bis 25 Basenpaare (bp) lang sein. Ein Abstand von etwa 80 bp zu Exonbeginn bzw. Exonende wurde angestrebt um Intron-Exon-Übergangsstellen mitzuerfassen. Der GC-Gehalt sollte zwischen 20-80% liegen, wobei am 3'-Ende vermehrt die Basen Guanin und Cytosin auftreten sollten. Zudem sollte das Reaktionsprodukt möglichst nicht länger als 700 Basenpaare sein. Ein weiteres wichtiges Auswahlkriterium stellt eine hohe Spezifität der Primer dar, d.h. diese sollten nicht zusätzlich an andere Stellen der DNA binden können. Repetitive Sequenzbereiche und Bereiche der DNA mit vermehrter Abfolge einer Base eignen sich aufgrund der damit verbundenen erhöhten Anfälligkeit für Fehler nicht als Zielsequenz für mögliche Primer. Die

Primerauswahl mit dem Programm Primer3 wurde mit Hilfe des UCSC Genome Browsers jeweils kontrolliert: Mit der Funktion InSilicoPCR kann die korrekte Lage überprüft werden. Die Oligonukleotide wurden zur Herstellung einer Stammlösung der Konzentration 100 pmol/µl gelöst. Als Arbeitslösung wurde eine Verdünnung der Primer von 10 pmol/µl verwendet. Die Stammlösung wurde bei -20ºC eingelagert, die Arbeitslösung bei +4ºC. Die für PCR und Sequenzierung nach Sanger verwendeten Primer werden in Kapitel 2.2.4 benannt.

2.3.6 Die Polymerase-Kettenreaktion

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) können selektiv DNA-Abschnitte in einem Genom vervielfältigt werden. Um einen bestimmten DNA-Abschnitt zu amplifizieren, bedarf es einer kurzen bekannten Sequenz von 15 bis 25 Basen als Ausgangspunkt für die Neusynthese eine komplementären DNA-Abschnitts. Ein sogenannter Oligonukleotid-Primer, der zu diesem Zweck komplementär zu der bekannten Sequenz synthetisiert wird, dient einer DNA-Polymerase als Startpunkt für die weitere Synthese. Es wird eine hitzestabile DNA-Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus verwendet, die unter der Zugabe von den vier Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) den komplementären Strang verlängert ohne bei Erhitzung auf 94°C zu denaturieren. Dieser Prozess läuft vielfach hintereinander in Zyklen ab. Ein jeder Zyklus beginnt mit der Erhitzung des Reaktionsgemisches, wodurch sich die beiden komplementären DNA-Stränge trennen. Anschließend wird die Temperatur gesenkt und das Anlagern der Primer ermöglicht ("annealing"). Diese Anlagerung wurde mittels touch-down PCR, einer stufenweise Reduktion der Temperatur von 0,5°C bei jedem Zyklus, verbessert. Die DNA-Polymerase synthestisiert in 5´ - 3´-Richtung den komplementären DNA-Strang.
Diese Methode führt zur Verdopplung der zu amplifizierenden DNA-Sequenz bei jedem Zyklus, da durch die Zugabe von einem Forward- und einem Reverse-Primer von beiden Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts die Re-Synthese erfolgen kann. Die Produkte dienen im nächsten Zyklus dann selbst wieder als Vorlage, Matritze, für die Synthese eines neuen DNA-Stranges. Das Produkt des ersten Zyklus hat eine variable Länge, da nur der Startpunkt durch den Primer festgelegt ist und der Endpunkt durch die Dauer der Synthesereaktion bedingt ist. Der Endpunkt muss jedoch über die Bindungsstelle für den Reverse-Primer hinausreichen, sodass in den folgenden Zyklen das Produkt selbst als Vorlage dienen kann. Auf diese Weise wird ab dem zweiten Zyklus immer ein Produkt genau festgelegter Länge synthetisiert. Der Reaktionsansatz, Tabelle 2.6, bietet unter Zugabe der DNA und der beiden synthetisierten Primer die Grundlage für die Polymeraseketten-Reaktion.

Komponenten	Volumen
dNTP-Mix (25mM,Roche)	50µl
10x PCR-Puffer	5ml
MgCl2 (25mM)	5ml
Betaine (5M)	5ml
ddH2O	34,3ml
MPI-Taq (10U/µl)	500µl
MPI-Pfu-Taq (10U/µl)	14µl
Gesamtvolumen	50ml

Tabelle 2.6: PCR-Ansatz

Verwendet wurden die in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Primer (Konzentration 10pmol/µl) sowie DNA der Konzentration (30ng/µl). Mittels eines Thermocyclers, in dem die Abfolge von Zyklen und Temperatur automatisiert erfolgt, kann die Vervielfältigung des DNA-Abschnittes vollzogen werden.

Reaktanten		Bedingungen		
Produkt	**Volumen**	**Zyklus**	**Temperatur**	**Dauer**
DNA	1µl	1x	96°C	3min
Primer Forward	1,5µl	20x	94°C	30sec
Primer Reward	1,5µl		65°C-55°C	30sec
PCR-Ansatz	45µl		72°C	36sec
		30x	94°C	30sec
Gesamtvolumen	49µl		55°C	30sec
			72°C	36sec
		1x	72°C	10min

Tabelle 2.7: Reaktanten und Bedingungen der PCR

2.3.7 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation der gewünschten Sequenz wurden die Produkte der PCR-Reaktion auf ihre Länge und Qualität mittels Gelelektrophorese überprüft. Es wurde stets ein Ansatz ohne DNA-Zugabe als Negativprobe beigefügt. Eine Kontamination durch fremde DNA konnte so ausgeschlossen werden. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Agarose-Platte, auf die die Produkte aufgetragen wurden.

Komponenten	Konzentration	Volumen/Gewicht
Agarose		1g
Tris- Acetat- EDTA- Puffer (TEA) 1x Puffer		100ml
Ethidiumbromid	10mg/ml	10µl

Tabelle 2.8: Reaktanten Agarose-Gel

Durch Erhitzung des Puffers in einem Erlenmeyer-Kolben wurde die Agarose gelöst und vor vollständigem Abkühlen Ethidiumbromid zugegeben. Der toxische Stoff hat die Eigenschaft sich zwischen den Basen der DNA einzulagern und dabei sein Anregungsspektrum zu verändern, sodass die Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Es werden so in der späteren Fotodokumentation jene Stellen aufleuchten, an denen sich Nukleinsäuren befindet, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen.
Anschließend wurde das Gemisch gleichmäßig auf eine mit Klebebändern gerahmte Glasplatte gegossen, ohne dass sich Lufteinschlüsse in dem noch flüssigen Gel bildeten, die die elektrophoretische Wanderung behindern könnten. Ein Kunststoffkamm wurde in das Gel eingetaucht und stabil über Haken an den Wänden verankert. Bei späterer Entfernung des Kamms bilden sich Taschen im Gel. Zur Festigung und Polymerisation des Gels bedarf es etwa zwei Stunden. Nach Entfernung des Kamms wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt, umspült von TAE (1x) Puffer. Ein Gemisch aus PCR-Produkt und Loading Dye konnte nun in die Geltaschen gefüllt werden. Zusätzlich wurde an den Seiten jeder Agarose-Platte je eine Vergleichs-Probe, 'Längenstandard', mit Sequenzen definierter Länge sowie eine DNA-freie Kontrolle aus der PCR-Reaktion in die Geltaschen eingebracht.

Slots	Volumen	Komponenten
Alle	2µl	6x DNA Loading Dye
Je Slot	10µl	PCR-Produkt *oder* 100bp Längenstandard *oder* Leeres PCR-Produkt (Kontrolle)

Tabelle 2.9: Reaktanten Gelelektrophorese

Durch Anlegen einer Spannung von 100 Volt wanderten die DNA-Moleküle auf Grund ihrer negativen Ladung von der negativen Elektrode (Katode) zur positiven Elektrode (Anode) durch das Gel. Große Moleküle bewegen sich auf Grund der Filterfunktion der netzartigen Gelstruktur weniger rasch als kleine Moleküle. Eine Größenzuordnung gelingt durch Zugabe synthetischer DNA-Moleküle standardisierter Länge. Nach zwei bis drei Stunden waren die PCR-Produkte hinreichend gewandert und somit auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe getrennt.
Unter UV-Licht wurde eine Fotografie der Banden angefertigt, die durch die Wanderung der DNA-Fragmente entstandenen sind. Auf diese Weise kann zum einen die Länge des gewünschten Pro-

dukts überprüft werden und so die korrekte Primer-Anlagerung und Amplifikation. Des Weiteren können durch die Dicke der dargestellten Banden die ungefähre Menge des Produkts und dessen Qualität abgeschätzt werden. Erscheinen mehrere Banden, so ist dies ein Hinweis, dass die Primer sich auch an nicht erwünschten Stellen unspezifisch anlagern konnten.
Durch die Angaben des Herstellers Fermentas zum 100bp-DNA-Leiter kann durch den Vergleich der Dicke der Banden im Foto der Geldokumentation geschlossen werden, wie hoch die jeweilige DNA Konzentration ist. In Folge dessen kann der notwendige Grad der Verdünnung für die weitere Sequenzierungsreaktion berechnet werden. Für die Sequenzierungsreaktion bedarf es pro 100 Basenpaaren des zu sequenzierenden Exons 2ng DNA. Durch Vergleich der Bandendicke der amplifizierten DNA mit dem Vergleichsstandard von Fermentas, kann die ungefähre Konzentration geschätzt werden. Hierzu eine beispielhafte Rechnung: Eine Bande von PCR-Produkt, die etwas stärker angefärbt ist als die Vergleichsbande des Leiters dieser Fragmentlänge, welche mit einer Konzentration 80ng DNA/µl angegeben ist, wird ungefähr auf eine Konzentration von 90ng/µl geschätzt. Das PCR-Produkt ist nach dem Primerdesign und kongruent im Gel von einer Länge von 282 Basenpaaren. Dem Bedarf von 2ng/100 Basenpaaren folgend, lautet die Rechnung:

$$2{,}82 \text{ x } 2\text{ng} = 5{,}6 \text{ ng DNA}$$

Das Zielvolumen ist 1 oder 2µl, welches in der weiteren Sequenzierungsreaktion eingesetzt wird. Nun wird folgende Rechnung angewandt: Bei einer Konzentration von 90ng/µl des PCR-Produktes, muss eine Verdünnung hergestellt werden, die sich der Zielkonzentration annähert. Entnimmt man 1µl des PCR-Produkts und erstelle eine Verdünnung von 1:15 mit Aqua bidest., erhält man eine neue Konzentration von 6ng/µl. Hiervon wird 1µl für die weitere Sequenzreaktion eingesetzt.

2.3.8 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von DNA bedeutet, die Reihenfolge der Basen innerhalb des Moleküls abzubilden. Die klassische Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem Prinzip des gezielten Kettenabbruchs, welches erstmals von Frederick Sanger im Jahr 1977 angewandt wurde [78]. Sanger benutzte neben den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) auch Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP) als Substrate für die Polymerase-Kettenreaktion.

Ein Didesoxynukleosidtriphosphat unterscheidet sich von einem Desoxyribonukleosidtriphosphat durch die Ribose, welche bei ersterem an Position 2' und 3' desoxidiert ist. Das Fehlen der Hydroxygruppe am 3'-Kohlenstoff-Atom führt zum Abbruch der Verlängerung des Moleküls durch die Polymerase, da die OH-gruppe bei der Polymerisation als Anknüpfungspunkt für das nächste Nukleotid dient. Je Ansatz nutzte Sanger hier zusätzlich zu den vier dNTPs entweder je ein ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP. In statistischer Verteilung nutzt die Polymerase nun statt der normalen dNTPs ein ddNTP, welches zum Kettenabbruch führt. Mittels Kapillarelektrophorese können die entstandenen Kettenabbruchprodukte aufgetrennt und zur Fluoreszenz angeregt

werden. Die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes fluoreszieren in unterschiedlicher Farbe und können so von einem Detektor erkannt werden. Die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheint, gibt somit die Sequenz der Basen als Chromatogramm wieder. Die Darstellung erfolgt mittels des Programms CodonCode. Die in der Sequenzdarstellung vorkommende Numerierung der Basen ist eine durch das Programm CodonCode vorgenommene, arbiträre, welche mit der ersten Base des Amplicons beginnt. Es wurden für die Sequenzierungsreaktion nach Sanger die PCR-Fragmente und Primer der PCR verwendet.

Reaktanten		**Bedingungen**		
Produkt	**Volumen**	**Zyklus**	**Temperatur**	**Dauer**
DNA	2 ng/100 bp	1x	96°C	1min
BigDye	2 µl	25x	96°C	30sec
BigDye Terminator	2 µl		50°C	15sec
Primer 10µM	1 µl		60°C	4min
Aqua ad iniectabilia	- ad 10 µl	∞	94°C	30sec

Tabelle 2.10: Reaktanten und Bedingungen der Sequenzierung nach Sanger

Aufbereitung der Sequenzierungsprodukte und Kapillarelektrophorese

Die anschließende Kapillarelektrophorese erfolgte durch den häuslichen Service des Max-Planck-Instituts mittels ABI 16-capillary 3130xl und 96-capillary 3130xl DNA Analyzer. Zuvor wurden das Produkte der Sequenzierungsreaktion aufgereinigt und für die Kapillarelektrophorese aufbereitet:
Nach einer kurzen Zentrifugation des Produktes auf 4000 Rotationen pro Minute (rpm) wurden jedem Ansatz 1µl der Detergenz Natriumdodecylsulfat (engl. sodium-dodecyl-sulfat, SDS) zugefügt und über 10 Minuten bei 98°C inkubiert. Die erneute Zentrifugation auf 4000rpm erfolgte bei 4°C. Dies bewirkt die Trennung der Nukleinsäuren von Proteinen. Anschließend wurden je Ansatz 27,5µl 100% Ethanol hinzugegeben und geschwenkt. Bei 4000rpm und 4°C wurde das Reagenz für 60 Minuten zentrifugiert. Ethanol bewirkt die weitere Reinigung der DNA von hydrophilen Substanzen. Der Überstand wurde vorsichtig auf Zellophanpapier ausgeklopft, sodass das Ethanol und die gelösten Substanzen entfernt wurden. Es erfolgte die Zugabe von 150µl 70% Ethanol und anschließendes Schwenken des Ansatzes sowie die erneute Zentrifugation auf 4000rpm bei 4°C für 30 Minuten. Anschließend wurde der Schritt mit 70%-igem Ethanol wiederholt. Das Pellet wurde getrocknet durch das kopfüber Lagern auf einem Zellophanpapier und kurzer Zentrifugation auf 4000rpm bei 4°C. Das auf diese Weise aufbereitete und von Überständen befreite Produkt konnte nun der Kapillarelektrophorese zugeführt werden. Die Ergebnisse wurden mit der CodonCode Aligner Software ausgewertet (CodonCode Corporation).

Kapitel 3

Ergebnisse und Erörterung

3.1 Konsanguine Familien mit autosomal-rezessiv vererbter Intelligenzminderung

3.1.1 Familie G001

Die Kopplungsanalyse ergibt zwei autozygote Intervalle auf Chromosom 12 und Chromosom 20.

Chromosom	SNP-Start-Marker	SNP-End-Marker	Länge (Mbp)	LOD-Score
12	12pter	rs7134036	11,19	2,5
20	rs6037950	rs2225634	5,45	2,5

Tabelle 3.1: Kopplungsintervalle Familie G001

Lediglich ein Kandidatengen auf Chromosom 12 wird bei Patient 2143/07 nach gezielter Anreicherung und NGS innerhalb der beiden autozygoten Bereiche identifiziert:

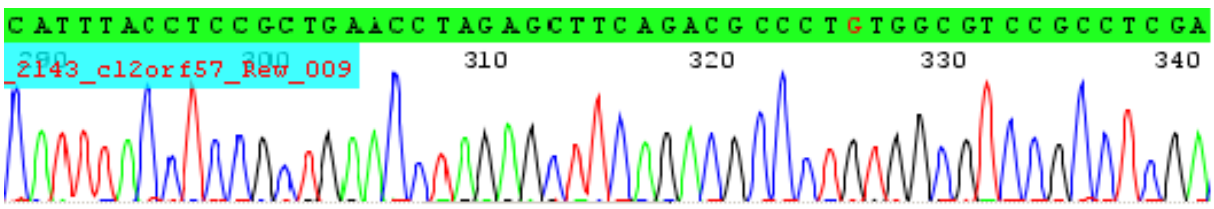
Gen	Mutation (hg19)	AS	PhyloP	PolyPhen	SIFT	Logit-Score
C12orf57	NC_000012.11: g.7053285A>G	p.M1V	2,868	b	d	4,416

(AS) Aminosäure; (b) benign; (d) damaging

Tabelle 3.2: Kandidatengene Familie G001

Die Mutation wird durch Sanger-Sequencing bei den einzelnen Familienmitgliedern bestätigt und segregiert mit der Erkrankung:

Abbildung 3.1: Mutation in *C12orf57* bei Patient 2143/07, Familie G001



Die Eltern sind heterozygote Anlageträger der Mutation. Die vier betroffenen Geschwister sind homozygote Träger der Mutation. Der gesunde Sohn ist heterozygoter Träger des veränderten Allels. Von der gesunden Schwester konnte keine genetische Untersuchung erfolgen. Die Darstellung der Veränderung bei den anderen Familienmitgliedern findet sich in Grafik 5.1, S.77, im Anhang.
Das Genprodukt von *C12orf57* (chromosome 12 open reading frame 57) auf dem Plus-Strang von Chromosom 12p13.31 ist Protein C10, bestehend aus 126 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 13178 Da (Dalton). Protein C10 wird ubiquitär jedoch in besonderem Maße im Zytoplasma von Neuronen im Gehirn exprimiert; insbesondere schreibt man *C12orf57* eine Funktion bei der Entwicklung des Corpus callosum zu (Akizu et al., 2013) [102]. Die erste Aminosäure, das Start-Methionin, ist evolutionär hoch konserviert und dient als Startcodon für die Translation von der messenger ribonucleic acid (mRNA) zur Aminosäurenfolge des Proteins.
Mutationen in *C12orf57* können das Temtamy Syndrom auslösen. Samia A. Temtamy beschrieb die Erkrankung erstmals 1991 bei einer konsanguinen Familie; Vater und Mutter waren Cousin und Cousine ersten Grades. Drei ihrer sechs Kinder litten an Iriskolobomen (HP:0000612), Corpus callosum-Agenesie (HP:0001274), leichter Intelligenzminderung (HP:0001256), Aortendilatation (HP:0001724) und kraniofazialen Dysmorphien (HP:0001999) [103]. Weitere Fallberichte folgten: Merkmale der Betroffenen waren okuläre Veränderungen (HP:0000478), Intelligenzminderung (HP:0001249), Entwicklungsverzögerung (HP:0001263), Corpus callosum-Agenesie (HP:0001274), epileptische Anfälle (HP:0001250), muskuläre Spastik (HP:0007325) oder Hypotonie (HP:0001352) und kraniofaziale Dysmorphien (HP:0001999). Die Merkmale waren recht konsistent, jedoch gab es kein Merkmal, welches nicht auch bei manchen Erkrankten fehlte [104, 105, 82, 106, 102]. Die molekulare Analyse erwies die Mutation in *C12orf57* (p.M1V) in mehreren Familien für ursächlich. Die Betroffenen trugen die Veränderung homozygot, ihre Eltern waren heterozygote Anlageträger [106].
Der Austausch der Aminosäure Methionin zu Valin im Startcodon lässt eine Beeinträchtigung der Translation vermuten [107]. Eine Erklärung für die in der Literatur beschriebene phänotypische Variabilität könnte sein, dass die Veränderung des Startcodons zu GUG scheinbar in unterschiedlichem Ausmaß zur Expression des Proteins führt. Das Vorkommen einer Kozak Sequenz, welche häufig auf der mRNA das Startcodons AUG flankiert, ist Ursache für dieses Phänomen. Die Effizienz dieser Proteintranslation erreicht jedoch nicht jene des Wildtyps und beeinträchtigt die normale Funktion [108]. Das nächste alternative Startcodon findet sich erst 105bp downstream im nicht-codierenden Intronbereich zwischen Exon 1 und Exon 2 von *C12orf57*.

3.1.2 Familie G002

Die Autozygotie-Kartierung ergibt das in Tabelle 3.3 dargestellte Kopplungsintervall auf Chromosom 1.

In dem Kopplungsintervall werden bei Patientin 1853/06 nach gezielter Anreicherung und NGS drei Kandidatengene auf Chromosom 1q42 gefunden: *OBSCN* (obscurin, cytoskeletal calmodu-

Chromosom	SNP-Start-Marker	SNP-End-Marker	Länge (Mbp)	LOD-Score
1	rs1157492	rs1342872	26,7	2,53

Tabelle 3.3: Kopplungsintervall Familie G002

lin and titin-interacting RhoGEF), *HIST3H3* (histone cluster 3, H3) und *TRIM17* (tripartite motif containing 17).

