

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen
Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik

**Identifizierung neuer Kandidatengene
in Patienten mit autosomal-rezessiver
mentaler Retardierung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Sommerfeld, Julia**

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtserstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichtserstatter: Professorin Dr. V. Nieratschker

Tag der Disputation: 04.06.2018

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	IV
III.	Tabellenverzeichnis.....	V
IV.	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1.	Einleitung.....	1
1.1	Krankheitsbild der mentalen Retardierung.....	1
1.1.1	Definition und Phänotyp.....	1
1.1.2	Diagnose und Klassifikation.....	2
1.1.3	Epidemiologie.....	2
1.1.4	Ursachen.....	2
1.1.4.1	Nicht-genetische Ursachen.....	3
1.1.4.2	Genetische Ursachen.....	3
1.1.5	Therapie.....	5
1.2	Next Generation Sequencing.....	6
1.3	Ziel der Arbeit.....	8
2.	Material und Methoden.....	9
2.1	Material.....	9
2.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	9
2.1.2	Chemikalien.....	9
2.1.3	Lösungen und Puffer.....	9
2.1.4	Kits.....	10
2.1.5	Längenstandards.....	10
2.1.6	Enzyme.....	10
2.1.7	Geräte.....	10
2.1.8	Software und Datenbanken.....	11
2.1.9	Primer.....	12
2.2	Methoden.....	13
2.2.1	Next Generation Sequencing.....	13
2.2.1.1	Whole Exome Sequencing.....	13
2.2.1.2	Aufbereitung der Daten.....	15
2.2.1.3	Filterung der Varianten.....	15
2.2.2	Analyse der gefilterten Varianten.....	17
2.2.2.1	Qualität der Sequenzierung.....	17

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.2	Literaturrecherche	17
2.2.2.3	Analyse der Pathogenität der Varianten	18
2.2.2.4	Analyse des Aminosäureaustausches	18
2.2.3	Analyse von CNV	19
2.2.3.1	Auffinden von CNVs mit dem Programm CnvHunter	19
2.2.3.2	Bestätigung der CNVs durch Array-Technologie	19
2.2.4	Methoden mit Verwendung von Nukleinsäuren.....	20
2.2.4.1	Extraktion der DNA aus Blutproben.....	20
2.2.4.2	Whole genome amplification mit dem REPLI-g Mini Kit.....	20
2.2.4.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
2.2.4.4	Gelelektrophorese.....	24
2.2.4.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	25
2.2.4.6	Sequenzierung	25
2.2.4.7	RNA-Extraktion aus PAXgene-Blutproben	27
2.2.4.8	Reverse Transkription	28
2.2.4.9	Quantitative Real Time PCR (qPCR).....	29
3.	Untersuchungskollektiv.....	31
4.	Ergebnisse	34
4.1	Exomsequenzierung von 26 Betroffenen mit mentaler Retardierung	34
4.2	Analyse gefundener Varianten	34
4.3	Identifizierung einer Mutation in DENND5A in Familie TF016.....	35
4.3.1	Phänotyp der Betroffenen aus Familie TF016	35
4.3.2	Exomsequenzierung Familie TF016	36
4.3.3	Phänotyp und Exomsequenzierung Familie I.....	37
4.3.4	Expression von DENND5A in TF016_1.....	38
4.3.5	Die Rolle von DENND5A in der neuronalen Entwicklung	39
4.4	Identifizierung einer Mutation in DNAJC6 in Familie TF018.....	42
4.4.1	Phänotyp Familie TF018.....	42
4.4.2	Exomsequenzierung Familie TF018	43
4.4.3	Sanger-Sequenzierung Familie TF018.....	44
4.4.4	Untersuchung des Spleißens von DNAJC6.....	45
4.5	Identifizierung einer Mutation in NT5C2 in Familie TF004.....	48
4.5.1	Phänotyp Familie TF004.....	48
4.5.2	Exomsequenzierung Familie TF004	49
4.5.3	Sanger-Sequenzierung Familie TF004.....	50
4.6	Identifizierung von Varianten in PTPRD in Familie TF020	51

Inhaltsverzeichnis

4.6.1	Phänotyp Familie TF020.....	51
4.6.2	Exomsequenzierung TF020.....	52
4.6.3	Sanger-Sequenzierung TF020.....	52
4.7	Familie TF023.....	54
4.7.1	Phänotyp TF023.....	54
4.7.2	Exomsequenzierung TF023.....	55
4.7.3	Sanger-Sequenzierung TF023.....	56
4.8	CNV-Analyse.....	57
4.9	Identifizierung eines CNV in Familie TF003.....	57
4.9.1	Phänotyp TF003.....	57
4.9.2	Identifizierung eines CNV.....	58
5.	Diskussion.....	60
5.1	Identifizierung von Kandidatengen für MR mittels NGS.....	60
5.2	Identifizierung einer Mutation in DENND5A in Familie TF016 und Familie 1.....	60
5.2.1	DENND5A als Kandidatengen für mentale Retardierung.....	61
5.2.2	Störungen des Vesikeltransports führen zu MR.....	62
5.2.3	Rolle von DENND5A in der neuronalen Differenzierung.....	64
5.3	Identifizierung einer Mutation in DNAJC6 in Familie TF018.....	65
5.4	Identifizierung einer Mutation in NT5C2 in Familie TF004.....	68
5.5	Identifizierung von Mutationen in PTPRD in Familie TF020.....	69
5.6	Diskussion Familie TF023.....	70
5.7	Identifizierung von CNV mit NGS.....	70
5.8	Identifizierung einer Deletion in Familie TF003.....	71
5.8.1	Vergleich der Phänotypen und Phänotyp-Genotyp-Korrelation.....	72
5.9	Fazit und Ausblick.....	75
5.9.1	Identifizierung von Kandidatengen für MR mithilfe von NGS.....	75
5.9.2	Identifizierung von CNVs mittels NGS.....	76
5.9.3	Ausblick.....	77
6.	Zusammenfassung.....	78
7.	Literaturverzeichnis.....	80
8.	Erklärung zum Eigenanteil.....	94
9.	Veröffentlichungen.....	95
10.	Danksagung.....	96

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Brückenamplifikation und Entstehung der Cluster	14
Abbildung 2: Stammbaum Familie TF016.....	36
Abbildung 3: Ergebnis Sequenzierung TF016.....	37
Abbildung 4: Expression von DENND5A in PAXgene RNA von dem Betroffenen TF016_1 und gesunden Kontrollen.	39
Abbildung 6: Stammbaum Familie TF019.....	43
Abbildung 7: Ergebnis Sequenzierung TF018.....	45
Abbildung 8: Alternatives Spleißen von DNAJC6 in TF018_1.....	46
Abbildung 9: Schema des alternativen Spleißens von DNAJC6 in der Betroffenen TF018_1...	47
Abbildung 