Gen	Mutation (hg19)	AS	PhyloP	PolyPhen	SIFT	Logit-Score
OBSCN	NC_000001.10: g.228471294C>T	p.A2943V	0,947	pr d	d	-1,484643294
HIST3H3	NC_000001.10: g.228612639G>A	p.R130C	2,566	pr d	d(lc)	1,005050197
TRIM17	NC_000001.10: g.228596779C>A	p.G326V	-0,308	po d	NA	NA

(AS) Aminosäure; (pr) probably; (d) damaging; (lc) low confidence; (po) possibly; (NA) not applicable

Tabelle 3.4: Kandidatengene Familie G002

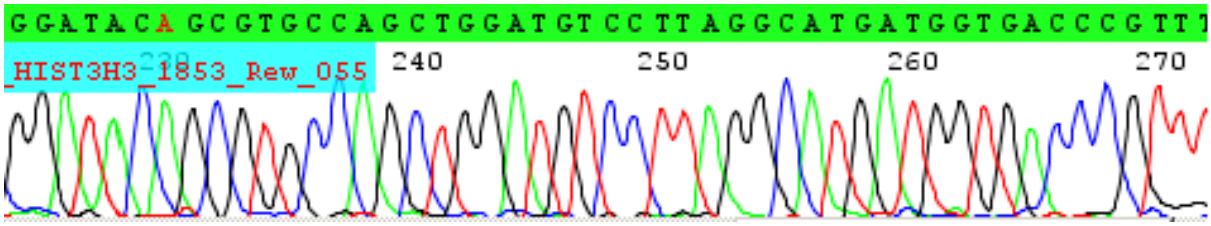
OBSCN ist ein Gen, welches 150 kb umfasst, mehr als 80 Exons enthält und auf dem Plus-Strang lokalisiert ist. Es existieren beim Menschen drei verschiedene Spleißvarianten. Sein Proteinprodukt Obscurin umfasst circa 720 Kilodalton (kDa) und wird in verschiedenen Geweben exprimiert, darunter Knochen, Bindegewebe, Nervenfasern jedoch vorwiegend im Muskel. Das Protein spielt eine Rolle in der Signaltransduktion von Sarkomeren, den kleinsten kontraktilen Einheiten der Muskelfibrillen. Obscurin wird eine Funktion bei der Organisation und Interaktion von sarkoplasmatischem Retikulum und Myofibrillen zugesprochen [109]. Bislang wurde *OBSCN* mit keiner Erkrankung assoziiert. Lediglich eine chromosomale Translokation, welche unter anderem *OBSCN* umfasst, ist beim Wilms-Tumor beschrieben: t(1;7)(q42;p15). Die Mutation c.10115C>T (p.A3372V) in *OBSCN* wird in allen drei Isoformen exprimiert; dieses Codon weist eine hochgradige Konservierung auf. Bei allen verglichenen Genomen der Datenbank NCBI (Homologene) war die Aminosäure Alanin konserviert.
TRIM17 liegt auf dem Minus-Strang und kodiert die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase TRIM17. Dieses zytoplasmatische Protein umfasst 477 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 54418 Dalton. Die existierenden drei Spleißvarianten werden ausschließlich im Hoden exprimiert.
HIST3H3 gehört zur Unterfamilie der H3-Histone und befindet sich im Histon-Cluster von Chromosom 1 (Chr.1q42.13). Histone sind basische Proteine, die im Zellkern vorkommen und das Gerüst für die Aufwicklung und Stabilisierung der DNA bilden. DNA und Histone bilden sogenannte Nukleosome, die die Grundstruktur der Chromosomen darstellen. Histone als basische Moleküle üben eine elektrostatische Anziehung auf die negativ geladene DNA aus. Man unterscheidet sechs verschiedene Histon-Klassen: H1, H2A, H2B, H3, H4 und H5. Ebenso wie die Proteine H2A und

H2B lagern sich H3 und H4 zu Dimeren zusammen. Je zwei dieser H3/H4-Dimere bilden ein Tetramer, dem sich wiederum zwei H2A/H2B-Dimere anlagern. Es entsteht ein Oktamer, welches den Kern des Nukleosomen darstellt, um welchen sich die DNA wickelt. Das Histonprotein H1 erfüllt eine verbindende Funktion zwischen diesen Kernproteinen des Nukleosoms. Neben ihrer Funktion als strukturgebende Elemente in Chromosomen spielen Histone eine wichtige Rolle in vielen weiteren Zellprozessen. Ihnen wird Einflussnahme auf die Regulation der Genexpression und des Zellzyklus zugesprochen, wobei post-transkriptionale Modifikationen an den Histon-Proteinen wie Acetylierung und Phosphorylisierung für ihre Funktion eine Rolle zu spielen scheinen. Die epigenetische Inaktivierung und Regulation der Genexpression durch Histone ist Gegenstand derzeitiger Forschung [110]. In der Publikation von Najmabadi et al., 2011, betrafen zehn der neuen Gene für Intelligenzminderung solche, welche in Aufbau und Funktion von Histonen involviert sind [35]. *HIST3H3* besteht nur aus einem Exon und wird posttranskriptional nicht durch eine Polyadenylierung versehen, den sog. Poly-A-Schwanz. Stattdessen wird an das Transkript eine palindromische Endsequenz angehängt, also ein Bereich einer kurzen doppelsträngigen DNA, deren komplementäre Sequenzen spiegelverkehrt zueinander stehen. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 15508 Dalton.
Man unterscheidet in der H3-Histon-Familie replikationsabhängige von replikationsunabhängigen Genen, ihre Expression in Abhängigkeit vom Zellzyklus beschreibend. Die Expression von *HIST3H3* ist replikationsabhängig und findet vorwiegend in der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus statt. Die Gene der replikationsabhängigen H3-Histone liegen vorwiegend in einem der drei Histon-Cluster auf Chromosom 1q21 (HIST2-Cluster), 1q42 (HIST3-Cluster) oder 6p22-p21.3 (HIST1-Cluster). HIST1 (6p21-p22) enthält 55 Histon-Gene, HIST2 (1q21) enthält sechs und HIST3 (1q42) ebenfalls drei Histon-Gene. Die replikationsunabhängigen H3-Histone sind über das Genom verteilt und liegen nicht in einem Cluster vor. Posttranskriptionelle Modifikationen umfassen Acetylierung, Citrullierung, Methylierung, Phosphoprotein- und Ubl-Konjugation [111]. Trotz der geringen molekularen Unterschiede zwischen den H3-Proteinen, weisen Analysen zu Genexpression und post-transkriptioneller Modifikation darauf hin, dass die H3-Proteine einzigartige und jeweils eigenständige Funktion übernehmen [112]. Die in dieser Arbeit identifizierte Mutation in *HIST3H3* betrifft den Austausch von Arginin zu Cystein (p.R130C).
Die Aminosäure Arginin ist in der Regel evolutionär hoch konserviert. *HIST3H3* hat nur ein Transkript und wird in vielen Geweben exprimiert, in besonderem Maße jedoch in Leber, Leukozyten, Nieren und Herz.
Nach Betrachtung der Ergebnisse der Analyseinstrumente zur Prädiktion der Pathogenität der drei beschriebenen Mutationen wird die Mutation in *HIST3H3* als krankheitsverursachend priorisiert.

Bei den drei betroffenen Kindern wird die Mutation homozygot beobachtet, in Grafik 3.2 dargestellt anhand der genomischen Sequenz der Indexpatientin 1853/06. Durch DNA-Sequenzierung nach Sanger wird ebenfalls die heterozygote Anlageträgerschaft der beiden Eltern bestätigt. Der gesunde Sohn (1856/06) ist kein Träger der beschriebenen Mutation, sondern weist homozygot den

Wildtyp des Gens auf. Die Darstellung der Veränderung der beiden anderen Familienmitglieder findet sich in Grafik 5.2, S.78, im Anhang.

Abbildung 3.2: Mutation in *HIST3H3* bei Patientin 1853/06, Familie G002



3.1.3 Familie G008

Die Autozygotie-Kartierung ergibt zwei Kopplungsintervalle auf den Chromosomen 9 und 12:

Chromosom	SNP-Start-Marker	SNP-End-Marker	Länge (Mbp)	LOD-Score
9	rs603328	rs950078	4,59	1,8
12	rs10734905	rs740743	2,51	1,8

Tabelle 3.5: Kopplungsintervalle Familie G008

In den beiden autozygoten Bereichen werden nach gezielter Anreicherung und NGS vier Kandidatengene bei Patientin 2479/08 identifiziert.

Gen	Mutation (hg19)	AS	PhyloP	PolyPhen	SIFT	Logit-Score
GLT6D1	NC_000009.11: g.138516347A>C	p.W143G	0,323	pr d	d	0,462688867
RALGDS	NC_000009.11: g.135984252C>T	p.A196T	1,522	b	t	1,161903726
NCOR2	NC_000012.11: g.124862914G>A	p.A679V	3,667		t	2,718505193
SURF1	NC_000009.11: g.136219373A>G	p.W227R	4,685	pr d	d	5,254587985

(AS) Aminosäure; (pr) probably; (d) damaging; (b) benign; (t) tolerated; ( ) keine Angabe

Tabelle 3.6: Kandidatengene Familie G008

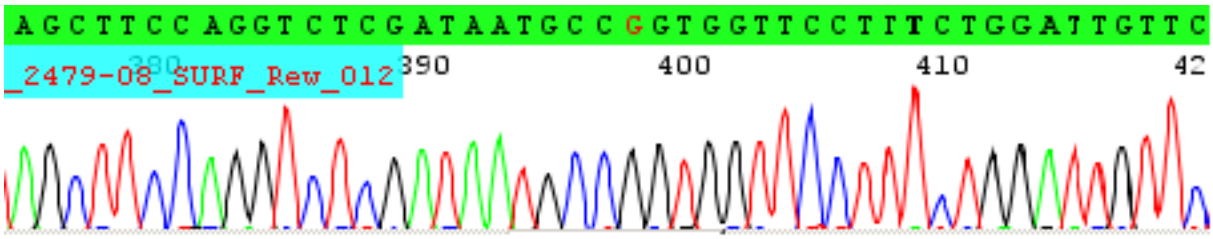
Das Genprodukt von *GLT6D1* (Glycosyltransferase 6 domain containing 1) auf Chromosom 9q34.3 ist ein Protein aus 308 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 36274 Dalton. *GLT6D1* gehört zur Familie der Gycosyltransferasen, die am AB0-System der Blutgruppen beteiligt sind. Es existieren fünf Isoformen.
Das Proteinprodukt des Gens *RALGDS* auf Chromosom 9q34.3 fördert die Dissoziation von GDP

(Guanosin-Diphosphat) von Ras-GTPasen, welches die Bindung von Guanosintriphosphat und somit die Aktivierung und Funktionssteuerung von GTP-asen beeinflusst. Das Protein ist hierdurch an verschiedenen Prozessen des Zellstoffwechsels beteiligt. Bisher wurde keine Krankheitsassoziation beschrieben.
NCOR2 liegt auf Chromosom 12q24. Sein Proteinprodukt Nuclear receptor corepressor 2 wird ubiquitär exprimiert und spielt im Zellkern eine Rolle bei der Expression des Schilddrüsenhormon- und Retinsäurerezeptors. Alternatives Splicing führt zu fünf verschiedenen Isoformen. Das Protein hemmt als Co-Repressor in einem Proteinkomplex auf Ebene der Transkription die Genexpression der beiden Zielgene durch Modifikation der Chromatinstruktur.
SURF1 (Chr. 9q34.2) codiert das Surfeit Locus Protein 1, welches 300 Aminosäuren umfasst und ein Molekulargewicht von 33331 Dalton aufweist. Es existieren zwei Isoformen; beide enthalten die hier veränderte Aminosäure und werden im Körper ubiquitär exprimiert. Das Surfeit Locus Protein 1 liegt an der inneren Mitochondrien-Membran und ist in den Aufbau und die Funktion der Cytochrom-C-Oxidase involviert. Dieses Enzym ist Teil der Atmungskette in Mitochondrien und an der Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) in jeder Körperzelle entscheidend beteiligt. Die in dieser Familie identifizierte Veränderung führt zum Aminosäuren-Austausch von Tryptophan zu Arginin. Tryptophan ist an dieser Position im Protein hoch konserviert *SURF1* ist als krankheitsverursachendes Gen des Leigh-Syndroms bekannt [113]. Es handelt sich hierbei um eine Mitochondriopathie, die mit Degeneration und Nekrosen in Stammganglien (HP:0012128) und anderen Bereichen des zentralen Nervensystems einhergeht. Die klinische Verlaufsform ist sehr variabel. Es kommt unter anderem zu epileptischen Anfällen (HP:0001250), muskulärer Hypotonie (HP:0001252) und Augenmuskelparesen (HP:0000597). Bislang sind 22 verschiedene Mutationen in *SURF1* identifiziert worden, jedoch konnte bisher keine konstante Genotyp-Phänotyp Relation abgeleitet werden. Die Meta-Analyse von Lee et al. kommt zu dem Ergebnis, dass frameshift-Mutationen eine etwas bessere Prognose haben [113]. Ein Großteil der bisher beschriebenen Veränderungen sind nonsense-Mutationen, nur wenige missense-und frameshift-Mutationen (fs). Der Befund der zerebellären Hypoplasie (HP:0001321) bei den Geschwistern könnte einer diskreten Ausprägung des Leigh-Syndroms entsprechen. Die Mutation in *SURF1* wird nach Zusammenschau der Befunde der Prädiktionsinstrumente, der Proteinfunktion wie auch der klinischen Symptomatik als krankheitsverursachend beurteilt.

Der Befund wurde durch die Untersuchung der DNA der beiden betroffenen Geschwister und ihrer Mutter mit der Methode der Sanger-Sequenzierung validiert. Die Darstellung der genomischen Sequenz zeigt die homozygote missense-Mutation in *SURF1*.

Während die beiden betroffenen Töchter homozygote Trägerinnen der Mutation sind, ist die Mutter heterozygote Anlageträgerin der missense-Mutation. Die Darstellung der Mutation bei den beiden anderen Familienmitgliedern findet sich in Grafik 5.3, Seite 78, im Anhang.

Abbildung 3.3: Mutation in *SURF1* bei Patientin 2479/08, Familie G008



3.1.4 Familie G015

Die Autozygotie-Kartierung ergibt folgendes Kopplungsintervall auf Chromosom 9:

Chromosom	SNP-Start-Marker	SNP-End-Marker	Länge (Mbp)	LOD-Score
9	rs10776875	9qter	2,2	3,3

Tabelle 3.7: Kopplungsintervall Familie G015

Die folgenden Kandidatengene werden nach gezielter Anreicherung und NGS bei Patient 2454/08 in dem autozygoten Areal auf Chromosom 9 (Chr.9q34) identifiziert:

Gen	Mutation (hg19)	AS	PhyloP	PolyPhen	SIFT	Logit-Score
SLC34A3	NC_000009.11: g.140127732G>A	p.S211N	0,546	b	d	-1,18804082
RABL6	NC_000009.11: g.139733864G>C	p.A563P	5,355	pr d	d (lc)	3,921785157
INPP5E	NC_000009.11: g.139324768T>C	p.Y588C	1,739	pr d	d (lc)	2,206132629
SEC16A	NC_000009.11: g.139371526C>T	p.G181E	0,403	pr d	d (lc)	-0,875002157
CACNA1B	NC_000009.11: g.140943730A>G	p.I1225V	3,56	b	t	2,687571406
PMPCA	NC_000009.11: g.139317563A>T	p.E475D	-1,185	b	t	-2,036047359

(AS) Aminosäure; (b) benign; (d) damaging; (pr) probably; (lc) low confidence; (t) tolerated

Tabelle 3.8: Kandidatengene Familie G015

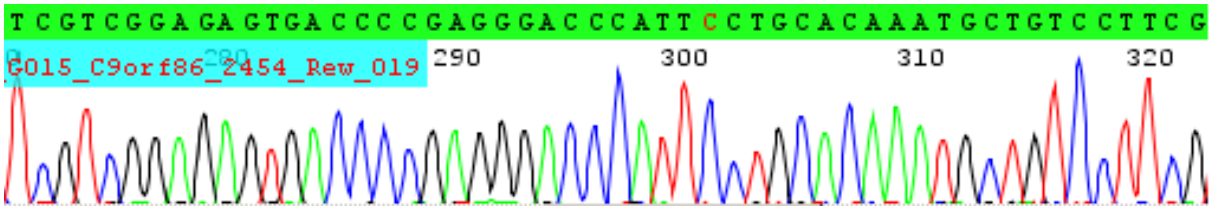
Das Proteinprodukt von *SLC34A3* ist ein Natrium-abhängiges Phosphattransportprotein, welches vorwiegend in der Niere exprimiert wird und den Austausch von Phosphat gegen Natrium über die Zellmembran in das Lumen der Nierentubuli gewährleistet. Veränderungen in diesem Gen können zur hereditären hypophosphatämischen Rachitis mit Hyperkalzurie (HHRH) führen. Die Dysfunktion des Transportproteins führt zu einer verminderten Reabsorption von Phosphat in den renalen Tubuli und konsekutiv zu einer gestörten Knochenmineralisation (HP:0004605) [114].

SEC16A ist ein Protein-codierendes Gen, welches ubiquitär in fünf verschiedenen Isoformen exprimiert wird, in besonderem Maße im Pankreas. Es ist am exkretorischen Transport von Proteinen an der Membran des endoplasmatischen Retikulums zum Golgi-Apparat beteiligt. Zwei Isoformen werden unterschieden; beide tragen die Aminosäure, bei welcher eine Mutation identifiziert wurde. Glycin an Stelle 181 der Aminosäuresequenz ist evolutionär nur mäßig konserviert, die gesamte umliegende Sequenz fehlt beim Rhesusaffen, einem genetisch nahen Verwandten des Menschen; die Übereinstimmung beider Genome liegt bei 93,5%.
Das Proteinprodukt des Gens *CACNA1B* (calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit) ist die porenbildende und spannungssensitive Untereinheit 1B eines N-Typ-Calciumkanals in der Zellmembran von Neuronen. Dessen Aktivität führt über einen Calciumeinstrom zur Neurotransmitterausschüttung. Experimente mit genetisch veränderten Mäusen und Ratten, die zu einer verminderten Funktion der 1B-Untereinheit führten, zeigten eine Alteration der Schmerzweiterleitung [115]. Die Aminosäure Isoleucin ist hoch konserviert, bei keiner der zur Verfügung stehenden Genome zeigt sich hier eine abweichende Sequenz auf genomischer Ebene.
PMPCA (Peptidase (mitochondrial processing) alpha) codiert für die Untereinheit einer Protease, die von unreifen mitochondrialen Proteinen Aminosäuresequenzen abspaltet. Das Enzym ist ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten, wobei *PMPCA* die Alpha-Einheit codiert. Das Protein wird in allen Körperzellen exprimiert, vorwiegend jedoch in Herz, Skelettmuskel und Hoden. Glutamat ist an dieser Stelle der Aminosäuresequenz evolutionär nur mäßig konserviert, verschiedene Affenarten weisen die gleiche Aminosäure auf, bei anderen Lebewesen wie Opposum und Huhn zeigen sich jedoch hier unterschiedliche Sequenzen. Die Werkzeuge zur Interpretation der Mutation weisen eher auf eine benigne Veränderung hin. Bis dato ist keine Krankheit mit *PMPCA* in Verbindung gebracht worden.
Die Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase ist das Proteinprodukt von *INPP5E* und spaltet von Phosphatidyl-Inositol-Triphosphat eine Phosphatgruppe ab. Dieses Molekül spielt eine Rolle im intrazellulären Calcium-Stoffwechsel und agiert als sekundärer intrazellulärer Botenstoff bei verschiedenen Stoffwechselvorgängen. Die Aminosäure Tyrosin ist an dieser Stelle des Proteins bei vielen mit dem Menschen wenig verwandten Lebewesen gleich, beim Schimpansen jedoch, mit welchem der Mensch 99% seines Erbgutes teilt, findet sie sich nicht. Genetische Veränderungen in diesem Gen wurden bei zwei verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen: dem Joubert-Syndrom und dem MORMS-Syndrom. MORM als Akronym bezeichnet die wichtigsten Merkmale der seltenen Erkrankung: Intelligenzminderung (engl. **m**ental retardation), stammbetonte Adipositas (engl. truncal **o**besity), kongenitale nonprogressive retinale Dystrophie (engl. **r**etinal dystrophy) sowie Mikropenis (engl. micropenis) bei männlichen Betroffenen [116]. Beim Joubert-Syndrom handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, welche mit Augenfehlbildungen (HP:0000478), Kleinhirnhypoplasie (HP:0001321), insbesondere des Kleinhirnwurms, und anderen Symptomen wie Intelligenzminderung (HP:0001249), Entwicklungsverzögerung (HP:00012-63), Ataxie (HP:0001251) aber auch Apnoen (HP:0002104) und Atemstörungen (HP:0005957) einhergeht. Bielas et al. wiesen fünf homozygote Veränderungen in *INPP5E* nach, welche alle-

samt in der enzymatisch aktiven Phosphatase-Domäne des Enzyms liegen und deren Funktion beeinflussen [117]. Die in diesem Fall identifizierte Mutation wurde in der Arbeit von Bielas et al. nicht beschrieben. Jedoch befindet sich diese ebenso wie die bereits beschriebenen Veränderungen in der katalytischen Domäne des Proteins.
Das Gen *RABL6*, zuvor als *C9orf86* bezeichnet, codiert ein Protein namens Rab-like protein 6 (RAB, member RAS oncogene family-like 6), welches zur Familie der kleinen GTPasen gehört. Es existieren sechs verschiedene Isoformen auf Grund alternativen Splicings, wobei Isoform 1 vorwiegend im Zytoplasma, Isoform 3 vor allem im Zellkern vorkommt. Die Isoformen unterscheiden sich durch lange Aminosäuresequenzen. Das Protein umfasst 729 Aminosäuren und hat eine Molekulargewicht von 79549 Dalton. Die Aminosäure Alanin ist evolutionär hoch konserviert. Bislang sind in Verbindung mit *RABL6* keine Erkrankungen beschrieben worden. Die Mutation in *RABL6* wird nach Betrachtung der Instrumente zur Pathogentitätsanalyse, insbesondere des hohen Logit-Scores und phyloP-Wertes, als krankheitsverursachende Veränderung priorisiert.

Mittels Sequenzierung nach Sanger wurde das Ergebnis bestätigt. Die Eltern sind heterozygote Anlageträger, die betroffenen Geschwister homozygote Träger der Mutation.

Abbildung 3.4: Mutation in *RABL6* bei Patient 2454/08, Familie G015



Die Darstellung der genomischen Veränderung der einzelnen Familienmitglieder findet sich in Grafik 5.4, S.79, im Anhang.

3.1.5 Familie G017

Die Autozygotie-Kartierung ergibt folgende Kopplungsintervalle:

Chromosom	SNP-Start-Marker	SNP-End-Marker	Länge (Mbp)	LOD-Score
1	rs4565709	rs12409641	3,88	2,4
8	rs4871603	rs7010302	6,07	2,4
8	rs13273697	rs10956832	18,31	2,4
10	rs1251007	rs1218347	1,34	2,4
18	rs8088721	rs17651514	14,33	2,4

Tabelle 3.9: Kopplungsintervalle Familie G017

Drei Kandidatengene werden nach gezielter Anreicherung und NGS in den autozygoten Arealen bei Patient 2333/07 identifiziert:

Gen	Mutation (hg19)	AS	PhyloP	PolyPhen	SIFT	Logit-Score
ATP13A2	NC_000001.10: g.17320129C>T	p.G582S	4.9	pr d	t	4,114723523
ELP2	NC_000018.9: g.33739953A>C	p.T620P	5.542	pr d	t	4,658416898
LAMA3	NC_000018.9: g.21501441A>G	p.Q2690R	-0,136	b	t	-0,950952223

(AS) Aminosäure; (pr) probably; (d) damaging; (b) benign; (t) tolerated

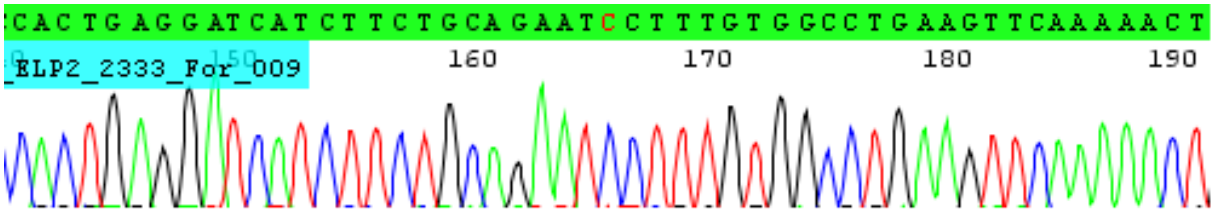
Tabelle 3.10: Kandidatengene Familie G017

Die ATPase Typ 13A2 (Gen *ATP13A2*, Chromosom 1p36) ist ein transmembranäres Enzym der Zellmembran, dessen katalytische Aktivität die intrazelluläre Homöostase von Kationen beeinflusst. Es katalysiert die Reaktion ATP + H2O = ADP + Phosphat und ist am transmembranären Transport von positiv geladenen Ionen beteiligt. Das Protein besteht aus 1180 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 128794 Dalton und wird vorwiegend im Gehirn exprimiert. Es existieren drei verschiedene Isoformen durch alternatives Splicing. Veränderungen in *ATP13A2* werden mit dem Kufor-Rakeb Syndrom assoziiert. Es handelt sich hierbei um eine seltene autosomalrezessive Form des Morbus Parkinson. Beginnend im Jugendalter äußert sich die Erkrankung durch muskuläre Spastik (HP:0001257), supranukleäre Blickparese (HP:0000623) und Demenz (HP:0000726). Ein Mangel an ATP13A2 führt zu lysosomaler wie mitochondrialer Dysfunktion und Akkumulation von ß-Synuclein, einem Protein, welchem eine neurotoxische Wirkung und dabei eine Schlüsselrolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson zugesprochen wird [118]. Neuroradiologisch gibt es zudem Hinweise, dass beim Kufor-Rakeb-Syndrom eine Akkumulation von Eisen im Gehirn auftritt [119].
Laminine spielen in der Migration, Zelladhäsion und Organisation von Zellen zu Geweben in der frühen Embryogenese eine wichtige Rolle, indem sie mit Komponenten der extrazellulären Matrix interagieren. Laminin 5 ist ein komplexes Glykoprotein, welches aus drei Untereinheiten besteht und an der Signaltransduktion und Differenzierung von Keratinozyten beteiligt ist. Das Genprodukt von *LAMA3*, Chromosom 18q11.2, ist die Untereinheit Laminin Alpha-3 dieses Proteinkomplexes. Es besteht aus 3333 Aminosäuren und hat eine Molekulargewicht von 366649 Dalton. Die Genexpression erfolgt in Geweben, die eine Barrierefunktion oder die sekretorische Eigenschaften haben. In Bereichen der Wundheilung findet eine Hochregulation der Expression von *LAMA3* statt. Mutationen in diesem Gen wurden bei zwei verschiedenen Erkrankungen aus dem Spektrum der Epidermolysis bullosa identifiziert, dem Subtyp Herlitz und dem Laryngo-Onycho-Kutanen Syndrom [120, 121]. Diese Erkrankungen führen bei der geringsten Belastung zu Schädigung von Haut und Schleimhäuten mit schweren Folgeerscheinungen; die Intelligenz ist jedoch nicht beeinträchtigt.
Das Elongator Complex Protein 2 ist das Genprodukt von *ELP2* (Chr. 18q12.2). Das zytoplasmatische und im Zellkern vorkommende Protein besteht aus 826 Aminosäuren und hat ein Molekular-

gewicht von 92500 Dalton. Durch alternatives Splicing sind sieben verschiedene Isoformen bekannt. Das Protein ist Teil eines Proteinkomplexes, des humanen Elongations-Komplexes (engl. humane elongator complex), welcher als Untereinheit der RNA-Polymerase II fungiert und als solcher an der Transkription beteiligt ist. Der transkriptionale Elongations-Komplex wurde 2002 von Hawkes et al. beim Menschen wie auch bei der Hefe beschrieben: Er ist als Untereinheit des Holoenzyms der RNA-Polymerase II vorwiegend an der Elongation der initiierten Transkription beteiligt und hat zudem durch Acetylierung von Histonen mutmaßlich weitergehende Funktionen. Es besteht eine hohe evolutionäre Konservierung. Hawkes et al. schlussfolgern zudem, dass der gesamte humane Elongations-Komplex über seine Funktion in der Transkription hinaus auch in der Chromatin-Organisation der Zellen eine Rolle spielt [122]. Auch besteht ein Zusammenhang zwischen *ELP2* und einer Familie von Transkriptionsfaktoren. Das Maus-Homolog des Proteins ELP2 ist StIP1 (STAT-Interacting Protein 1). Dieses dem menschlichen ELP2 homologe Protein StIP1 interagiert mit Transkriptionsfaktoren der Familie der "signal transducer and activator of transcription" (STAT). Hierbei zeigten Collum et al., dass StIP1 die ligandenabhängige Aktivierung von STAT3 reguliert, indem es als Gerüstprotein die Interaktion von Januskinasen und ihrem STAT3-Substrat beeinflusst. Es ist zu vermuten, dass ELP2 in der Regulation von Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielt [123]. Die Mutation in *ELP2* führt auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Prolin, p.T620P.
Auf Grund der beschriebenen Proteinfunktion, der Pathogenitätsanalyse und der klinischen Befunde der Familie G017 wird die Mutation c.1858A>C (p.T620P) in *ELP2* als ursächlich für die Erkrankung angesehen.

Die Sequenzierung nach Sanger weist die Mutation homozygot beim Indexpatienten und den beiden betroffenen Schwestern nach. Beide Eltern sind heterozygote Anlageträger der Veränderung.

Abbildung 3.5: Mutation in *ELP2* bei Patient 2333/07, Familie G017



Die Darstellung der genomischen Veränderung der einzelnen Familienmitglieder findet sich in Grafik 5.5 im Anhang.

3.1.6 Familie G026

Fünf Kopplungsintervalle können durch die Autozygotie-Analyse auf vier verschiedenen Chromosomen identifiziert werden, siehe Tabelle 3.11.

Chromosom	SNP Start-Marker	SNP End-Marker	Länge (Mbp)	LOD-Score
4	rs7654083	rs898088	7,84	2,4
7	rs2965408	rs1420422	15,46	2,4
14	rs802996	rs2747105	5,77	2,4
14	rs4900051	rs8017893	10,29	2,4
18	rs6506473	rs2299841	2,75	2,4

Tabelle 3.11: Kopplungsintervalle Familie G026

In den autozygoten Bereichen werden nach gezielter Anreicherung und NGS zwei Kandidatengene bei Patient 2256/07 identifiziert.

Gen	Mutation (hg19)	AS	PhyloP	PolyPhen	SIFT	LOGIT-Score
FAM126A	NC_000007.13: g.23017887C>G	splicesite	5.761	NA	NA	NA
ASB2	NC_000014.8: g.94404179C>T	p.A546T	0,462	b	t	-0,036026474

(AS) Aminosäure; (b) benign; (t) tolerated; (NA) not applicable

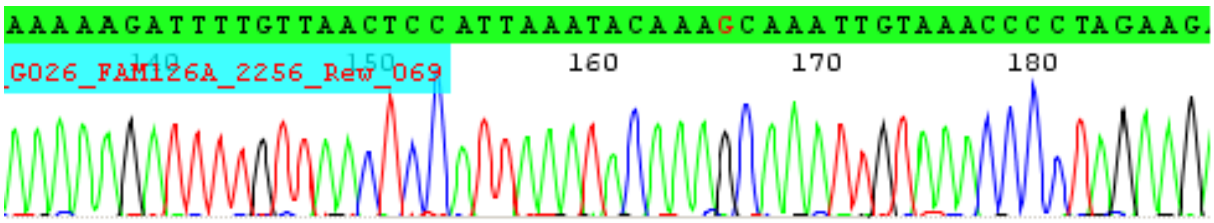
Tabelle 3.12: Kandidatengene Familie G026

Das Produkt von *ASB2* (ankyrin repeat and SOCS box containing 2) auf Chromosom 14q31-q32 ist ein zytoplasmatisches Protein von 587 Aminosäuren und eine Untereinheit der E3-Ubiquitin-Ligase. Bei der Ubiquitinierung handelt es sich um einen wichtigen Kontrollprozess für den Abbau nicht funktionstüchtiger Proteine. Als Teil der E3-Ubiquitin-Ligase vermittelt Ankyrin repeat and SOCS box protein 2 den Abbau fehlerhafter Proteine im Proteasom. Expressionsanalysen weisen auf das ubiquitäre Vorkommen in vielen Geweben hin. Bislang wurde keine Krankheitsassoziation für *ASB2* beschrieben.
FAM126A (Chr. 7p15.3) ist ein Gen, dessen Proteinprodukt Hyccein aus 521 Aminosäuren besteht und bei einem Molekulargewicht von 57625 Dalton in vielen Geweben exprimiert wird. Dabei wird die genaue zelluläre Lokalisation in der Literatur widersprüchlich angegeben; das Protein scheint sowohl in der Zellmembran wie auch im Zytoplasma vorzukommen. Es existieren zwei verschiedene Isoformen durch alternatives Splicing. Die Mutation befindet sich am 5´-Donor-Ende des Introns zwischen Exon 4 und Exon 5. Die veränderte Base ist die erste des betreffenden Introns und somit vermutlich wesentlich für die Interaktion zwischen Spliceosom und prä-mRNA. Eine Veränderung an dieser Stelle könnte zu verändertem Splicing und somit einer veränderten reifen mRNA führen, die als Vorlage für die Translation dient.

Mutationen in *FAM126A* sind beschrieben bei der autosomal-rezessiv vererbten hypomyelinisierenden Leukodystrophie. Klinische Merkmale dieser Erkrankung sind neben kongenitalem bilateralen Katarakt progressive neurologische Defizite wie Intelligenzminderung unterschiedlichen Schweregrades (HP:0001249), zerebelläre Dysfunktion (HP:0001317), Muskelschwäche (HP:000-

2460) und Muskelschwund (HP:0003202) in den unteren Extremitäten. Die phänotypische Ausprägung ist sehr variabel. Konstantes Merkmal in bildgebenden Verfahren ist die Hypomyelinisierung des peripheren wie zentralen Nervensystems (HP:0007182, HP:0006808) und Wasseranreicherung in der periventrikulären weißen Substanz des Gehirns (HP:0002518) [124, 125]. Die verminderte Expression des Gens im Darm steht möglicherweise in Verbindung mit einem gehäuften Auftreten kolorektaler Karzinome [126]. In den bisherig beschriebenen Fällen der Leukodystrophie wurde eine mildere Merkmalsausprägung bei Patienten mit einer missense-Mutation gegenüber jenen mit einer splice-site-Mutation beschrieben [124]. Der betreffende Pathomechanismus ist bis dato ungeklärt.

Abbildung 3.6: Mutation in *FAM126A* bei Patient 2256/07, Familie G026



Die Sequenzierung nach Sanger weist die Co-Segregation von Mutation und Phänotyp in der Familie nach. Die Darstellung der genomischen Veränderung der einzelnen Familienmitglieder findet sich in Grafik 5.6 auf Seite 80 im Anhang.

3.1.7 Familie G030

Die Autozygotie-Analyse ergab sieben Kopplungsintervalle auf drei verschiedenen Chromosomen:

Chromosom	SNP-Start-Marker	SNP-End-Marker	Länge (Mbp)	LOD-Score
1	rs2236856	rs1983822	1,98	1,93
1	rs4660821	rs9793263	1,58	1,93
1	rs3767616	rs11580961	1,79	1,5
1	rs1288491	rs17373091	3,62	1,93
4	rs6533603	rs6831554	8,94	1,93
4	rs10020165	rs9993460	2,75	1,93
17	rs17648225	rs9906342	5,98	1,93

Tabelle 3.13: Kopplungsintervalle Familie G030

In den autozygoten Bereichen wird nach gezielter Anreicherung und NGS nur ein Kandidatengen bei Patient 2658/09 gefunden.

LARP7 (La Ribonucleoprotein Domain Family, Member 7) liegt auf Chromosom 4q25. Sein Proteinprodukt ist als Chaperone im Zellkern an der korrekten Faltung von Proteinen in ihre Se-

Gen	Mutation (hg19)	AS	PhyloP	PolyPhen	SIFT	Logit-Score
LARP7	NC_000004.11:-g.113568536_-113568537insA	p.K276fs	2.710	NA	NA	NA

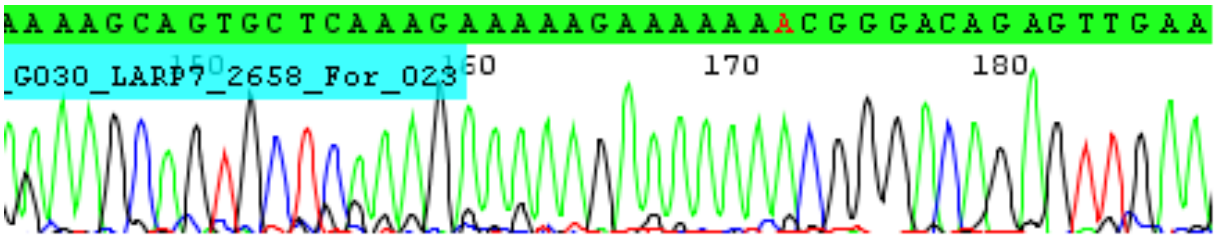
(AS) Aminosäure; (NA) not applicable

Tabelle 3.14: Kandidatengene Familie G030

kundärstruktur beteiligt. Das Protein umfasst 589 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66899 Dalton. Drei verschiedene Isoformen sind bekannt, ubiquitär exprimiert, im Besonderen im Gehirn.

Durch Sanger-Sequenzierung wurde die DNA der betroffenen Kinder, der Eltern und der gesunden Schwester untersucht. Die Eltern und die gesunde Tochter sind heterozygote Träger, die beiden betroffenen Kinder homozygote Träger der Mutation. Die in dieser Familie identifizierte homozygote Insertion der Base Adenosin in *LARP7* führt zu einer Verschiebung des Leserasters und in der Folge zu einer veränderten Aminosäuresequenz: Zwölf Basenpaare nach der Insertion von Adenosin führt die Verschiebung des Leserasters zu einem prämaturen Stop-Codon (TGA) in Exon 8 von 15. Die Aminosäuresequenz ist damit ab der Aminosäure 285 im Vergleich zum Wildtyp verändert und endet nach vier weiteren Aminosäuren auf Grund des Stopcodons an Stelle 289. Das Protein ist somit erheblich verkürzt.

Abbildung 3.7: Mutation in *LARP7* bei Patient 2658/09, Familie G030



Die weiteren Chromatogramme der Familie sind in der Grafik 5.7 auf Seite 81 hinterlegt. Dieser Befund wurde 2011 im Rahmen der Arbeit von Najmabadi et al. als tentativ veröffentlicht [35]. Alazami et al. berichteten 2012 von einer großen Saudi-Arabischen Familie, deren Angehörige von Kleinwuchs (HP:0004322), Intelligenzminderung (HP:0001249) und fazialer Dysmorphie (HP:0001999) betroffen waren. Bei den Betroffenen wurde eine Loss-of-function-Mutation in *LARP7* identifiziert [127]. Mittlerweile gilt *LARP7* als etabliertes Krankheitsgen (OMIM *612026).

3.1.8 Kontroll-Screening für neu identifizierte Krankheitsgene der Intelligenzminderung

Es wurde das sporadische Vorkommen der gefundenen Mutationen mittels Sequenzierung bei gesunden Kontroll-Individuen, circa 50 Personen, ausgeschlossen.

Familie	Gen	Mutation	Chromosomen	ethnisch angeglichen
G001	*C12orf57*	NC_000012.11:-g.7053285A>G	112	64
G002	*HIST3H3*	NC_000001.10:-g.228612639G>A	110	38
G015	*RABL6*	NC_000009.11:-g.139733864G>C	102	60
G017	*ELP2*	NC_000018.9:-g.33739953A>C	110	60
G030	*LARP7*	NC_000004.11:-g.113568536_11356-8537insA	100	52

Tabelle 3.15: Kontroll-Screening in gesunder Population

3.2 Kranioektodermale Dysplasie

Die Sequenzierung der Gene *WDR35* und *IFT43*, wie eingangs (Kapitel 2.1.2) erläutert, führte zur Feststellung ursächlicher Mutationen in *WDR35* bei zwei Patientinnen. Die beschriebenen Mutationen wurden bei 300 Kontroll-Chromosomen europäischer Herkunft ausgeschlossen.

Patient	*WDR35*		*IFT43*
	mRNA	Protein	mRNA
2191	c.2912A>G	p.Y971C	opB
2238	opB		opB
2561	c.504T>A; c.1922T>G	p.S168R; p.L641X	opB
2792	opB		opB
2875	opB		opB
3059	opB		opB
3062	opB		opB
3063	opB		opB
3065	opB		opB

(opB) ohne pathologischen Befund

Tabelle 3.16: Ergebnisse der genetischen Untersuchung im Kollektiv der CED-Patienten

3.2.1 *WDR35*

WDR35 liegt auf dem Minus-Strang von Chromosom 2p24.1 und umfasst 28 Exons. Sein Proteinprodukt umfasst 1181 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 133547 Dalton. Durch alternatives Splicing sind drei verschiedene Isoformen bekannt. Das Proteinprodukt interagiert als Teil von IFT-A mit IFT43. Gilissen et al. identifizierten 2010 compound-heterozygote Mutatio-

nen bei zwei Patienten mit CED [68]. Ihre Untersuchungen mit den Modellorganismen Drosophila melanogaster und Caenorhabditis elegans erwiesen die Lokalisation von WDR35 in Zilien. Veränderungen in *WDR35* wurden mit einem gestörten retrograden Transport in Zilien assoziiert. Mill et al. 2011 postulierten zudem eine Störung der Ziliogenese durch eine Mutation in *WDR35*. Durch Sequenzierung des Gens *WDR35* nach Sanger wurden bei zwei Patientinnen insgesamt drei neue Mutationen gefunden. Die Analyse bei den restlichen Patienten ergab keine pathologischen Befunde. Die Pathogenitätsanalyse bestätigt die krankheitsverursachende Potenz bei zwei der drei identifizierten Mutationen. Bei einer nonsense-Mutation kann eine solche Analyse nicht durchgeführt werden, siehe Kapitel 2.3.2.

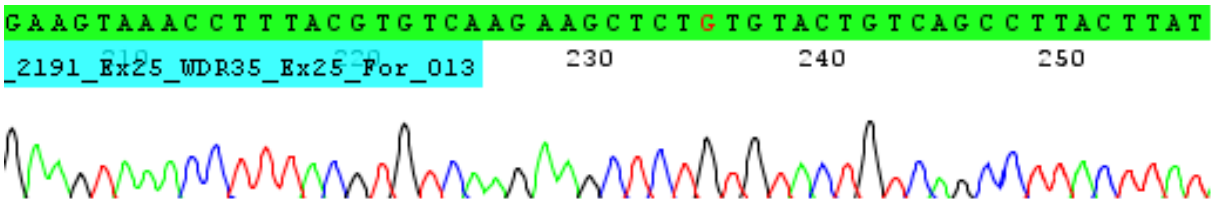
Patient	**Mutation**	**AS**	**PhyloP**	**PolyPhen**	**SIFT**	**Logit-Score**
2191/07	NC_000002.11: g.20131115T>C	p.Y971C	4,636	po d	t	5,51
2561/08	NC_000002.11: g.20175357A>T	p.S168R	0,28	b	d	3,025
2561/08	NC_000002.11: g.20141557T>G	p.L641X	NA	NA	NA	NA

(AS) Aminosäure; (po) possibly; (d) damaging; (t) tolerated; (b) benign; (NA) not applicable

Tabelle 3.17: Mutationen in *WDR35*

Bei Patientin 2191/07 konnte eine homozygote missense-Mutation in Exon 25 (c.2912A>G [p.Y971C]) ausgemacht werden. Die Aminosäure Tyrosin in der Position 971 des Proteins ist evolutionär hochgradig konserviert. Die Mutation wurde bei beiden Eltern (Vater 3172, Mutter 3173) jeweils in heterozygoter Form nachgewiesen.

Abbildung 3.8: Mutation in *WDR35*, Exon 25, Patientin 2191/07



Bei Patientin 2561/08 wurden zwei unterschiedliche heterozygote Veränderungen in *WDR35* gefunden (Compound-Heterozygotie): eine heterozygote missense-Mutation in Exon 6 (c.504T>A [p.S168R]) sowie eine heterozygote nonsense-Mutation in Exon 18 (c.1922T>G [p.L641X]). Die Aminosäure Serin der Position 168 ist eine evolutionär hoch konservierte Aminosäure. Die Analyse der Eltern erwies die Stop-Mutation als paternalen (2563) und die missense-Mutation als maternalen Ursprungs (2562). Die biparentale Vererbung der vermutlich pathologischen Mutationen schließt eine Lage auf demselben Chromosom (cis) sicher aus; dies bestätigt die eingangs vermutete Compound-Heterozygotie.

Abbildung 3.9: Mutation in *WDR35*, Exon 6, Patientin 2561/08

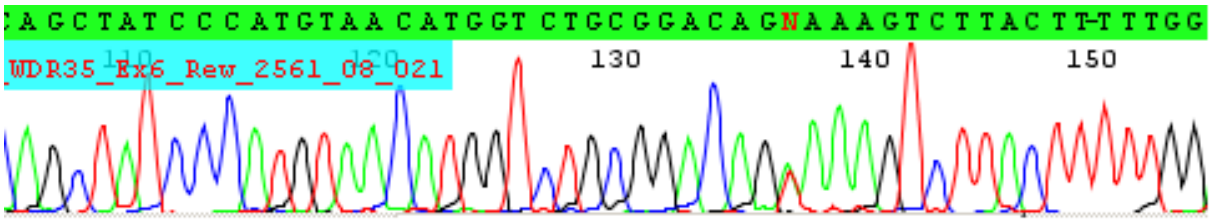
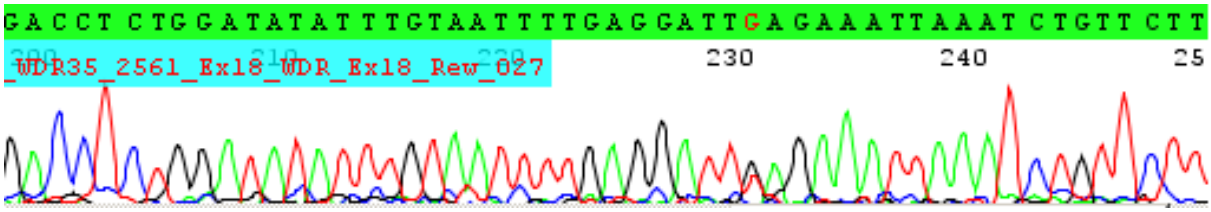


Abbildung 3.10: Mutation in *WDR35*, Exon 18, Patientin 2561/08



3.2.2 *IFT43*

IFT43 liegt auf Chromosom 14q24.3 und besteht aus 10 Exons. Das Proteinprodukt umfasst 208 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 23529 Dalton und bildet eine Untereinheit des ziliaren Proteinkomplexes IFT-A, welcher den retrograden Transport von der Zilienspitze zur Basis gewährleistet [66]. IFT43 interagiert hierbei mit WDR35 und IFT140. Arts et al., 2011, identifizierten bei zwei an Kranioektodermaler Dysplasie Erkrankten eine Mutation im Startcodon von *IFT43* (p.M1V). Bei keinem der neun Patienten aus dem Kollektiv wurden eine Veränderungen im genetischen Code von *IFT43* gefunden. Eine für die Erkrankung ursächliche Mutation in diesem Gen kann daher bei den Patienten dieser Studie ausgeschlossen werden.

Kapitel 4

Diskussion

In dieser Arbeit werden die genetischen Ursachen zweier unterschiedlicher autosomal-rezessiv vererbter Krankheitsbilder untersucht und vorgestellt. Bei der Intelligenzminderung handelt es sich um die häufigste Ursache für die Konsultation einer genetischen Beratung, wobei in dieser Arbeit nicht-syndromale Intelligenzminderung bei Kindern konsanguiner Paare untersucht wurde.
Bei der zweiten untersuchten genetischen Erkrankung handelt sich mit der Kranioektodermalen Dysplasie um ein seltenes Syndrom aus der Gruppe der Ziliopathien, welches mit skeletalen und ektodermalen Anomalien einhergeht und weitere Organsysteme betrifft, wobei die Nephropathie meist zu einem schweren Verlauf führt.
Die beiden Krankheitsbilder haben vermeintlich durch die autosomal-rezessive Vererbung viel gemein, erfordern aber auf Grund der beschriebenen Hintergründe unterschiedliche Herangehensweisen in der molekulargenetischen Diagnostik. Diesem Umstand wurde in dieser Arbeit Rechnung getragen: Zum einen wurden auf Basis von parametrischer Kopplungsanalyse, bioinformatischer Analyse, Exom-Anreicherung und Hochdurchsatzsequenzierung neue Krankheitsgene für die Intelligenzminderung identifiziert. Zum anderen konnten durch die gezielte Sequenzierung zweier Kandidatengene, *WDR35* und *IFT43*, neue ursächliche Mutationen der Kranioektodermalen Dysplasie beschrieben werden.

4.1 Nutzen einer genetischen Diagnostik

Kritiker der genetischen Diagnostik und klinisch Tätige, die nach der Festlegung auf eine klinische Diagnose die Notwendigkeit einer weitergehenden Diagnostik in Frage stellen, begründen ihre Bedenken vielfältig: Eine genetische Diagnostik sei für Eltern und Kind psychisch belastend, zeitlich und finanziell aufwendig und von fraglichem Nutzen - man habe die Diagnose ja bereits klinisch bestätigen können!
Soweit diese Argumente auch zutreffen, eine genetisch gesicherte Diagnose bietet mannigfaltigen Nutzen, welche eine Diagnostik rechtfertigt: Erbkrankheiten sind in besonderem Maße für die Betroffenen schwerwiegend, da sie meist bereits im Kindesalter manifest werden. Nicht wenige Eltern fühlen sich schuldig, ihrem Kind eine solche Last auferlegt zu haben. Die Klärung der genauen genetischen Ursache kann die Situation in betroffenen Familien sehr entlasten: Psychologische Studien weisen darauf hin, dass die Klarheit über Diagnose und der damit verbundenen Prognose eine verbesserte Verarbeitung der kindlichen Erkrankung bei den Eltern bewirken kann.

Auch die Vernetzung in Selbsthilfegruppen kann bei besonders seltenen Leiden durch den Erfahrungsaustausch mit anderen Betroffenen seelisch heilsam und hilfreich sein [128]. Die meist langwierige diagnostischen Odyssee, welche ausgehend vom Kinderarzt meist zur Weiterverweisung an spezialisierte Humangenetiker führt, bildgebende Diagnostik, Blutentnahmen und zum Teil invasive Diagnostik nach sich zieht, kann durch eine genetische Diagnose beendet werden. Aus klinischer Erfahrung scheint auch die amtliche Beantragung von Unterstützung in Form von Therapie, Haushaltshilfe oder finanzieller Art durch die Angabe einer genetisch gesicherten Diagnose erleichtert zu sein.
Gerade bei Intelligenzminderung spannt sich ein weites Feld der möglichen genetischen Ätiologie und damit verbundenen Komplikationen auf: Im Rahmen einer syndromalen Erkrankung können die für die jeweilige Entität im Verlauf zu erwartenden Komplikationen frühzeitig erkannt und therapiert werden. Die Unkenntnis des zu erwartenden Krankheitsverlaufs hingegen kann zu Verzögerung und Fehlbehandlung führen. So leiden Kinder mit dem Prader-Willi-Syndrom als Säuglinge an Trinkschwäche, die später jedoch in eine Hyperphagie und daraus resultierend eine Adipositas umschlagen kann. Eine unter diesen Gesichtspunkten frühe adäquate Ernährungsberatung der Eltern kann den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen und belegt beispielhaft die Bedeutung einer frühzeitigen genetischen Diagnostik [129].
Weiterhin wünschen viele Paare eine präzise Angabe des Wiederholungsrisikos und können bei Kenntnis des genauen Risikos möglicherweise eine neue Schwangerschaft planen und ihren Kinderwunsch verwirklichen. Auf Grund der Möglichkeit der Entnahme fetaler Zellen aus dem Chorion oder der Amnionflüssigkeit können bereits in der Frühschwangerschaft valide Aussagen über das fetale Genom und damit eine mögliche Erkrankung des Embryos oder Feten getroffen werden. Das Risiko für eine Fehlgeburt wurde in früheren Studien mit 0,58% (Amniozentese) angegeben [130]. Diese Zahl wird in der genetischen Beratung häufig angeführt. Eine Studie von Akolekar et al. aus dem Jahr 2014 schätzt das Risiko einer Fehlgeburt bei Durchführung durch einen Facharzt jedoch deutlich niedriger ein, nämlich bei 0,11% nach Amniozentese und 0,22% nach Chorionzottenbiopsie [131]. Dieses Risiko und welche Konsequenzen ein Paar aus dem Ergebnis der Diagnostik ziehen würde, sollten zuvor in einer ausführlichen genetischen Beratung besprochen werden. Kitzman et al. zeigten 2012 neue Wege in der umfassenden pränatalen Genom-Analyse auf, indem es ihnen gelang, das Genom eines Feten in der 19. Schwangerschaftswoche nahezu umfassend aus elterlichen Proben zu entschlüsseln, die dem maternalen Plasma und dem paternalen Speichel entnommen wurden [132]. Eine solche nicht-invasive und für den Feten ungefährliche Diagnostik könnte die Häufigkeit der Inanspruchnahme pränataler Gendiagnostik erhöhen. Bei Kenntnis der ursächlichen genetischen Mutation können auch gesunde Angehörige und Kinder erfahren, ob sie Träger der Mutation sind oder aber frei von einer belastenden, potentiell krankheitsverursachenden, Veränderung.

4.2 Genetik der Intelligenzminderung

In der konsanguinen saudischen Familie G001 wurde bei den vier von Intelligenzminderung (HP: 0001249) betroffenen Kindern nach Kopplungsanalyse nur ein Kandidatengen in den beiden Kopplungsintervallen auf Chromosom 12 und 20 identifiziert. In *C12orf57* wurde eine Mutation des Startcodons gefunden (c.1A>G [p.M1V]). Die Mutation segregiert mit der Erkrankung. Die beschriebene Mutation ist ursächlich für das Temtamy-Syndrom, welches mit Augenfehlbildungen (HP:0000478), Corpus callosum-Agenesie (HP:0001274), leichter Intelligenzminderung (HP:0001256), Aortendilatation (HP:0001724) und kraniofazialer Dysmorphie (HP:0001999) einhergeht. Die Geschwister der Familie G001 zeigen neben der Intelligenzminderung (HP:0001249) bei zielgerichteter Diagnostik eine Mehrzahl der genannten Symptome. Der gesunde Bruder der Betroffenen ist heterozygoter Anlageträger der Mutation.
In der aus dem Omam stammenden Familie G002 sind vier Kinder von Intelligenzminderung (HP:0001249) betroffen. Die Kopplungsanalyse ergab ein autozygotes Intervall auf Chromosom 1. Hier fanden sich drei Kandidatengene: *OBSCN*, *TRIM17* und *HIST3H3*. Die beschriebenen Veränderungen in *OBSCN* (c.10115C>T [p.A3372V]) und *TRIM17* (p.G326V) werden nicht als krankheitsverursachend betrachtet. Auf Grund seiner Proteinfunktion und der Pathogenitäts-Analysen, siehe Tabelle 3.4, S.50, ist die Mutation in *HIST3H3* (c.388C>T [p.R130C]) als pathogen und ursächlich anzusehen. Die Mutation segregiert mit der Erkrankung. Der gesunde Sohn der Familie ist kein Träger der Mutation.
Die iranisch-stämmige Familie G008 hat zwei Töchter, die von Intelligenzminderung (HP:0001249), Ataxie (HP:0001251), Kleinwuchs (HP:0004322), Strabismus divergens (HP:0000577) und fazialen Dysmorphien (HP:0000369, HP:0000445) betroffen sind. Die Kopplungsanalyse ergibt zwei Kopplungsintervalle auf Chromosom 9 und 12. Von den Kandidatengenen *GLT6D1*, *RALGDS*, *NCOR2* und *SURF1* konnte letzteres auf Grund der Pathogenitäts-Analyse als krankheitsverursachend identifiziert werden. Die Mutationen in *GLT6D1* (c.427T>G [p.W143G]), *RALGDS* (c.586G>A [p.A196T]) und *NCOR2* (c.2036C>T [p.A679V]) konnten auf Grund der Prädiktionsinstrumente als pathogene Verursacher der Erkrankung ausgeschlossen werden. Die Veränderung in *SURF1* (c.679T>C [p.W227R]) verursacht das Leigh-Syndrom, eine Mitochondriopathie, deren symptomatisches Spektrum unter anderem Intelligenzminderung (HP:0001249) aber auch Krampfanfälle (HP:0001250) und Augenmuskelparesen (HP:0000597) umfasst. Die hier beschriebene Mutation führt auf Proteinebene zum Austausch der Aminosäure Tryptophan zu Arginin. Die Mutation in *SURF1* segregiert mit der Erkrankung.
In der Familie G015, die aus Pakistan stammt, sind vier der sechs Kinder von Intelligenzminderung (HP:0001249), fazialer Dysmorphie (HP:0001999) und muskulärer Hypotonie (HP:0001352) betroffen. In dem einzigen Kopplungsintervall auf Chromosom 9 finden sich sechs Kandidatengene: *SLC34A3* (c.632G>A [p.S211N]), *RABL6* (c.1687G>C [p.A563P]), *INPP5E* (c.1763A>G [p.Y588C]), *SEC16A* (c.542G>A [p.G181E]), *CACNA1B* (c.3673A>G [p.I1225V]) und *PMPCA* (c.1425A>T [p.E475D]). Die Instrumente zur Prädiktion der Pathogenität weisen auf *RABL6*,

c.1687G>C, als krankheitsverursachende Mutation hin. Die Mutation segregiert mit der Erkrankung. Veränderungen in *INPP5E* wurden bislang mit dem Joubert-Syndrom in Verbindung gebracht. Inwiefern tatsächlich Veränderungen in *RABL6* oder aber *INPP5E* in diesem Fall für den beschriebenen Phänotyp verantwortlich sind, bleibt offen.
Die libanesischstämmige Familie G017 hat drei Kinder, die alle von Intelligenzminderung (HP:0001249) und Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) betroffen sind. Die Kopplungsanalyse ergibt fünf Intervalle, hierunter werden drei Kandidatengene bei der Sequenzierung mit Veränderungen identifiziert: *LAMA3* (c.8069A>G [p.Q2690R]), *ATP13A2* (c.1744G>A [p.G582S]) und *ELP2* (c.1858A>C [p.T620P]). Die genetische Mutation in *ELP2* führt auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Prolin. Die Pathogenitäts-Analysen der Mutation wie auch die Proteinfunktion weisen auf die Veränderung in *ELP2* als krankheitsverursachend hin. Die Mutation segregiert in der Familie mit der Erkrankung.
Die Berliner Familie G026 hat drei Kinder, von denen zwei von Intelligenzminderung (HP:0001249), kongenitalem Katarakt (HP:0000519) und verzögerter neuronaler Myelinisierung (HP:0012448) betroffen sind. Die Kopplungsanalyse ergibt fünf Kopplungsintervalle und in diesen zwei genomische Veränderungen: Eine splice-site Mutation in *FAM126A* (chr7:23017887C>G) sowie eine missense-Veränderung in *ASB2* (c.1636G>A [p.A546T]). Die splice-site Mutation im Sinne eines Austausches der Base Cytosin durch Guanin segregiert in der Familie mit der Erkrankung. Splice-site Mutationen in *FAM126A* wurden bereits bei der autosomal-rezessiv vererbten hypomyelinisierenden Leukodystrophie beschrieben (OMIM #610532, *610531). Die Erkrankung führt durch eine progressive Demyelinisierung (HP:0007305) zu einer Intelligenzminderung (HP:0006887). Weitere klinische Merkmale der Erkrankung sind neben kongenitalem bilateralen Katarakt (HP:0000519) progressive neurologische Defizite (HP:0002344) wie zerebelläre Dysfunktion (HP:0001317), Muskelschwäche (HP:0002460) und Muskelschwund (HP:0003202) in den unteren Extremitäten. Die letztgenannten Symptome wurden bei der hier vorgestellten Familie nicht beobachtet. Die Symptomatik scheint daher einer milden Form der hypomyeliniserenden Leukodystrophie zu entsprechen.
In der türkischstämmigen Familie G030 leiden zwei der drei Kinder an Intelligenzminderung (HP:0001249) und Mikrozephalie (HP:0000252). Die Kopplungsanalyse ergibt sieben Kopplungsintervalle und die nachfolgende Sequenzierung darin das einzige Kandidatengen *LARP7*. Die homozygote Insertion chr4:113568536_113568537insA (K276fs) segregiert mit der Erkrankung. Beide Eltern sind heterozygote Träger der Veränderung. Die Insertion der Base Adenosin in *LARP7* führt zu einer Verschiebung des Leserasters und in der Folge zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Es wurde bis dato in einer weiteren Familie eine loss-of-function Mutation in *LARP7* identifiziert, die klinisch zu Kleinwuchs (HP:0004322), Intelligenzminderung (HP:0001249) und fazialer Dysmorphie (HP:0001999) führte [127].

4.2.1 Kritische Betrachtung zur Methodenwahl

Die gewählte Methodik zur Identifizierung molekularer Ursachen der autosomal-rezessiv vererbten Intelligenzminderung hat ihre Schwachstelle in der Detektion compound-heterozygoter und anderer Mutationsformen. Durch die Konzentration auf konsanguine Paare und die damit verbundene Fokussierung auf autozygote "identical by descent"-Mutationen, werden compound-heterozygote Mutationen durch eine Exom-Analyse nicht erfasst. Bei konsanguinen Eheleuten mit mutmaßlich autosomal-rezessiv vererbter Erkrankung der Kinder von einer von einem Vorfahren ererbten Mutation auszugehen, ist logisch, schließt jedoch von vorneherein eine Reihe möglicher weiterer Mutationen aus. Durch die vorherige Kopplungsanalyse wurde in jeder Familie nur ein begrenzter Bereich des gesamten Genoms untersucht. Auch Mutationen in verschiedenen Genen, die im Zusammenspiel vielleicht eine Veränderung in einem Proteinkomplex oder bei der Signaltransduktion verursachen könnten, können somit nicht beachtet werden.
Es ist ein Anliegen dieser Arbeit zu zeigen, dass die Grenze zwischen syndromalen und nichtsyndromalen Formen der Intelligenzminderung unscharf ist. Aus Mangel an einer allgemein akzeptierten Definition und Abgrenzung zwischen beiden Formen ist es schwierig, nach klinischer Untersuchung eine valide Diagnose zu stellen. Bestimmte Diagnosekriterien können nur durch sehr spezifische Untersuchungen, wie das MRT, überhaupt erkannt und nur von erfahrenen Diagnostikern auch als pathologisch identifiziert werden. Die Kriterien für die Abgrenzung syndromaler von nicht-syndromaler Intelligenzminderung sind unscharf, sodass selbst bei Erkennen vermeintlich geringfügiger Dysmorphien die Einordnung in einer der beiden Gruppen schwer fallen kann. Kleefstra und Hamel postulieren, dass spezifische Merkmale häufig erst im Vergleich mehrerer Individuen als solche erkannt werden können [133].
Viele der in dieser Arbeit vorgestellten krankheitsverursachenden Gene wurden später von anderen Autoren syndromalen Formen der Intelligenzminderung zugeordnet. Eine interessante und richtungsweisende Interpretation dieses vermeintlichen Widerspruchs bietet die Publikation des FORGE Canada Consortium [134]: Das Konsortium untersuchte die genetischen Ursachen von 264 Erkrankungen mutmaßlich genetischer Genese und identifizierte hierbei 67 neue krankheitsverursachende Gene. Als ein Ergebnis des Projekts nennen die Autoren die unterschiedliche phänotypische Ausprägung einer einzelnen Mutation eines Genes. Dass ein und dieselbe Mutation zu höchst unterschiedlichen Phänotypen führen kann, scheint sich auch in der hier vorgelegten Arbeit zu bestätigen. Die Mutation in Familie G001 in *C12orf57*, p.M1V, wurde beispielsweise mehrfach dem Temtamy-Syndrom zugeordnet (OMIM #218340, *615140). Wie bereits in der Literatur [104, 105, 82, 106, 102] beschrieben, wird hier deutlich, dass einige wichtige Merkmale der Erkrankung, wie zum Beispiel die Agenesie des Corpus callosum (HP:0001274), trotz des identischen Genotyps nicht bei allen Betroffenen nachzuweisen sind. Es existieren also nichtsyndromale Phänotypen als eine Ausprägungsform einer eigentlich syndromalen Erkrankung. So sind auch die Neuzuordnungen zu erklären, die nach der Publikation der vorliegenden Fälle vorgenommen wurden [35].

Insofern ist diese Arbeit ein Beispiel über die phänotypische Variabilität der zugrunde liegenden Genetik. Die Erkenntnis, dass auch eine monogene Erkrankung zu einem variablen Spektrum von Symptomen führen kann, ist eine der wichtigsten dieser Arbeit unter Berücksichtigung der beschriebenen Literatur. Ob eine Regulation auf epigenetischer Ebene für dieses Phänomen verantwortlich ist oder ob andere genetische Veränderungen zusätzlich eine Rolle spielen, bleibt zukünftig zu untersuchen.
Die Forscher des FORGE Canada Consortium konnten außerdem zeigen, dass ein bestimmter Phänotyp im Sinne einer syndromalen Erkrankung durch die Kombination mehrerer seltener genetischer Defekte bedingt sein kann. Beispiel hierfür ist das von den Namensgebern Fitzsimmons und Guilbert 1987 erstmals publizierte Syndrom: Sie beschrieben monozygote Zwillinge, welche beide an spastischer Paraplegie (HP:0001258), leichter Intelligenzminderung (HP:0001256), Dysarthrie (HP:0001260) und Brachydaktylie (HP:0001156) litten [135]. Weitere Autoren berichteten von Fällen mit identischem Phänotyp [136, 137, 138]. Das Konsortium konnte nun nachweisen, dass das Fitzsimmons-Guilbert Syndrom auf einer Kombination verschiedener genetischer Mutationen beruht. Ein ursprünglich als monogene Erkrankung beschriebenes Syndrom kann also durch die Kombination mehrerer seltener Mutationen bedingt sein. Dieses Phänomen ist möglicherweise ein Grund, weshalb einige seltene genetische Erkrankungen bis dato in ihrer Genese unerforscht sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen weiteren Hinweis auf die genetische Heterogenität der autosomal-rezessiv vererbten Form der Intelligenzminderung. Jedoch zeigt diese Arbeit auch, dass die subjektive Beurteilung von syndromalen und nicht-syndromalen Formen der Erkrankung schon auf Grund der unscharfen Definition anfällig für Fehlinterpretationen ist.

4.3 Kranioektodermale Dysplasie

Bei Patientin 2191 wurde in *WDR35* die homozygote missense-Veränderung in (c.2912A>G-[p.Y971C]) identifiziert. Bei der Patientin 2561 können zwei Mutationen in *WDR35* in dieser Arbeit beschrieben werden: c.504T>A [p.S168R] und c.1922T>G [p.L641X]. Die beiden Patientinnen zählen damit zu den 18 bisher bekannten Patienten mit Sensenbrenner-Syndrom, deren genetische Ursache geklärt ist. Auf Grund der in der Datenbank OMIM vorgenommenen molekularen Einteilung zählen die zwei Patientinnen mit Mutationen in *WDR35* somit zum Typ 2 der Kranioektodermalen Dysplasie (CED 2). Die tabellarische Darstellung in Tabelle 4.1 bezieht sich auf eine gekürzte Fassung der Clinical synopsis aus OMIM.

Merkmal (OMIM)	**HP**	**CED 1** *IFT122*	**CED 2** *WDR35*	**CED3** *IFT43*	**CED 4** *WDR19*	**2191** *WDR35*	**2561** *WDR35*
Intelligenzminderung	0001249	-	-			+	+
Kleinwuchs	0011405	-	+	+	+	+	+
Verzögerte psycho-mot. Entwicklung	0001263					+	+

Merkmal (OMIM)	HP	CED 1	CED 2	CED 3	CED 4	2191	2561
Kopf							
Dolichozephalie	0000268	+	+		-	+	+
Vorgewölbte Stirn	0002007	+	+	(+)	(+)	+	+
Tief sitzende Ohren	0000369	-	+			+	+
Volle Wangen	0000293	+			(+)		+
Telekanthus	0000506	-	+	(+)		+	+
Ptosis	0000508		((+))			+	-
Blepharophimose	0000581	-	+		-		+
Nystagmus	0000639	((+))				-	+
Hypertelorismus	0000316	-	+		-	+	+
Strabismus	0000486		((+))			-	+
Retinitis pigmentosa	0000510				+	-	-
Evert. Unterlippe	0000232	+	+	(+)		+	-
Hoher Gaumen	0000218	+				+	-
Mikrodontie	0000691	+	+	+		+	+
Weit ausseinanderstehende Zähne	0000687	+	+	+		+	+
Mikrognathie	0000347	-	((+))	(+)	-	+	+
Kurzer Hals	0000470	-	+			+	+
Thorax & Abdomen							
Rez. Pneumonie	0006532	-			+	+	-
Enger Brustkorb	0000774	+	+	+	+	+	+
Trichterbrust	0000767	+	+	-	+	+	+
Kurze Rippen	0000773	+			+	+	
Leberzysten	0001407	+	-	-	-	-	+
Nierenversagen	0003774	+		(+)	(+)	+	+
Tubulointerst. Nephropathie	0001970	+	-	+	+		
Skelett							
Dehnbare Gelenke	0001388	+	+	+	+	+	+
Kraniosynostose	0001363	+	+	(+)	(+)	+	+
Rhizomelie	0008905	+	+	+	-	+	+
Brachydaktylie	0001156	+	+	+	+	+	+
Syndaktylie (Zehen)	0010621	-	-	+	-	-	-
Syndaktylie (Finger)	0010554	-	+	+	+	+	+
Triphalangie Hallux	0001780	-	-	-	-	+	-
Haut, Nagel, Haar							
Kurze Nägel	0001799	+		+	-	+	

Merkmal (OMIM)	HP	CED 1	CED 2	CED 3	CED 4	2191	2561
Wenig feines Haar	0008070	+	+	+	-	+	+

Tabelle 4.1: Merkmale der CED

Es gilt zu beachten, dass die hier genutzte OMIM-Nomenklatur die Kranioektodermale Dysplasie nach den zugrunde liegenden molekulargenetischen Ursachen einteilt. Da lediglich in 18 der beschriebenen 42 Fälle genetische Mutationen nachgewiesen sind und die oben angeführte Einteilung daher weniger als die Hälfte der bekannten Patienten repräsentiert, ist die Aussagekraft eingeschränkt. Die Aufklärung der genetischen Ursachen der meisten bisher beschriebenen Patienten ist wohl nicht mehr möglich, da ihre Beschreibung in der Ära vor Einsetzen der molekulargenetischen Diagnostik erfolgte und die frühe Mortalität der Erkrankung eine nachträgliche Untersuchung verhindert. Für eine Überprüfung der Genotyp-Phänotyp-Beziehung ist die oben genannte Klassifikation jedoch sinnvoll. Die Merkmale eines Patienten, bei dem weitere compound-heterozygote Mutationen in *WDR35* festgestellt wurden sind in dieser Übersicht der Kranioektodermalen Dysplasie Typ 2 noch nicht enthalten, da der Fall nach der letzten Aktualisierung der Datenbank beschrieben wurde [45]. Die dort genannten Veränderungen in *WDR35* (c.3091C>T [p.H1031Y] und c.3203A>G [p.Y.1068C]) führen zu phänotypischen Überschneidungen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Patientinnen: Eine globale Entwicklungsverzögerung (HP:0001263) und die Erweiterung zerebraler Ventrikel (HP:0002119) sind in der OMIM-Klassifikation nicht aufgeführt, treten aber bei den in dieser Arbeit beschriebenen Fällen und den Patienten der Publikation auf. Im Alter von sechs Monaten zeigte der beschriebene Patient zudem einen Hypertonus (HP:0000822) sowie sonographisch hyperechogene Nieren (HP:0004719), was auf eine Nierenbeteiligung schließen lässt und somit der CED Typ 2 ein weiteres bisher nicht beschriebenes Merkmal hinzufügen würde [45].
Die Beschreibung eines familiären Falles des Sensenbrenner-Syndroms mit Mutationen in *IFT122* ergänzt die Merkmale der CED 1 um Intelligenzminderung (HP:0001249), rezidivierende pulmonale Infekte (HP:0006532) und überdehnbare schlaffe Haut (Cutis laxia, HP:0000973) [64]. Die genannten Merkmale wurden bisher nur bei anderen Subtypen der CED beobachtet. Es wird erneut deutlich, dass eine klare Unterteilung nach den klinischen Merkmalen nicht sicher möglich ist.
Die Überschneidungen zu anderen Ziliopathien betreffen zum einen die genetischen Ursachen (siehe Tabelle 1.5, S.13), zum anderen die klinischen Merkmale. Vergleicht man die klinischen Merkmale der Patienten mit Kranioektodermaler Dysplasie mit jenen anderer Ziliopathien, zeigen sich Alleinstellungsmerkmale der CED aber auch Gemeinsamkeiten. Alleinig Patienten mit Kranioektodermaler Dysplasie haben eine für das Syndrom typische Fazies mit vorgewölbter Stirn (HP:0002007), Dolichozephalie (HP:0000268), sagitaler Kraniosynostose (HP:0004442), wenig feinem Haar (HP:0008070) und hypoplastischen, weit auseinander stehenden Zähnen (HP:0000687, HP:0000691). Unter den charakteristischen weiteren Merkmalen der CED finden sich einige auch bei anderen Ziliopathien: enger Thorax (HP:0000774; ATD-J, MSS, SRPS, EVC), kurze Fingernä-

gel ((HP:0001799; EVC), überdehnbare Gelenke (HP:0001388; EVC), Brachydaktylie (HP:0001156; ATD-J, MSS, EVC), Nierenbeteiligung (HP:0000077; ATD-J, MSS, SRPS u.a.), Leberbeteiligung (HP:0001392); ATD-J, MSS, MKS, EVS u.a.) und retinale Dystrophie (HP:0000556; ATD-J, MSS, u.a.). Lin et al., 2013, regen darüber hinaus eine Neuzuordnung einer Patientin an, bei der eine ATD-J diagnostiziert wurde und die auf Grund ihrer typischen Merkmale der Kranioektodermalen Dysplasie hätte zugeordnet werden müssen [45]. Es scheint, als würde über die steigende Zahl an Patienten auch allmählich ein klareres Bild über die phänotypischen Konsequenzen genetischer Veränderungen entstehen. Eine schärfere Abgrenzung zwischen den Unterformen der Ziliopathien wird zukünftig dadurch möglich sein; möglicherweise müssen jedoch auch die Grenzen zwischen den Syndromen neu gezogen werden.
Wie einleitend beschrieben sind Mutationen in *WDR35* auch bei dem Kurzrippen-Polydaktylie-Syndrom Typ VII beschrieben (OMIM #614091) [69]: eine homozygote Deletion in Exon 5 von *WDR35* bei einem Geschwisterpaar sowie eine compound-heterozygote missense- und nonsense-Mutation bei einem anderen unabhängigen Patienten. Die heterogene Gruppe der SRPS zeigt unter den Ziliopathien einen besonders ungünstigen Verlauf und Phänotypen hoher Morbidität: skeletale Anomalien und Anomalien verschiedenster Organsysteme wie dem Gehirn und kardiovaskulären System mit hoher Mortalität. Die klinischen Unterschiede zwischen den Betroffenen könnten von einer unterschiedlichen Störung der ziliären Struktur und Funktion herrühren [69]. Spekulieren kann man, ob Deletionen oder non-sense Mutationen auf die besondere Schwere der Merkmale Einfluss haben; der hier vorgestellte Fall der Patientin 2561, die ebenfalls eine compound-heterozygote missense- und nonsense-Mutation trägt, spricht jedoch dagegen.
Die fortschreitende Aufklärung der genetischen Ursachen der CED kann in betroffenen Familien bei bekannter Mutation eine genetische Pränataldiagnostik ermöglichen. Eine frühe sonographische Diagnostik in der Schwangerschaft erscheint nicht möglich, da bei der Beobachtung der Schwangerschaft mit einem erkrankten Kind erst ab der 27. Schwangerschaftswoche Auffälligkeiten im Sinne disproportionierten Wachstums festgestellt werden konnten [50]. Andere Autoren weisen auf Veränderungen in der Fruchtwassermenge hin (Oligo- oder Polyhydramnion) sowie auf verkürzte Extremitäten, die in der Feindiagnostik im zweiten Trimenon festgestellt werden könnten [139]. Eine tragfähige pränatale Diagnose sollte daher einen genetischen Befund einschließen.

4.4 Syndromal versus nicht-syndromal?

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, wie schwierig die klare Abgrenzung zwischen syndromalen und nicht-syndromalen Krankheitsbildern ist. Blickt man zurück, sind die meisten Syndrome in ähnlicher Weise entstanden: Ein Krankheitsbild, welches eine Vielzahl und ungewöhnliche Kombination von Symptomen aufwies, wurde beschrieben und publiziert. Andere Ärzte konnten bei ihren Patienten einen ähnlichen Fall feststellen und verglichen diesen mit den bereits publizierten Beschreibungen. Auf diese Weise kamen nach und nach immer differenziertere Beschreibungen zustande, die die Bezeichnung ‘Syndrom’ erhielten [140]. Mit der Ära der molekular-

genetischen Analyse konnten nach und nach für viele Erkrankungen die genetischen Ursachen identifiziert werden. Dabei wurde jedoch deren genetische Heterogenität deutlich. Ein Beispiel für diesen Vorgang in der Geschichte der medizinischen Forschung ist das in dieser Arbeit behandelte Sensenbrenner-Syndrom. Die Beschreibung des Syndroms begann mit einigen wenigen Patienten [46, 47]. Mit der Zahl der publizierten Krankheitsfälle stieg auch die phänotypische Variabilität. Mit Beginn der molekulargenetischen Aufklärung erhoffte man sich eine Klärung der Ätiologie der Erkrankung. In den ziliaren Genen *IFT122*, *WDR35*, *IFT43* und *WDR19* wurden Mutationen identifiziert, ohne dass hieraus eine Genotyp-Phänotyp-Relation abgeleitet werden konnte [68, 60, 66, 61, 63, 45].
Andererseits zeigen sich in dieser Arbeit Schwierigkeiten in der eindeutigen Zuordnung syndromaler und nicht-syndromaler Fälle der Intelligenzminderung. Einige nicht-syndromale Phänotypen werden als Varianz im Spektrum einer syndromalen Erkrankung gesehen. Es stellt sich also die Frage, wie eine syndromale Erkrankung definiert sein soll: genetisch oder klinisch? Die Dichotomie der genetischen Diagnose (erkrankt oder nicht erkrankt) spricht für diese Einteilung. Die Erkenntnis, dass ein und dieselbe Mutation gänzlich unterschiedliche Phänotypen zur Folge haben kann, führt vor Augen, dass die alleinige Definition über die genetische Diagnose irreführend sein kann. Die alleinige klinische Diagnose kann, wie eingangs erläutert, ebenfalls fehlleiten [140], siehe Kapitel 4.1.
Die Frage kann vermutlich nicht eindeutig beantwortet werden; die Berechtigung, sie zu stellen, zeigt jedoch, wie weit wir noch davon entfernt sind, die molekulargenetischen Ursachen und ihre Auswirkungen bei genetischen Erkrankungen zu verstehen. Ein umfassender Ansatz aus genauer klinischer Untersuchung, langfristiger Verlaufsbeobachtung, molekulargenetischer Untersuchung und Vernetzung des Wissens kann nur der zielführende sein.
Die übergreifende Erkenntnis der Analyse dieser zwei Krankheitsentitäten ist, dass die Relation zwischen Genotyp und Phänotyp sehr unterschiedlich sein kann. Weshalb dem so ist, bleibt zukünftig zu klären. Die Mechanismen der Epigenetik und Genexpression könnten hierauf eine Antwort geben ebenso wie die Analyse der Proteinfunktion in unterschiedlichen Zellen.

4.5 Zukunft der genetischen Diagnostik

Die unterschiedlichen Herangehensweisen in der Diagnostik von autosomal-rezessiv vererbten Erkrankungen in dieser Arbeit verdeutlichen die Schwierigkeiten für die Beratung und Untersuchung von betroffenen Familien.
Bis vor Kurzem galt Sanger Sequenzierung als Goldstandard in der genetischen Diagnostik. Diese Technik stößt jedoch bei unbekanntem genetischen Locus an ihre Grenzen auf Grund des erheblichen zeitlichen und finanziellen Aufwandes, wenn alle Gene innerhalb eines Kopplungsintervalls untersucht werden müssen. Die Technik des Next Generation Sequencing in Kombination mit hochentwickelter Software könnte dieses Problem in der Zukunft lösen: Kosteneffizient, schnell und mit vergleichbarer Präzision können unbekannte Einzelbasenveränderungen identifiziert wer-

den. Je nach Fragestellung und Zielbereich kann diese Technik für gezielte Regionen, das gesamte Exom (whole exome sequencing WES) oder sogar das gesamte Genom (whole genome sequencing WGS) verwendet werden. Mittels WGS können alle genetischen Varianten eines Genoms erfasst werden [141]. Diese enorme Leistungsfähigkeit eröffnet neue Möglichkeiten für die Diagnostik seltener genetischer Erkrankungen. Die Aufgabe diese Unmenge an Information korrekt zu interpretieren, wird hierbei die neue Herausforderung sein.
Trotz der stetig sinkenden Kosten von Next Generation Sequencing-Methoden sind Kosten und Aufwand wahrscheinlich auch in näherer Zukunft zu hoch, um ein breites Screening zu ermöglichen. Kosteneffektivität spielt in einkommensschwachen Ländern eine besonders wichtige Rolle. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gab daher 2011 eine neue Richtung und Empfehlung für die zukünftige genetische Beratung und Untersuchung in Ländern geringen und mittleren Grundeinkommens vor: Neben überregional weit verbreiteten Erkrankungen wie der Phenylketonurie sollen unter der Berücksichtigung populationsspezifisch gehäuft auftretender Erkrankungen wie der Thalassämie auch seltenere regional auftretende Krankheiten in Screening-Untersuchungen einbezogen werden [142]. Die Heterogenität der Allelfrequenz in Populationen verlangt demnach einen regions- und populationsspezifischen Ansatz des genetischen Screenings.
Eine unzureichende Beratung und Vorbereitung einer solchen Untersuchung kann zu Diskriminierung und Verletzung der Menschenwürde führen [143]. Eine Untersuchung im indischen Bengal auf den Trägerstatus einer Hämoglobinopathie führte nach Bekanntwerden der Resultate zum Ausschluss von Frauen von der Heirat durch die Gemeinschaft [144]. Ein unkritischer Einsatz genannter diagnostischer Methoden in einer Gesellschaft, die einen Diskurs über den Umgang mit den Ergebnissen einer solchen Untersuchung nicht tolerant und demokratisch führen kann, birgt also erhebliche Gefahren.
Ein gutes Beispiel für eine erfolgreiche populationsbezogene Screening-Maßnahme ist die Untersuchung der Ashkenazi-Juden in den USA auf das autosomal-rezessiv vererbte, bei dieser Population sehr häufig auftretende, Tay-Sachs-Syndrom (OMIM#272800, *606869). Es handelt sich hierbei um eine Form der Intelligenzminderung (HP:0001249), welche progressiv verläuft und durch schwerste weitere Symptome wie Krämpfe (HP:0001250) und muskuläre Hypotonie (HP:0001290) innerhalb weniger Jahre zum Tod im Kleinkindesalter führt. Mittels genetischer Trägerstatusanalyse und pränatalen Screenings konnte die Inzidenz der Krankheit in dieser Population um 90% reduziert werden [145].
Wie zuvor ausgeführt liegen in einigen Gegenden dieser Welt die Raten der Konsanguinität bei Verheiratung bei etwa 40%. Bei etwa einem Drittel dieser Ehen handelt es sich um Cousin und Cousine ersten Grades [146]. Bei einem basalen Fehlbildungsrisiko von 4% kommt hierbei ein zusätzliches Risiko von 1,7-2,8% hinzu [147]. In solchen Regionen mit einem erhöhten Fehlbildungsrisiko, meist verursacht durch autosomal-rezessive Veränderungen, könnten genetische Screenings eventuell sinnvoll und kosteneffizient sein. Von insgesamt etwa 7000 bekannten genetischen Erkrankungen sind bislang bei 1139 die rezessiven genetischen Ursachen bekannt [148]. Wie bereits einleitend beschrieben können bislang nur etwa 50% der Ursachen für Intelligenzmin-

derung bei Betroffenen tatsächlich identifiziert werden.
Ein genetisches Screening auf 598 rezessive Erkrankungen wurde im Jahr 2012 vorgestellt, möglicherweise wegweisend für die Zukunft der genetischen Diagnostik [148]. Weiterhin können durch die Weiterentwicklung der Screening-Methodik auch Insertionen und Deletionen erfasst werden [149]. Durch die weltweite Arbeit unterschiedlicher Arbeitsgruppen an der Identifikation neuer Krankheitsgene und Mutationen für rezessive Erkrankungen wird die Zahl der genetischen Diagnosen bei vielen genetischen Krankheitsbildern gesteigert werden. Das wird die Möglichkeit eröffnen, Paare auf ihren genetischen Trägerstatus umfassend zu überprüfen und gegebenenfalls eine pränatale Diagnostik durchzuführen. Insbesondere bei zunächst asymptomatischen aber gut behandelbaren Erkrankungen wäre dies ein großer Gewinn. Auf der anderen Seite muss sich eine Gesellschaft die Frage stellen, ob diese Diagnostik bei nicht behandelbaren Erkrankungen, welche jedoch eine normale Lebenserwartung und möglicherweise gute Lebensqualität haben, eingesetzt werden darf, bzw. welche Konsequenzen daraus gezogen werden dürfen. Diese neuen Möglichkeiten erfordern eine Diskussion darüber, welche diagnostischen Mittel pränatal eingesetzt werden sollen oder dürfen. Kritiker sehen das Risiko, dass dieses Wissen die Medizin nicht etwa in ihrer präventiven, gesundheitsfördernden Funktion unterstützen würde, sondern eine menschenfeindliche Selektion des mutmaßlich leistungsfähigsten Feten fördern könnte.
Durch die Vielfalt und jeweils geringe Fallzahl vieler Syndrome bedarf es eines sehr versierten und erfahrenen Untersuchers, um einen Patienten der richtigen weiteren Diagnostik zuzuführen. Diese Problematik wurde bereits eingangs erörtert, siehe 1.1.4. Die Tendenz interdisziplinäre und internationale Konsortien zu bilden, um die komplexen Ursachen genetischer Erkrankungen aufzudecken, scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein. Das GENCODYS Konsortium (Genetic and Epigenetic Networks in Cognitive Dysfunction, www.gencodys.com) hat sich die systematische Erforschung der Genetik und Biologie von kognitiver Dysfunktion zur Aufgabe gemacht; hierbei sind Autismus und neurodegenerative Erkrankungen eingeschlossen.
Bei der außerordentlichen phänotypischen wie genotypischen Variabilität genetisch bedingter Erkrankungen sind eine gute Vernetzung, hochentwickelte und spezialisierte Datenbanken und die Zusammenarbeit von Experten verschiedener Gebiete notwendig, um Patienten der richtigen Diagnostik und Behandlung zuzuführen [150]. Die Zukunft der genetischen Diagnostik liegt demnach nicht in der Arbeit einzelner Experten, sondern in der Bündelung von Wissen und Daten und deren freier Zugänglichkeit.

Kapitel 5

Anhang

Abbildung 5.1: Familie G001 Mutationen *C12orf57*

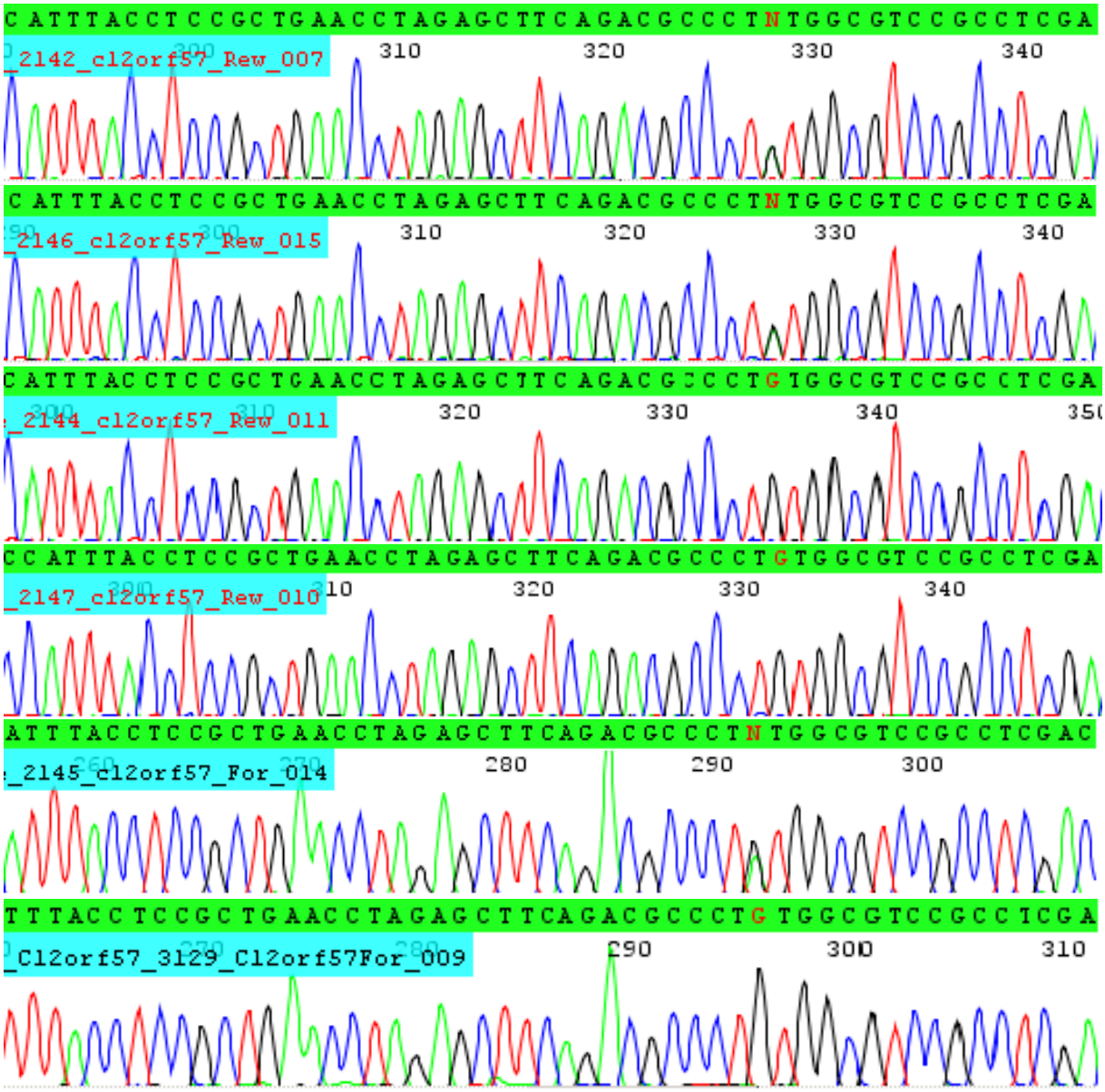


Abbildung 5.2: Familie G002 Mutationen *HIST3H3*

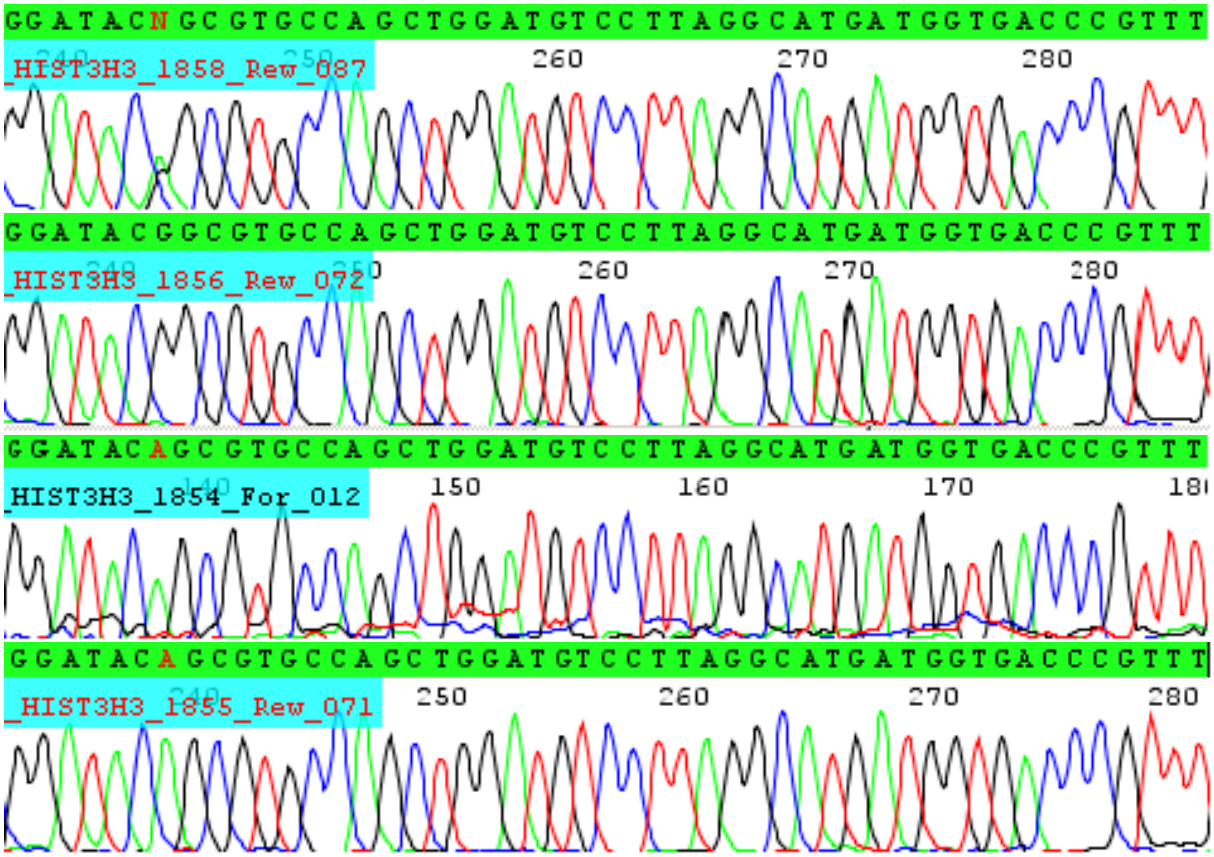


Abbildung 5.3: Familie G008 Mutationen *SURF1*

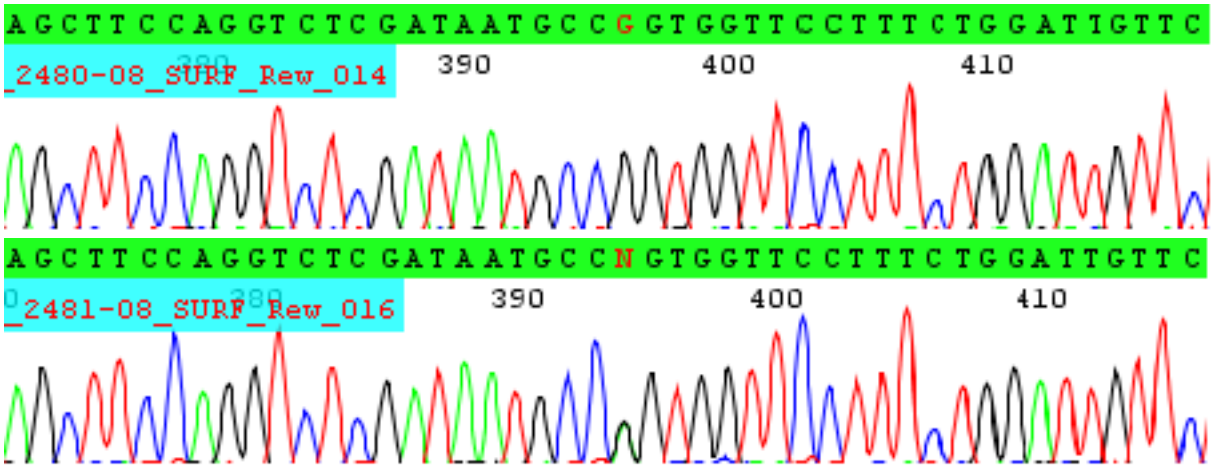


Abbildung 5.4: Familie G015 Mutationen *RABL6*

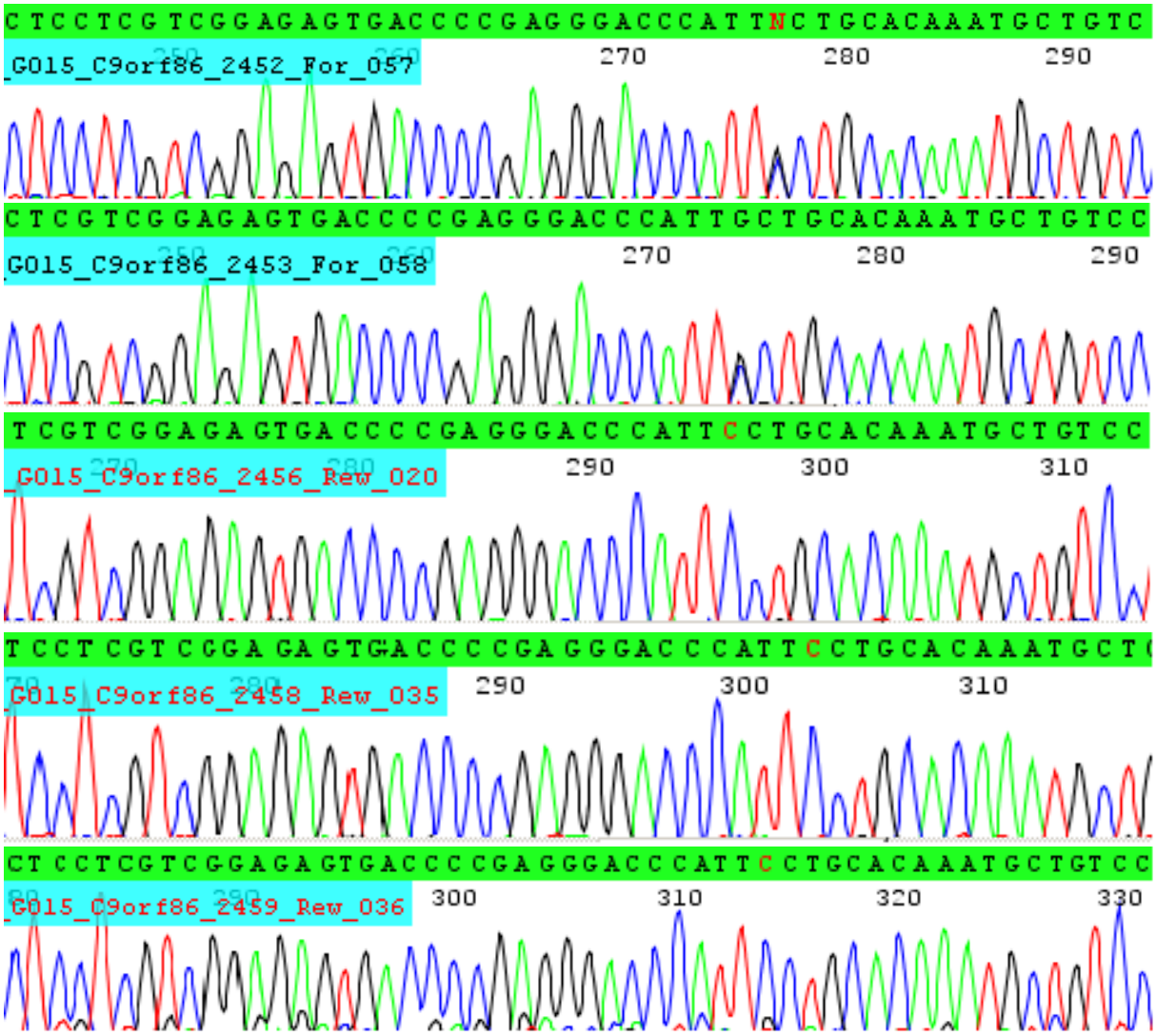


Abbildung 5.5: Familie G017 Mutationen *ELP2*

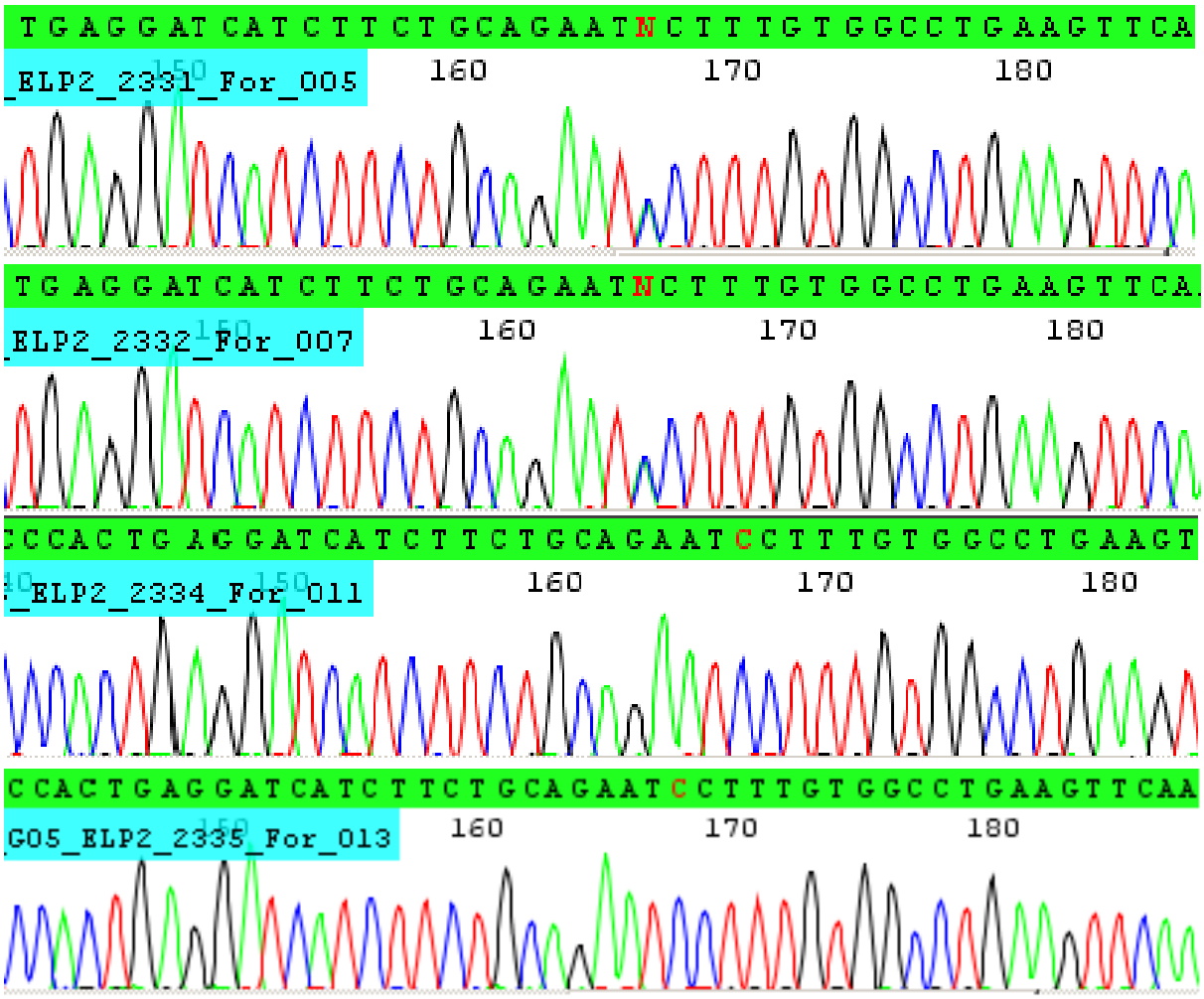


Abbildung 5.6: Familie G026 Mutationen *FAM126A*

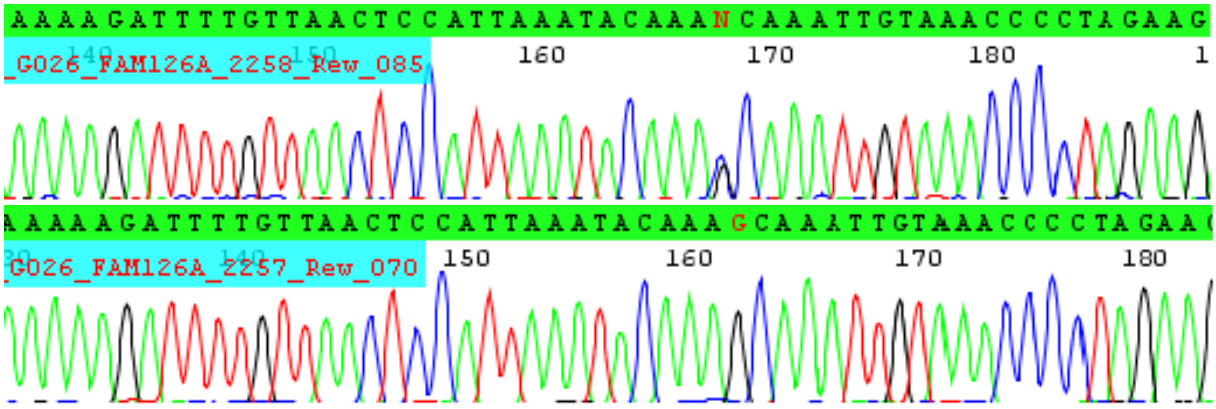


Abbildung 5.7: Familie G030 Mutationen *LARP7*

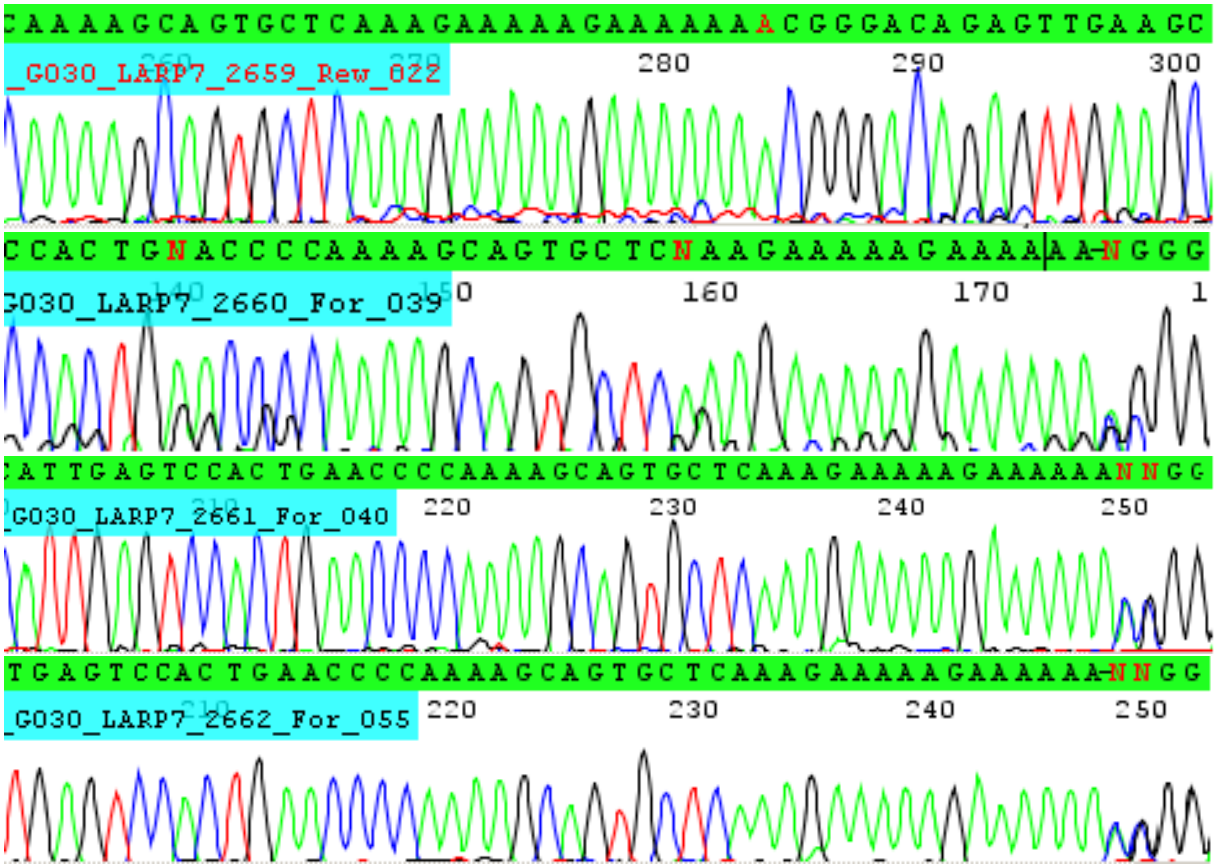


Abbildung 5.8: *WDR35*-Mutation Exon 25 Eltern

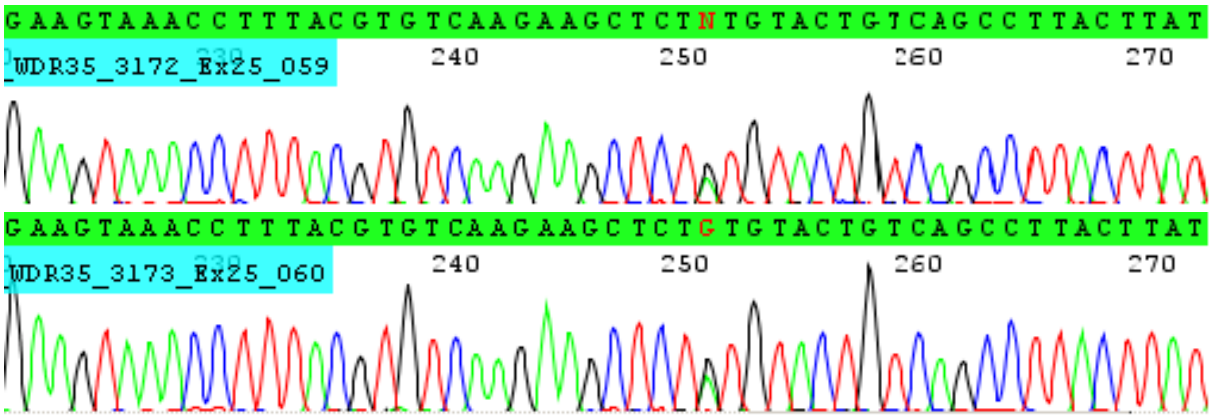


Abbildung 5.9: *WDR35*-Mutation Exon6 Eltern

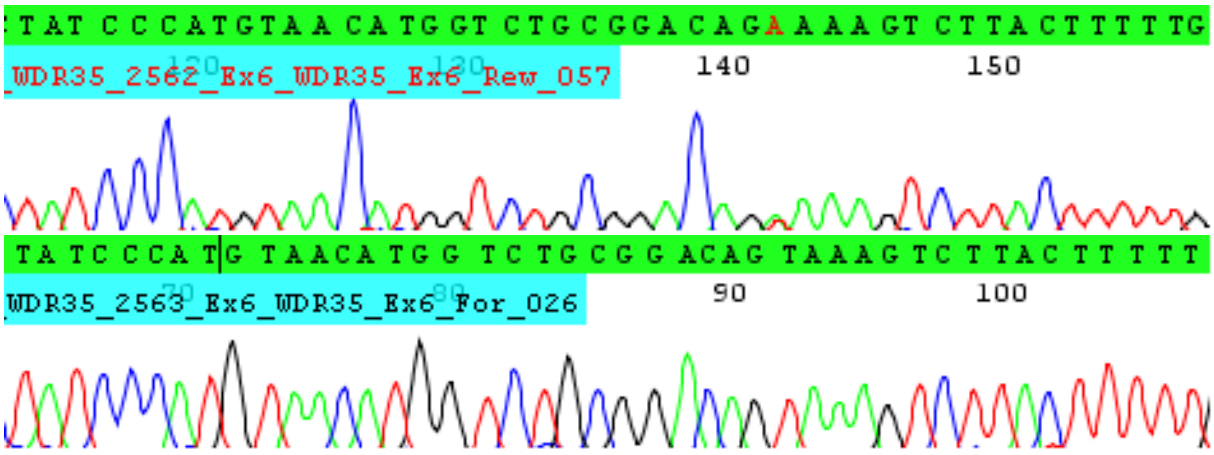
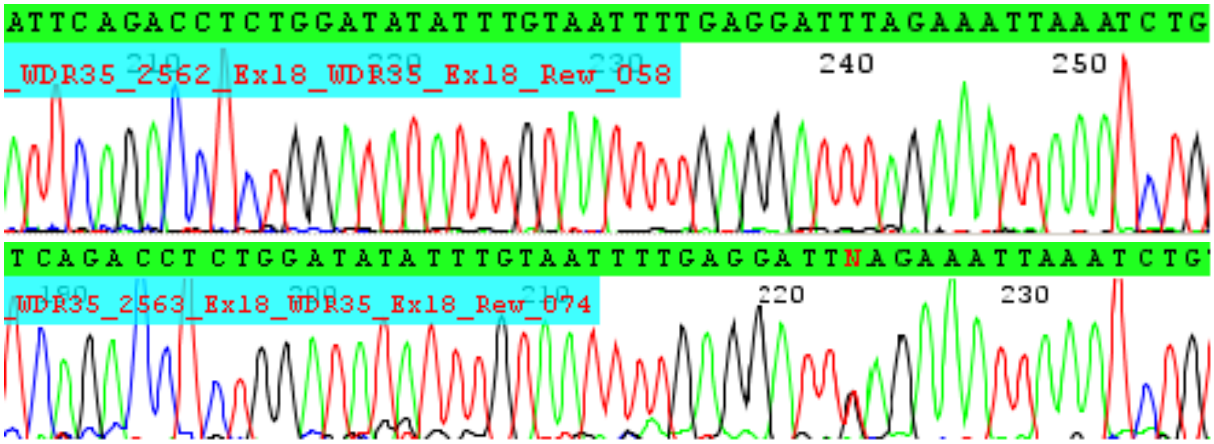


Abbildung 5.10: *WDR35*-Mutation Exon18 Eltern



Familie	Gen	Mutation	Reads	Allele%
G001	*C12orf57*	NC_000012.11:-g.7053285A>G	136	1
G002	*OBSCN*	NC_000001.10:-g.228471294C>T	124	0,992
	HIST3H3	NC_000001.10:-g.228612639G>A	117	1
	TRIM17	NC_000001.10:-g.228596779C>A	94	0,989473684
G008	*GLT6D1*	NC_000009.11:-g.138516347A>C	9	1
	RALGDS	NC_000009.11:-g.135984252C>T	95	0,979381443
	NCOR2	NC_000012.11:-g.124862914G>A	107	1
	SURF1	NC_000009.11:-g.136219373A>G	126	1
G015	*SLC34A3*	NC_000009.11:-g.140127732G>A	121	0,968
	RABL6	NC_000009.11:-g.139733864G>C	130	1
	INPP5E	NC_000009.11:-g.139324768T>C	99	1
	SEC16A	NC_000009.11:-g.139371526C>T	138	0,992805755
	CACNA1B	NC_000009.11:-g.140943730A>G	111	0,991071429
	PMPCA	NC_000009.11:-g.139317563A>T	98	1
G017	*ATP13A2*	NC_000001.10:-g.17320129C>T	65	0,970149254
	ELP2	NC_000018.9:-g.33739953A>C	77	1
	LAMA3	NC_000018.9:-g.21501441A>G	108	1
G026	*FAM126A*	NC_000007.13:-g.23017887C>G	72	1
	ASB2	NC_000014.8:-g.94404179C>T	76	1
G030	*LARP7*	NC_000004.11:-g.113568536_11356-8537insA	74	0,895726619

Tabelle 5.1: Zusätzliche Informationen zu Mutationen in Genen für Intelligenzminderung

Literaturverzeichnis

[1] SALVADOR-CARULLA, L ; REED, GM ; VAEZ-AZIZI, LM ; COOPER, SA ; MARTINEZ-LEAL, R ; BERTELLI, M ; ADNAMS, C ; COORAY, S ; DEB, S ; AKOURY-DIRANI, L ; GIRIMAJI, SC ; KATZ, G ; KWOK, H ; LUCKASSON, R ; SIMEONSSON, R ; WALSH, C ; MUNIR, K ; SAXENA, S: Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for "mental retardation/intellectual disability" in ICD-11. In: *World Psychiatry* 10(3) (2011), S. 175–80.

[2] CHIURAZZI, P: Mental Retardation: Is Naming the Real Issue? In: *Am J Med Genet Part A* 155 (2011), S. 974–5.

[3] ROPERS, HH: Genetics of Early Onset Cognitive Impairment. In: *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 11 (2010), S. 161–87.

[4] GRAUBNER, B: *ICD-10-GM 2012 Systematisches Verzeichnis: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision*. Deutscher Ärzte-Verlag, 2012.

[5] MATILAINEN, R ; AIRAKSINEN, E ; MONONEN, T ; LAUNIALA, K ; KÄÄRIÄINEN, R: A population-based study on the causes of mild and severe mental retardation. In: *Acta Paediatr* 84(3) (1995), S. 261–6.

[6] STRØ MME, P: Aetiology in severe and mild mental retardation: a population-based study of Norwegian children. In: *Dev Med Child Neurol* 42(2) (2000), S. 76–86.

[7] STRØ MME, P ; VALVATNE, K: Mental retardation in Norway: prevalence and subclassification in a cohort of 30 037 children born between 1980 and 1985. In: *Acta P* 87 (1998), S. 291–6.

[8] ROELEVELD, N ; ZIELHUIS, GA ; GABREËLS, F: The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. In: *Dev Med Child Neurol* 39(2) (1997), S. 125–132.

[9] MAULIK, PK ; MASCARENHAS, MN ; MATHERS, CD ; DUA, T ; SAXENA, S: Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. In: *Res Dev Disabil* 32(2) (2011), S. 419–36.

[10] LEONARD, H ; WEN, X: The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. In: *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8(3) (2002), S. 117–34.

[11] MURPHY, CC ; YEARGIN-ALLSOPP, M ; DECOUFLÉ, P ; DREWS, CD.: The administrative prevalence of mental retardation in 10-year-old children in metropolitan Atlanta, 1985 through 1987. In: *Am J Public Health* 85(3) (1995), S. 319–23.

[12] CURRY, CJ ; STEVENSON, RE ; AUGHTON, D ; BYRNE, J ; CAREY, JC ; CASSIDY, S ; CUNNIFF, C ; GRAHAM, JM ; JONES, MC ; KABACK, MM ; MOESCHLER, JG ; SCHWARTZ, S ; TARLETON, J ; OPITZ, J: Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. In: *Am J Med Genet* 72 (1997), S. 468–77.

[13] ABDELMALIK, N ; VAN HAELST, M ; MANCINI, G ; SCHRANDER-STUMPEL, C ; MARCUS-SOEKARMAN, D ; HENNEKAM, R ; COBBEN, JM: Diagnostic outcomes of 27 children referred by pediatricians to a genetics clinic in the Netherlands with suspicion of fetal alcohol spectrum disorders. In: *Am J Med Genet* 161A(2) (2013), S. 254–60.

[14] O'LEARY, C ; LEONARD, H ; BOURKE, J ; D'ANTOINE, H ; BARTU, A ; BOWER, C: Intellectual disability: population-based estimates of the proportion attributable to maternal alcohol use disorder during pregnancy. In: *Dev Med Child Neurol* 55(3) (2012), S. 271–7.

[15] SILVERMAN, W: Prevention of intellectual and developmental disabilities. In: *Intellect Dev Disabil* 47 (2009), S. 320–2.

[16] STRØ MME, P ; MAGNUS, P: Correlations between socioeconomic status, IQ and aetiology in mental retardation: a population-based study of Norwegian children. In: *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 35 (2000), S. 12–8.

[17] YEARGIN-ALLSOPP, M ; MURPHY, CC ; CORDERO, JF ; DECOUFLÉ, P ; HOLLOWELL, JG: Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10-year-old children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987. In: *Dev Med Child Neurol* 39(3) (1997), S. 142–9.

[18] HOU, JW ; WANG, TR ; CHUANG, SM: An epidemiological and aetiological study of children with intellectual disability in Taiwan. In: *J Intellect Disabil Res* 42 (1998), S. 137–43.

[19] MORIN, D ; MÉRINEAU-CÔTÉ, J ; OUELLETTE-KUNTZ, H ; TASSÉ, MJ ; KERR, M: A comparison of the prevalence of chronic disease among people with and without intellectual disability. In: *Am J Intellect Dev Disabil* 117(6) (2012), S. 455–63.

[20] WRIGHT, M ; DE GEUS, E ; ANDO, J ; LUCIANO, M ; POSTHUMA, D ; ONO, Y ; HANSELL, N ; VAN BAAL, C ; HIRAISHI, K ; HASEGAWA, T ; SMITH, G ; GEFFEN, G ; GEFFEN, L ; KANBA, S ; MIYAKE, A ; MARTIN, N ; BOOMSMA, D: Genetics of cognition: outline of a collaborative twin study. In: *Twin Res* 4(1) (2001), S. 48–56.

[21] PLOMIN, R ; THOMPSON, LA.: Genetics and high cognitive ability. In: *Ciba Found Symp* 178 (1993), S. 67–79.

[22] CHIURAZZI, P ; OOSTRA, BA: Genetics of mental retardation. In: *Curr Opin Pediatr* 12(6) (2000), S. 529–35.

[23] RAUCH, A ; HOYER, J ; GUTH, S ; ZWEIER, C ; KRAUS, C ; BECKER, C ; ZENKER, M ; HÜFFMEIER, U ; THIEL, C ; RÜSCHENDORF, F ; NÜRNBERG, P ; REIS, A ; TRAUTMANN, U: Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. In: *Am J Med Genet A* 140(19) (2006), S. 2063–74.

[24] RAVNAN, JB ; TEPPERBERG, JH ; PAPENHAUSEN, P ; LAMB, AN ; HEDRICK, J ; EASH, D ; LEDBETTER, DH ; MARTIN, CL: Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. In: *J Med Genet* 43(6) (2006), S. 478–89.

[25] MENDEL, G: Versuche über Pflanzen-Hybriden. In: *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins zu Brünn* 4 (1866), S. 3–47.

[26] PENROSE, L: A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect. In: *London: Medical Research Council* (1938)

[27] TZSCHACH, A ; ROPERS, HH: X-chromosomale mentale Retardierung. In: *Medizinische Genetik* 2 (2006), S. 187–93.

[28] KAUFMAN, L ; AYUB, M ; VINCENT, JB: The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. In: *J Neurodev Disord* 2(4) (2010), S. 182–209.

[29] RAUCH, A ; WIECZOREK, D ; GRAF, E ; WIELAND, T ; ENDELE, S ; SCHWARZMAYR, T ; ALBRECHT, B ; BARTHOLDI, D ; BEYGO, J ; DI DONATO, N ; DUFKE, A ; CREMER, K ; HEMPEL, M ; HORN, D ; HOYER, J ; JOSET, P ; RÖPKE, A ; MOOG, U ; RIESS, A ; THIEL, CT ; TZSCHACH, A ; WIESENER, A ; WOHLLEBER, E ; ZWEIER, C ; EKICI, AB ; ZINK, AM ; RUMP, A ; MEISINGER, C ; GRALLERT, H ; STICHT, H ; SCHENCK, A ; ENGELS, H ; RAPPOLD, G ; SCHRÖCK, E ; WIEACKER, P ; RIESS, O ; MEITINGER, T ; REIS, A ; STROM, TM: Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. In: *Lancet.* 380(9854) (2012), S. 1674–82.

[30] DE LIGT, J ; WILLEMSEN, MH ; VAN BON, BW ; KLEEFSTRA, T ; YNTEMA, HG ; KROES, T ; VULTO VAN SILFHOUT, AT ; KOOLEN, DA ; VRIES, P de ; GILISSEN, C ; DEL ROSARIO, M ; HOISCHEN, A ; SCHEFFER, H ; DE VRIES, BB ; BRUNNER, HG ; VELTMAN, JA ; VISSERS, LE: Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. In: *N Engl J Med* 367(20) (2012), S. 1921–9.

[31] GARSHASBI, M ; MOTAZACKER, MM ; KAHRIZI, K ; BEHJATI, F ; ABEDINI, SS ; NIEH, SE ; FIROUZABADI, SG ; BECKER, C ; RÜSCHENDORF, F ; NÜRNBERG, P ; TZSCHACH, A ; VAZIFEHMAND, R ; ERDOGAN, F ; ULLMANN, R ; LENZNER, S ; KUSS, AW ; ROPERS, HH ; NAJMABADI, H: SNP array-based homozygosity mapping reveals MCPH1 deletion in family with autosomal recessive mental retardation and mild microcephaly. In: *Hum Genet* 118 (2006), S. 708–15.

[32] MUSANTE, L ; ROPERS, HH: Genetics of recessive cognitive disorders. In: *Trends Genet* 30(1) (2014), S. 32–9.

[33] NAJMABADI, H ; MOTAZACKER, MM ; GARSHASBI, M ; KAHRIZI, K ; TZSCHACH, A ; CHEN, W ; BEHJATI, F ; HADAVI, V ; NIEH, SE ; ABEDINI, SS ; VAZIFEHMAND, R ; FIROUZABADI, SG ; JAMALI, P ; FALAH, M ; SEIFATI, SM ; GRÜTERS, A ; LENZNER, S ; JENSEN, LR ; RÜSCHENDORF, F ; KUSS, AW ; ROPERS, HH: Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. In: *Hum Genet* 121 (2007), S. 43–8.

[34] KUSS, AW ; GARSHASBI, M ; KAHRIZI, K ; TZSCHACH, A ; BEHJATI, F ; DARVISH, H ; ABBASI-MOHEB, L ; PUETTMANN, L ; ZECHA, A ; WEISS MANN, R ; HU, H ; MOHSENI, M ; ABEDINI, SS ; RAJAB, A ; HERTZBERG, C ; WIECZOREK, D ; ULLMANN, R ; GHASEMI-FIROUZABADI, S ; BANIHASHEMI, S ; ARZHANGI, S ; HADAVI, V ; BAHRAMI-MONAJEMI, G ; KASIRI, M ; FALAH, M ; NIKUEI, P ; DEHGHAN, A ; SOBHANI, M ; JAMALI, P ; ROPERS, HH ; NAJMABADI, H: Autosomal recessive mental retardation: homozygosity mapping identifies 27 single linkage intervals, at least 14 novel loci and several mutation hotspots. In: *Hum Genet* 129 (2011), S. 141–8.

[35] NAJMABADI, H ; HU, H ; GARSHASBI, M ; ZEMOJTEL, T ; ABEDINI, SS ; CHEN, W ; HOSSEINI, M ; BEHJATI, F ; HAAS, S ; JAMALI, P ; ZECHA, A ; MOHSENI, M ; PÜTTMANN, L ; VAHID, LN ; JENSEN, C ; MOHEB, LA ; BIENEK, M ; LARTI, F ; MUELLER, I ; WEISS MANN, R ; DARVISH, H ; WROGEMANN, K ; HADAVI, V ; LIPKOWITZ, B ; ESMAEELI-NIEH, S ; WIECZOREK, D ; KARIMINEJAD, R ; FIROUZABADI, SG ; COHEN, M ; FATTAHI, Z ; ROST, I ; MOJAHEDI, F ; HERTZBERG, C ; DEHGHAN, A ; RAJAB, A ; BANAVANDI, MJ ; HOFFER, J ; FALAH, M ; MUSANTE, L ; KALSCHEUER, V ; ULLMANN, R ; KUSS, AW ; TZSCHACH, A ; KAHRIZI, K ; ROPERS, HH: Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. In: *Nature* 478(7367) (2011), S. 57–63.

[36] OPITZ, JM ; KAVEGGIA, EG ; LAXOVA, R ; PALLISTER, PD: The diagnosis and prevention of severe mental retardation. In: *Vol II. Proceedings, International Conference on Preventable Aspects of Genetic Morbidity.*, 1982, S. 117–38.

[37] SHAFFER, LG: American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. In: *Genet Med* 7 (2005), S. 650–4.

[38] VAN KARNEBEEK, CD ; JANSWEIJER, MC ; LEENDERS, AG ; OFFRINGA, M ; HENNEKAM, RC: Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. In: *Eur J Hum Genet* 13 (2005), S. 6–25.

[39] GRØ NSKOV, K ; HJALGRIM, H ; NIELSEN, IM ; BRONDUM-NIELSEN, K: Screening of the ARX gene in 682 retarded males. In: *Eur J Hum Genet* 12(9) (2004), S. 701–5.

[40] TURNER, G ; PARTINGTON, M ; KERR, B ; MANGELSDORF, M ; GECZ, J: Variable expression of mental retardation, autism, seizures, and dystonic hand movements in two families with an identical ARX gene mutation. In: *Am J Med Genet* 112(4) (2002), S. 405–11.

[41] ISHIKAWA, H ; MARSHALL, WF: Ciliogenesis: building the cell's antenna. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (2011), S. 222–34.

[42] HILDEBRANDT, F ; BENZING, T ; KATSANIS, N: Ciliopathies. In: *N Engl J Med* 364(16) (2011), S. 1533–43.

[43] MARSHALL, W: The cell biological basis of ciliary disease. In: *J Cell Biol* 180(1) (2008), S. 17–21.

[44] JEFFERY, CJ: Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. In: *Trends Genet* 19(8) (2003), S. 415–7.

[45] LIN, AE ; TRAUM, AZ ; SAHAI, I ; KEPPLER-NOREUIL, K ; KUKOLICH, MK ; ADAM, MP ; WESTRA, SJ ; ARTS, HH: Sensenbrenner syndrome (Cranioectodermal dysplasia): clinical and molecular analyses of 39 patients including two new patients. In: *Am J Med Genet A* 161A(11) (2013), S. 2762–76.

[46] SENSENBRENNER, JA ; DORST, JP ; OWENS, RP: New syndrome of skeletal, dental and hair anomalies. In: *Birth Defects Orig Artic Ser* 11(2) (1975), S. 372–9.

[47] LEVIN, LS ; PERRIN, JC ; OSE, L ; DORST, JP ; MILLER, JD ; MCKUSICK, VA: A heritable syndrome of craniosynostosis, short thin hair, dental abnormalities, and short limbs: cranioectodermal dysplasia. In: *J Pediatr* 90(1) (1977), S. 55–61.

[48] DUDENREDAKTION (Hrsg.): *Duden. Die deutsche Rechtschreibung*. Bd. 1. 25. Auflage. Mannheim/Wien/Zürich : Bibliographisches Institut (Dudenverlag), 2009

[49] GELLIS, S ; FEINGOLD, M ; DUBNER, D: Cranioectodermal dysplasia. In: *Am J Dis Child* 133(12) (1979), S. 1275–6.

[50] LANG, GD ; YOUNG, ID: Cranioectodermal dysplasia in sibs. In: *J Med Genet* 28(6) (1991), S. 424.

[51] LAMMER, EJ ; BADEN, H ; MARGOLIS, RJ: Phenotype of cranioectodermal dysplasia with different hair and bone abnormalities. In: *Am J Med Genet* 45(1) (1993), S. 9–13.

[52] AMAR, MJ ; SUTPHEN, R ; KOUSSEFF, BG: Expanded phenotype of cranioectodermal dysplasia (Sensenbrenner syndrome). In: *Am J Med Genet* 70(4) (1997), S. 349–52.

[53] SAVILL, GA ; YOUNG, ID ; CUNNINGHAM, RJ ; ANSELL, ID ; EVANS, JH: Chronic tubulo-interstitial nephropathy in children with cranioectodermal dysplasia. In: *Pediatr Nephrol* 11(2) (1997), S. 215–7.

[54] COSTET, C ; BETIS, F ; BÉRARD, E ; TSIMARATOS, M ; SIGAUDY, S ; ANTIGNAC, C ; GASTAUD, P: Pigmentosum retinis and tubulo-interstitial nephronophtisis in Sensenbrenner syndrome: a case report. In: *J Fr Ophtalmol* 23(2) (2000), S. 158–60.

[55] ZANNOLLI, R ; MOSTARDINI, R ; CARPENTIERI, ML ; GATTI, MG ; GALLUZZI, P ; TERROSI VAGNOLI, P ; GIORGETTI, R ; CALVIERI, S ; MORGESE, G: Cranioectodermal dysplasia: a new patient with an inapparent, subtle phenotype. In: *Pediatr Dermatol* 18(4) (2001), S. 332–5.

[56] TAMAI, S ; TOJO, M ; KAMIMAKI, T ; SATO, Y ; NISHIMURA, G: Intrafamilial phenotypic variations in cranioectodermal dysplasia: propositus with typical manifestations and her brother with perinatal death. In: *Am J Med Genet* 107(1) (2002), S. 78–80.

[57] OBIKANE, K ; NAKASHIMA, T ; WATARAI, Y ; MORITA, K ; CHO, K ; TONOKI, H ; NAGATA, M ; SASAKI, S: Renal failure due to tubulointerstitial nephropathy in an infant with cranioectodermal dysplasia. In: *Pediatr Nephrol* 21(4) (2006), S. 574–6.

[58] ZAFFANELLO, M ; DIOMEDI-CAMASSEI, F ; MELZI, ML ; TORRE, G ; CALLEA, F ; EMMA, F: Sensenbrenner syndrome: a new member of the hepatorenal fibrocystic family. In: *Am J Med Genet A* 140(21) (2006), S. 2336–40.

[59] FRY, AE ; KLINGENBERG, C ; MATTHES, J ; HEIMDAL, K ; HENNEKAM, RC ; PILZ, DT: Connective tissue involvement in two patients with features of cranioectodermal dysplasia. In: *Am J Med Genet A* 149A(10) (2009), S. 2212–5.

[60] WALCZAK-SZTULPA, J ; EGGENSCHWILER, J ; OSBORN, D ; BROWN, DA ; EMMA, F ; KLINGENBERG, C ; HENNEKAM, RC ; TORRE, G ; GARSHASBI, M ; TZSCHACH, A ; SZCZEPANSKA, M ; KRAWCZYNSKI, M ; ZACHWIEJA, J ; ZWOLINSKA, D ; BEALES, PL ; ROPERS, HH ; LATOS-BIELENSKA, A ; KUSS, AW: Cranioectodermal Dysplasia, Sensenbrenner syndrome, is a ciliopathy caused by mutations in the IFT122 gene. In: *Am J Hum Genet* 86(6) (2010), S. 949–56.

[61] BREDRUP, C ; SAUNIER, S ; OUD, MM ; FISKERSTRAND, T ; HOISCHEN, A ; BRACKMAN, D ; LEH, SM ; MIDTBØ, M ; FILHOL, E ; BOLE-FEYSOT, C ; NITSCHKÉ, P ; GILISSEN, C ; HAUGEN, OH ; SANDERS, JS ; STOLTE-DIJKSTRA, I ; MANS, DA ; STEENBERGEN, EJ ; HAMEL, BC ; MATIGNON, M ; PFUNDT, R ; JEANPIERRE, C ; BOMAN, H ; RØ DAHLM, E ; VELTMAN, JA ; KNAPPSKOG, PM ; KNOERS, NV ; ROEPMAN, R ; ARTS, HH: Ciliopathies with skeletal anomalies and renal insufficiency due to mutations in the IFT-A gene WDR19. In: *Am J Hum Genet* 89(5) (2011), S. 634–43.

[62] BACINO, CA ; DHAR, SU ; BRUNETTI-PIERRI, N ; LEE, B ; BONNEN, PE: WDR35 mutation in siblings with Sensenbrenner syndrome: a ciliopathy with variable phenotype. In: *Am J Med Genet A* 158A(11) (2012), S. 2917–24.

[63] HOFFER, J ; FRYSSIRA, H ; KONSTANTINIDOU, A ; ROPERS, HH ; TZSCHACH, A: Novel WDR35 mutations in patients with cranioectodermal dysplasia (Sensenbrenner syndrome). In: *Clin Genet* 83(1) (2013), S. 92–5.

[64] ALAZAMI, AM ; SEIDAHMED, MZ ; ALZAHRANI, F ; MOHAMMED, AO ; ALKURAYA, FS: Novel IFT122 mutation associated with impaired ciliogenesis and cranioectodermal dysplasia. In: *Mol Genet Genomic Med* 2(2) (2014), S. 103–6.

[65] EKE, T ; WOODRUFF, G ; YOUNG, ID: A new oculorenal syndrome: retinal dystrophy and tubulointerstitial nephropathy in cranioectodermal dysplasia. In: *Br J Ophthalmol* 80(5) (1996), S. 490–1.

[66] ARTS, HH ; BONGERS, EM ; MANS, DA ; VAN BEERSUM, SE ; OUD, MM ; BOLAT, E ; SPRUIJT, L ; CORNELISSEN, EA ; SCHUURS-HOEIJMAKERS, JH ; DE LEEUW, N ; CORMIER-DAIRE, V ; BRUNNER, HG ; KNOERS, NV ; ROEPMAN, R: C14ORF179 encoding IFT43 is mutated in Sensenbrenner syndrome. In: *J Med Genet* 48(6) (2011), S. 390–5.

[67] KONSTANTINIDOU, AE ; FRYSSIRA, H ; SIFAKIS, S ; KARADIMAS, C ; KAMINOPETROS, P ; AGROGIANNIS, G ; VELONIS, S ; NIKKELS, PG ; PATSOURIS, E: Cranioectodermal dysplasia: a probable ciliopathy. In: *Am J Med Genet A* 149A(10) (2009), S. 2206–11.

[68] GILISSEN, C ; ARTS, HH ; HOISCHEN, A ; SPRUIJT, L ; MANS, DA ; ARTS, P ; VAN LIER, B ; M, Steehouwer ; VAN REEUWIJK, J ; KANT, SG ; ROEPMAN, R ; KNOERS, NV ; VELTMAN, JA ; BRUNNER, HG: Exome sequencing identifies WDR35 variants involved in Sensenbrenner syndrome. In: *Am J Hum Genet* 87(3) (2010), S. 418–23.

[69] MILL, P ; LOCKHART, PJ ; FITZPATRICK, E ; MOUNTFORD, HS ; HALL, EA ; REIJNS, MA ; KEIGHREN, M ; BAHLO, M ; BROMHEAD, CJ ; BUDD, P ; AFTIMOS, S ; DELATYCKI, MB ; SAVARIRAYAN, R ; JACKSON, IJ ; AMOR, DJ: Human and mouse mutations in WDR35

cause short-rib polydactyly syndromes due to abnormal ciliogenesis. In: *Am J Hum Genet* 88(4) (2011), S. 508–15.

[70] DAVIS, EE ; ZHANG, Q ; LIU, Q ; DIPLAS, BH ; DAVEY, LM ; HARTLEY, J ; STOETZEL, C ; SZYMANSKA, K ; RAMASWAMI, G ; LOGAN, CV ; MUZNY, DM ; YOUNG, AC ; WHEELER, DA ; CRUZ, P ; MORGAN, M ; LEWIS, LR ; CHERUKURI, P ; MASKERI, B ; HANSEN, NF ; MULLIKIN, JC ; BLAKESLEY, RW ; BOUFFARD, GG ; GYAPAY, G ; RIEGER, S ; TÖNSHOFF, B ; KERN, I ; SOLIMAN, NA ; NEUHAUS, TJ ; SWOBODA, KJ ; KAYSERILI, H ; GALLAGHER, TE ; LEWIS, RA ; BERGMANN, C ; OTTO, EA ; SAUNIER, S ; SCAMBLER, PJ ; BEALES, PL ; GLEESON, JG ; MAHER, ER ; ATTIÉ-BITACH, T ; DOLLFUS, H ; JOHNSON, CA ; GREEN, ED ; GIBBS, RA ; HILDEBRANDT, F ; PIERCE, EA ; KATSANIS, N: TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. In: *Nat Genet* 43(3) (2011), S. 189–96.

[71] PERRAULT, I ; SAUNIER, S ; HANEIN, S ; FILHOL, E ; BIZET, AA ; COLLINS, F ; SALIH, MA ; GERBER, S ; DELPHIN, N ; BIGOT, K ; ORSSAUD, C ; SILVA, E ; BAUDOUIN, V ; OUD, MM ; SHANNON, N ; LE MERRER, M ; ROCHE, O ; PIETREMENT, C ; GOUMID, J ; BAUMANN, C ; BOLE-FEYSOT, C ; NITSCHKE, P ; ZAHRATE, M ; BEALES, P ; ARTS, HH ; MUNNICH, A ; KAPLAN, J ; ANTIGNAC, C ; CORMIER-DAIRE, V ; ROZET, JM: Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations. In: *Am J Hum Genet* 90(5) (2012), S. 864–70.

[72] DE VRIES, J ; YNTEMA, JL ; VAN DIE, CE ; CRAMA, N ; CORNELISSEN, EA ; HAMEL, BC: Jeune syndrome: description of 13 cases and a proposal for follow-up protocol. In: *Eur J Pediatr* 169(1) (2010), S. 77–88.

[73] LIEM JR., KF ; ASHE, A ; HE, M ; SATIR, P ; MORAN, J ; BEIER, D ; WICKING, C ; ANDERSON, KV: The IFT-A complex regulates Shh signaling through cilia structure and membrane protein trafficking. In: *J Cell Biol* 197(6) (2012), S. 789–800.

[74] CORTELLINO, S ; WANG, C ; WANG, B ; BASSI, MR ; CARETTI, E ; CHAMPEVAL, D ; CALMONT, A ; JARNIK, M ; BURCH, J ; ZARET, KS ; LARUE, L ; BELLACOSA, A: Defective ciliogenesis, embryonic lethality and severe impairment of the Sonic Hedgehog pathway caused by inactivation of the mouse complex A intraflagellar transport gene Ift122/Wdr10, partially overlapping with the DNA repair gene Med1/Mbd4. In: *Dev Biol* 325(1) (2009), S. 225–37.

[75] LANDER, ES ; ALUMNI: Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409(6822) (2001), S. 860–921.

[76] VENTER, JC ; ALUMNI: The sequence of the human genome. In: *Science* 291(5507) (2001), S. 1304–1351.

[77] KRUGLYAK, L: The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. In: *Nat Genet* 17(1) (1997), S. 21–4.

[78] SANGER, F ; NICKLEN, S ; COULSON, AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12) (1977), S. 5463–7.

[79] ROBINSON, PN ; MUNDLOS, S: The human phenotype ontology. In: *Clin Genet* 77(6) (2010), S. 525–34.

[80] 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 ; WASHINGTHON, 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. In: *Nucleic Acids Res* 42 (2014). – Doi: 10.1093/nar/gkt1026

[81] KÖHLER, S ; SCHULZ, MH ; KRAWITZ, P ; BAUER, S ; DÖLKEN, S ; OTT, CE ; MUNDLOS, C ; HORN, D ; MUNDLOS, S ; ROBINSON, PN: Clinical diagnostics in human genetics with semantic similarity searches in ontologies. In: *Am J Hum Genet* 85(4) (2009), S. 457–64.

[82] SALIH, MA ; TZSCHACH, A ; OYSTRECK, DT ; HASSAN, HH ; ALDREES, A ; ELMALIK, SA ; EL KHASHAB, HY ; WIENKER, TF ; ABU-AMERO, KK ; BOSLEY, TM: A newly recognized autosomal recessive syndrome affecting neurologic function and vision. In: *Am J Med Genet* 161 (2013), S. 1207–13.

[83] CIUREA, AV ; TOADER, C: Genetics of craniosynostosis: review of the literature. In: *J Med Life* 2(1) (2009), S. 5–17.

[84] COORDINATORS: Database resources of the National Center for Biotechnology Information. In: *Nucleic Acids Res* (2014). – Doi: 10.1093/nar/gkt1146

[85] SAFRAN, M ; DALAH, I ; ALEXANDER, J ; ROSEN, N ; INY STEIN, T ; SHMOISH, M ; NATIV, N ; BAHIR, I ; DONIGER, T ; KRUG, H ; SIROTA-MADI, A ; OLENDER, T ; GOLAN, Y ; STELZER, G ; HAREL, A ; LANCET, D: GeneCards Version 3: the human gene integrator. In: *Database (Oxford)* (2010). – Doi: 10.1093/database/baq020.

[86] STENSON, PD ; MORT, M ; BALL, EV ; SHAW, K ; PHILLIPS, AD ; COOPER, DN: The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical

and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. In: *Hum Genet* 133(1) (2013), S. 1–9.

[87] HORAITIS, O ; COTTON, RG: The challenge of documenting mutation across the genome: the human genome variation society approach. In: *Hum Mutat* 23(5) (2004), S. 447–52.

[88] WILDEMAN, M ; VAN OPHUIZEN, E ; DEN DUNNEN, JT ; TASCHNER, PE: Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. In: *Hum Mutat* 29(1) (2008), S. 6–13.

[89] KENT, WJ ; SUGNET, CW ; FUREY, TS ; ROSKIN, KM ; PRINGLE, TH ; ZAHLER, AM ; HAUSSLER, D: The human genome browser at UCSC. In: *Genome Res* 12(6) (2002), S. 996–1006.

[90] ADZHUBEI, I ; JORDAN, DM ; SUNYAEV, SR: Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. In: *Curr Protoc Hum Genet* 76(7) (2013). – Doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76.

[91] POLLARD, KS ; HUBISZ, MJ ; ROSENBLOOM, KR ; SIEPEL, A: Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. In: *Genome Res* 20(1) (2010), S. 110–21.

[92] SIM, NL ; KUMAR, P ; HU, J ; HENIKOFF, S ; SCHNEIDER, G ; NG, PC: SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. In: *Nucleic Acids Res* (2012). – Doi: 10.1093/nar/gks539

[93] UNTERGASSER, A ; CUTCUTACHE, I ; KORESSAAR, T ; YE, J ; FAIRCLOTH, BC ; REMM, M ; ROZEN, SG: Primer3- new capabilities and interfaces. In: *Nucleic Acids Res* 40(15) (2012), S. e115.

[94] LANDER, ES ; BOTSTEIN, D: Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. In: *Science* 236 (1987), S. 1567–70.

[95] FARRALL, M: Homozygosity mapping: familiarity breeds debility. In: *Nat Genet* 5(2) (1993), S. 107–8.

[96] NG, PC ; HENIKOFF, S: SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. In: *Nucleic Acids Res* 31(13) (2003), S. 3812–4.

[97] GRANTHAM, R: Amino acid difference formula to help explain protein evolution. In: *Science* 185(4154) (1974), S. 862–4.

[98] DAVYDOV, EV ; GOODE, DL ; SIROTA, M ; COOPER, GM ; SIDOW, A ; BATZOGLOU, S: Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. In: *PLoS Comput Biol* 6(12) (2010). – Doi: 10.1371/journal.pcbi.1001025.

[99] SCHWARZ, JM ; RÖDELSPERGER, C ; SCHUELKE, M ; SEELOW, D: MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. In: *Nat Methods.* 7(8) (2010), S. 575–6.

[100] MARCHLER-BAUER, A ; ZHENG, C ; CHITSAZ, F ; DERBYSHIRE, MK ; GEER, LY ; GEER, RC ; GONZALES, NR ; GWADZ, M ; HURWITZ, DI ; LANCZYCKI, CJ ; LU, F ; LU, S ; MARCHLER, GH ; SONG, JS ; THANKI, N ; YAMASHITA, RA ; ZHANG, D ; BRYANT, SH: CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. In: *Nucleic Acids Res* 41(D1) (2013), S. 348–52.

[101] HU, H ; WIENKER, TF ; MUSANTE, L ; KALSCHEUER, V ; ROBINSON, PN ; ROPERS, HH: Integrated sequence analysis pipeline provides one-stop solution for identifying disease-causing mutations. (unveröffentlicht)

[102] AKIZU, N ; SHEMBESH, NM ; BEN-OMRAN, T ; BASTAKI, L ; AL-TAWARI, A ; ZAKI, MS ; KOUL, R ; SPENCER, E ; ROSTI, RO ; SCOTT, E ; NICKERSON, E ; GABRIEL, S ; DA GENTE, G ; LI, J ; DEARDORFF, MA ; CONLIN, LK ; HORTON, MA ; ZACKAI, EH ; SHERR, EH ; GLEESON, JG: Whole-exome sequencing identifies mutated c12orf57 in recessive corpus callosum hypoplasia. In: *Am J Hum Genet* 92 (2013), S. 392–400.

[103] TEMTAMY, SA ; ABDEL SALAM, M ; ABOUL-EZZ, EHA ; HUSSEIN, HA ; HELMY, SMH ; SHALASH, BA: A new autosomal recessive MCA/MR syndrome with craniofacial dysmorphism, absent corpus callosum, iris colobomas and connective tissue dysplasia. In: *Am J Hum Genet* 49 (1991), S. 167.

[104] CHAN, AKJ ; LEVIN, AV ; TEEBI, AS: Craniofacial dysmorphism, agenesis of the corpus callosum and ocular colobomas: Temtamy syndrome? In: *Clin. Dysmorph* 9 (2000), S. 223–6.

[105] LI, J ; SHIVAKUMAR, S ; WAKAHIRO, M ; MUKHERJEE, P ; BARKOVICH, AJ ; SLAVOTINEK, A ; SHERR, EH: Agenesis of the corpus callosum, optic coloboma, intractable seizures, craniofacial and skeletal dysmorphisms: an autosomal recessive disorder similar to Temtamy syndrome. In: *Am. J. Med. Genet.* 143A (2007), S. 1900–5.

[106] ZAHRANI, F ; ALDAHMESH, MA ; ALSHAMMARI, MJ ; AL-HAZZAA, SAF ; ALKURAYA, FS: Mutations in C12orf57 cause a syndromic form of colobomatous microphthalmia. In: *Am J Hum Genet* 92 (2013), S. 387–91.

[107] KAPP, LD ; LORSCH, JR: The molecular mechanics of eukaryotic translation. In: *Annu Rev Biochem* 73 (2004), S. 657–704.

[108] WOLF, A ; CALIEBE, A ; THOMAS, NS ; BALL, EV ; MORT, M ; STENSON, PD ; KRAWCZAK, M ; COOPER, DN: Single base-pair substitutions at the translation initiation sites of human genes as a cause of inherited disease. In: *Hum Mutat* 32(10) (2011), S. 1137–43.

[109] RUSSELL, MW ; RAEKER, MO ; KORYTKOWSKI, KA ; SONNEMAN, KJ: Identification, tissue expression and chromosomal localization of human Obscurin-MLCK, a member of the titin and Dbl families of myosin light chain kinases. In: *Gene* 282 (2002), S. 237–46.

[110] BERGER, SL: The complex language of chromatin regulation during transcription. In: *Nature* 447(7143) (2007), S. 407–12.

[111] ALBIG, W ; EBENTHEUER, J ; KLOBECK, G ; KUNZ, J ; DOENECKE, D: A solitary human H3 histone gene on chromosome 1. In: *Hum Genet* 97(4) (1996), S. 486–91.

[112] HAKE, SB ; GARCIA, BA ; DUNCAN, EM ; KAUER, M ; DELLAIRE, G ; SHABANOWITZ, J ; BAZETT-JONES, DP ; ALLIS, CD ; HUNT, DF: Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. In: *J Biol Chem* 281(1) (2006), S. 559–68.

[113] LEE, IC ; EL-HATTAB, AW ; WANG, J ; LI, FY ; WENG, SW ; CRAIGEN, WJ ; WONG, LJ: SURF1-associated Leigh syndrome: a case series and novel mutations. In: *Hum Mutat* 33(8) (2012), S. 1192–200.

[114] BERGWITZ, C ; ROSLIN, NM ; TIEDER, M ; LOREDO-OSTI, JC ; BASTEPE, M ; ABU-ZAHRA, H ; FRAPPIER, D ; BURKETT, K ; CARPENTER, TO ; ANDERSON, D ; GARABEDIAN, M ; SERMET, I ; FUJIWARA, TM ; MORGAN, K ; TENENHOUSE, HS ; JUPPNER, H: SLC34A3 mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria predict a key role for the sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIc in maintaining phosphate homeostasis. In: *Am J Hum Genet* 78(2) (2006), S. 179–92.

[115] KIM, C ; JUN, K ; LEE, T ; KIM, SS ; MCENERY, MW ; CHIN, H ; KIM, HL ; PARK, JM ; KIM, DK ; JUNG, SJ ; KIM, J ; SHIN, HS: Altered nociceptive response in mice deficient in the alpha(1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel. In: *Mol Cell Neurosci* 18(2) (2001), S. 235–45.

[116] HAMPSHIRE, DJ ; AYUB, M ; SPRINGELL, K ; ROBERTS, E ; JAFRI, H ; RASHID, Y ; BOND, J ; RILEY, JH ; WOODS, CG: MORM syndrome (mental retardation, truncal obesity, retinal dystrophy and micropenis), a new autosomal recessive disorder, links to 9q34. In: *Eur J Hum Genet* 14(5) (2006), S. 543–8

[117] BIELAS, SL ; SILHAVY, JL ; BRANCATI, F ; KISSELEVA, MV ; AL-GAZALI, L ; SZTRIHA, L ; BAYOUMI, RA ; ZAKI, MS ; ABDEL-ALEEM, A ; ROSTI, RO ; KAYSERILI, H ; SWISTUN, D ; SCOTT, LC ; BERTINI, E ; BOLTSHAUSER, E ; FAZZI, E ; TRAVAGLINI, L ; FIELD, SJ ; GAYRAL, S ; JACOBY, M ; SCHURMANS, S ; DALLAPICCOLA, B ; MAJERUS, PW ; VALENTE, EM ; GLEESON, JG: Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidyl inositol signaling to the ciliopathies. In: *Nat Genet* 41(9) (2009), S. 1032–6.

[118] MURPHY, KE ; COTTLE, L ; GYSBERS, AM ; COOPER, AA ; HALLIDAY, GM: ATP13A2 (PARK9) protein levels are reduced in brain tissue of cases with Lewy bodies. In: *Acta Neuropathol Commun* 1(1) (2013), S. 11.

[119] BRÜGGEMANN, N ; HAGENAH, J ; REETZ, K ; SCHMIDT, A ; KASTEN, M ; BUCHMANN, I ; ECKERLE, S ; BÄHRE, M ; MÜNCHAU, A ; DJARMATI, A ; VAN DER VEGT, J ; SIEBNER, H ; BINKOFSKI, F ; RAMIREZ, A ; BEHRENS, MI ; KLEIN, C: Recessively inherited parkinsonism: effect of ATP13A2 mutations on the clinical and neuroimaging phenotype. In: *Arch Neurol* 67(11) (2010), S. 1357–63.

[120] KIVIRIKKO, S ; MCGRATH, JA ; BAUDOIN, C ; ABERDAM, D ; CIATTI, S ; DUNNILL, MG ; MCMILLAN, JR ; EADY, RA ; ORTONNE, JP ; MENEGUZZI, G: A homozygous nonsense mutation in the alpha 3 chain gene of laminin 5 (LAMA3) in lethal (Herlitz) junctional epidermolysis bullosa. In: *Hum Mol Genet* 4(5) (1995), S. 959–62.

[121] BARZEGAR, M ; MOZAFARI, N ; KARIMINEJAD, A ; ASADIKANI, Z ; OZOEMENA, L ; MCGRATH, JA: A new homozygous nonsense mutation in LAMA3A underlying laryngo-onycho-cutaneous syndrome. In: *Br J Dermatol* 169(6) (2013), S. 1353–6.

[122] HAWKES, NA ; OTERO, G ; WINKLER, GS ; MARSHALL, N ; DAHMUS, ME ; KRAPPMANN, D ; SCHEIDEREIT, C ; THOMAS, CL ; SCHIAVO, G ; ERDJUMENT-BROMAGE, H ; TEMPST, P ; SVEJSTRUP, JQ: Purification and characterization of the human elongator complex. In: *J Biol Chem* 277(4) (2002), S. 3047–52.

[123] COLLUM, RG ; BRUTSAERT, S ; LEE, G ; SCHINDLER, C: A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 97(18) (2000), S. 10120–5.

[124] ZARA, F ; BIANCHERI, R ; BRUNO, C ; BORDO, L ; ASSERETO, S ; GAZZERRO, E ; SOTGIA, F ; WANG, XB ; GIANOTTI, S ; STRINGARA, S ; PEDEMONTE, M ; UZIEL, G ; ROSSI, A ; SCHENONE, A ; TORTORI-DONATI, P ; VAN DER KNAAP, MS ; LISANTI, MP ; MINETTI, C: Deficiency of hyccin, a newly identified membrane protein, causes hypomyelination and congenital cataract. In: *Nat Genet* 38(10) (2006), S. 1111–3.

[125] BIANCHERI, R ; ZARA, F ; BRUNO, C ; ROSSI, A ; BORDO, L ; GAZZERRO, E ; SOTGIA, F ; PEDEMONTE, M ; SCAPOLAN, S ; BADO, M ; UZIEL, G ; BUGIANI, M ; LAMBA, LD ; COSTA, V ; SCHENONE, A ; ROZEMULLER, AJ ; TORTORI-DONATI, P ; LISANTI, MP ; VAN DER KNAAP, MS ; MINETTI, C: Phenotypic characterization of hypomyelination and congenital cataract. In: *Ann Neurol* 62(2) (2007), S. 121–7.

[126] KAWASOE, T ; FURUKAWA, Y ; DAIGO, Y ; NISHIWAKI, T ; ISHIGURO, H ; FUJITA, M ; SATOH, S ; MIWA, N ; NAGASAWA, Y ; MIYOSHI, Y ; OGAWA, M ; NAKAMURA, Y:

Isolation and characterization of a novel human gene, DRCTNNB1A, the expression of which is down-regulated by beta-catenin. In: *Cancer Res* 60(13) (2000), S. 3354–8.

[127] ALAZAMI, AM ; AL-OWAIN, M ; ALZAHRANI, F ; SHUAIB, T ; AL-SHAMRANI, H ; AL-FALKI, YH ; AL-QAHTANI, SM ; ALSHEDDI, T ; COLAK, D ; ALKURAYA, FS: Loss of function mutation in LARP7, chaperone of 7SK ncRNA, causes a syndrome of facial dysmorphism, intellectual disability, and primordial dwarfism. In: *Hum Mutat* 33(10) (2012), S. 1429–34.

[128] LENHARD, W ; BREITENBACH, E ; EBERT, H ; SCHINDELHAUER-DEUTSCHER, HJ ; HENN, W: Psychological benefit of diagnostic certainty for mothers of children with disabilities: lessons from Down syndrome. In: *Am J Med Genet A* 133A(2) (2005), S. 170–5.

[129] EMERICK, JE ; VOGT, KS: Endocrine manifestations and management of Prader-Willi syndrome. In: *Int J Pediatr Endocrinol* (1)14 (2013). – Doi: 10.1186/1687-9856-2013-14.

[130] BETTELHEIM, D ; KOLINEK, B ; SCHALLER, A ; BERNASCHEK, G: Zur Komplikationsrate bei invasiven, intrauterinen Eingriffen an einer pränataldiagnostischen Schwerpunktabteilung. In: *Ultraschall Med* 23(2) (2002), S. 119–22.

[131] AKOLEKAR, R ; BETA, J ; PICCIARELLI, G ; OGILVIE, C ; D'ANTONIO, F: Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. In: *Ultrasound Obstet Gynecol* (2014). – Doi: 10.1002/uog.14636.

[132] KITZMAN, JO ; SNYDER, MW ; VENTURA, M ; LEWIS, AP ; QIU, R ; SIMMONS, LE ; GAMMILL, HS ; RUBENS, CE ; SANTILLAN, DA ; MURRAY, JC ; TABOR, HK ; BAMSHAD, MJ ; EICHLER, EE ; SHENDURE, J: Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus. In: *Sci Transl Med* 4(137) (2012). – Doi: 10.1126/scitranslmed.3004323.

[133] KLEEFSTRA, T ; HAMEL, BC: X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. In: *Clin Genet* 67(6) (2005), S. 451–67.

[134] BEAULIEU, CL ; MAJEWSKI, J ; SCHWARTZENTRUBER, J ; SAMUELS, ME ; FERNANDEZ, BA ; BERNIER, FP ; BRUDNO, M ; KNOPPERS, B ; MARCADIER, J ; DYMENT, D ; ADAM, S ; BULMAN, DE ; JONES, SJM ; AVARD, D ; NGUYEN, MT ; ROUSSEAU, F ; MARSHALL, C ; WINTLE, RF ; SHEN, Y ; SCHERER, SW ; FRIEDMAN, JM ; MICHAUD, JL ; BOYCOTT, KM: FORGE Canada Consortium: Outcomes of a 2-Year National Rare-Disease Gene-Discovery Project. In: *Am J Hum Genet* 94 (2014), S. 809–17.

[135] FITZSIMMONS, JS ; GUILBERT, PR: Spastic paraplegia associated with brachydactyly and cone shaped epiphyses. In: *J Med Genet* 24(11) (1987), S. 702–5.

[136] HENNEKAM, RC: Spastic paraplegia, dysarthria, brachydactyly, and cone shaped epiphyses: confirmation of the Fitzsimmons syndrome. In: *J Med Genet* 31(3) (1994), S. 251–2.

[137] LACASSIE, Y ; ARRIAZA, MI ; DUNCAN, MC ; DIJAMCO, C ; MCELVEEN, C ; STAHLS, PF: Identical twins with mental retardation, dysarthria, progressive spastic paraplegia, and brachydactyly type E: a new syndrome or variant of Fitzsimmons-Guilbert syndrome? In: *Am J Med Genet* 84(2) (1999), S. 90–3.

[138] ARMOUR, CM ; HUMPHREYS, P ; HENNEKAM, RC ; BOYCOTT, KM: Fitzsimmons syndrome: spastic paraplegia, brachydactyly and cognitive impairment. In: *Am J Med Genet A* 149A(10) (2009), S. 2254–7.

[139] ARTS, H ; KNOERS, N ; PAGON, RA (Hrsg.) ; ADAM, MP (Hrsg.) ; ARDINGER, HH (Hrsg.) ; BIRD, TD (Hrsg.) ; DOLAN, CR (Hrsg.) ; FONG, CT (Hrsg.) ; SMITH, RJH (Hrsg.) ; STEPHENS, K (Hrsg.): *Cranioectodermal Dysplasia.* GeneReviews®[Internet]. University of Washington, Seattle; 1993-2014. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK154653, 2013.

[140] HENNEKAM, RCM: What to call a syndrome. In: *Am J Med Genet A* 143A(10) (2007), S. 1021–4.

[141] ROPERS, HH: On the future of genetic risk assessment. In: *J Community Genet* 3(3) (2012), S. 229–36.

[142] WHO: Community Genetics Services: Report of a WHO Consultation on Community Genetics in Low- and Middle-Income Countries, 2011.

[143] KINGSMORE, SF ; LANTOS, JD ; DINWIDDIE, DL ; MILLER, NA ; SODEN, SE ; FARROW, EG ; SAUNDERS, CJ: Next-generation community genetics for low- and middle-income countries. In: *Genome Medicine* 4(3) (2012), S. 25.

[144] CHATTOPADHYAY, S: 'Rakter dosh' - corrupting blood: The challenges of preventing thalassemia in Bengal, India. In: *Soc Sci Med* 63 (2006), S. 2661–73.

[145] KABACK, MM: Population-based genetic screening for reproductive counseling: the Tay-Sachs disease model. In: *Eur J Pediatr* 159 (2000), S. 192–5.

[146] HAMAMY, H ; ANTONARAKIS, SE ; CAVALLI-SFORZA, LL ; TEMTAMY, S ; ROMEO, G ; KATE, LP ; BENNETT, RL ; SHAW, A ; MEGARBANE, A ; DUIJN, C van ; BATHIJA, H ; FOKSTUEN, S ; ENGEL, E ; ZLOTOGORA, J ; DERMITZAKIS, E ; BOTTANI, A ; DAHOUN, S ; MORRIS, MA ; ARSENAULT, S ; AGLAN, MS ; AJAZ, M ; ALKALAMCHI, A ; ALNAQEB, D ; ALWASIYAH, MK ; ANWER, N ; AWWAD, R ; BONNEFIN, M ; CORRY, P ; GWANMESIA, L ; KARBANI, GA ; MOSTAFAVI, M ; PIPPUCCI, T ; RANZA-BOSCARDIN,

E ; REVERSADE, B ; SHARIF, SM ; TEEUW, ME ; BITTLES, AH: Consanguineous marriages, pearls and perils: Geneva International Consanguinity Workshop Report. In: *Genet Med* 13(9) (2011), S. 841–7.

[147] ZLOTOGORA, J ; SHALEV, SA: The consequences of consanguinity on the rates of malformations and major medical conditions at birth and in early childhood in inbred populations. In: *Am J Med Genet A* 152A (2010), S. 2023–8.

[148] KINGSMORE, S: Comprehensive carrier screening and molecular diagnostic testing for recessive childhood diseases. In: *PLOS Currents Evidence on Genomic Tests* (2012). – Doi: 10.1371/4f9877ab8ffa9.

[149] UMBARGER, MA ; KENNEDY, CJ ; SAUNDERS, P ; BRETON, B ; CHENNAGIRI, N ; EMHOFF, J ; GREGER, V ; HALLAM, S ; MAGANZINI, D ; MICALE, C ; NIZZARI, MM ; TOWNE, CF ; CHURCH, GM ; PORRECA, GJ: Next-generation carrier screening. In: *Genet Med* 16(2) (2014), S. 132–40.

[150] BIESECKER, LG: Phenotype matters. In: *Nature Genetics* 36 (2004), S. 323–4.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Hoffer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Kranioektodermale Dysplasie und Intelligenzminderung - molekulargenetische Untersuchungen bei zwei autosomal-rezessiv vererbten Krankheitsbildern' selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe ‚Uniform Requirements for Manuscripts (URM)' des ICMJE -*www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.
Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Erstautorin oder Koautorin bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Berlin, den 06.03.2015

Julia Hoffer

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Julia Leonie Hoffer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:
Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P, Zecha A, Mohseni M, Püttmann L, Vahid LN, Jensen C, Moheb LA, Bienek M, Larti

F, Mueller I, Weissmann R, Darvish H, Wrogemann K, Hadavi V, Lipkowitz B, Esmaeeli-Nieh S, Wieczorek D, Kariminejad R, Firouzabadi SG, Cohen M, Fattahi Z, Rost I, Mojahedi F, Hertzberg C, Dehghan A, Rajab A, Banavandi MJ, Hoffer J, Falah M, Musante L, Kalscheuer V, Ullmann R, Kuss AW, Tzschach A, Kahrizi K, Ropers HH.
Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders.
Nature. 2011 Sep 21;478(7367):57-63.

Beitrag im Einzelnen: Julia Hoffer hat bei den in dieser Dissertation aufgeführten Familien, welcher Teil der o.g. Publikation sind, die vorangehenden Untersuchungen in Diskussion und Auswertung begleitet (Kopplungsanalyse, Next-Generation Sequencing, Pathogenitätsanalyse) und die folgenden, in dieser Dissertation aufgeführten, Arbeiten bei den betreffenden Familien durchgeführt: Aufreinigung der DNA, PCR, Gelelektrophorese und Vorbereitung Kapillarelektrophorese der fraglichen Mutationen. Die Ergebnisse dieser Diagnostik sind in die Publikation eingeflossen.

Publikation 2:
Hoffer JL, Fryssira H, Konstantinidou AE, Ropers HH, Tzschach A.
Novel WDR35 mutations in patients with cranioectodermal dysplasia (Sensenbrenner syndrome).
Clinicial Genetics. 2013 Jan;83(1):92-5.

Beitrag im Einzelnen: Julia Hoffer hat die beschriebene Analyse des Gens *WDR35* in einer von Prof. Dr. Tzschach bereits zusammengetragenen größeren Patientenkohorte selbstständig durchgeführt. Nach Analyse der Ergebnisse wurde der Artikel zu den beiden identifizierten Mutationen in *WDR35* bei zwei Patientinnen verfasst und nach Korrektur durch Prof. Dr. Andreas Tzschach gemeinsam zur Publikation eingereicht.

Berlin, den 06.03.2015

Prof. Dr. Stefan Mundlos

Julia Hoffer

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P, Zecha A, Mohseni M, Püttmann L, Vahid LN, Jensen C, Moheb LA, Bienek M, Larti F, Mueller I, Weissmann R, Darvish H, Wrogemann K, Hadavi V, Lipkowitz B, Esmaeeli-Nieh S, Wieczorek D, Kariminejad R, Firouzabadi SG, Cohen M, Fattahi Z, Rost I, Mojahedi F, Hertzberg C, Dehghan A, Rajab A, Banavandi MJ, Hoffer J, Falah M, Musante L, Kalscheuer V, Ullmann R, Kuss AW, Tzschach A, Kahrizi K, Ropers HH. Nature. 2011 Sep 21;478(7367):57-63.

2. Novel WDR35 mutations in patients with cranioectodermal dysplasia (Sensenbrenner syndrome). Hoffer JL, Fryssira H, Konstantinidou AE, Ropers HH, Tzschach A. Clin Genet. 2013 Jan;83(1):92-5.

Danksagung

Herzlich und zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Mundlos bedanken, dem Leiter des Instituts für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité Universitätsmedizin Berlin und Leiter der Abteilung Entwicklung & Krankheit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin, der mir die Möglichkeit gab zu diesem spannenden Thema zu arbeiten und als Doktorvater diese Arbeit von Beginn an unterstützte.
Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die umfassende Unterstützung, die mir im Rahmen eines Promotionsstipendiums zuteilwurde.
Die Ergebnisse dieser Arbeit wären ohne die Mitarbeit vieler nicht zu erheben gewesen. Dr. Hao Hu danke ich vielmals für die Durchführung und Auswertung der Pathogenitätsanalyse bei den identifizierten Kandidatengenen. Dr. Masoud Garshasbi danke ich besonders für die Durchführung der Kopplungsanalyse. Dr. Luciana Musante und M. Sc. Robert Weissmann danke ich für ihre Ratschläge und Anregungen bei der Niederschreibung der Arbeit. Für die Unterstützung sowie stete und unkomplizierte Hilfsbereitschafts im Labor, bei der Nutzung der verschiedenen Geräte und Fehleranalysen, sowie der immer hilfreichen Gespräche danke ich Susanne Freier und Dr. Lucia Püttmann. Den vielen Mitarbeitenden der unterschiedlichen Abteilungen im Max-Planck-Institut danke ich für die freundliche und unterstützende Arbeitsatmosphäre, die unkomplizierte Hilfe und Bereitschaft, Erfahrung und Wissen zu teilen.
Ich bedanke mich bei allen Kooperationspartnern in und außerhalb des Max-Planck-Instituts, die an der Entstehung der Arbeit beteiligt waren: Prof. Hossein Najmabadi, Prof. Kimia Kahrizi und ihren Kollegen am Genetics Research Center, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences (Tehran, Iran), für die Betreuung der Patienten und Erhebung von klinischen Daten und Blutproben für die Studien zur autosomal-rezessiv vererbten Intelligenzminderung; den Ärzten für die Zuweisung, Hilfe und Kooperation bei den Patienten mit Kranioektodermaler Dysplasie.
Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers und Prof. Dr. Thomas Wienker danke ich für die intensive Betreuung bei der Entstehung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, in ihrem Labor arbeiten zu dürfen. Für die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen und dem Interesse am Fortgang meiner Arbeit danke ich beiden gleichermaßen sowie Prof. Andreas Tzschach, der mich in die wissenschaftliche Arbeit einführte.
Mein besonderer Dank gilt allen Patient_Innen und ihren Familien, die sich zur Teilnahme an dieser Arbeit bereit erklärt haben.
Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die stete Ermutigung und Unterstützung bei dieser langjährigen Arbeit.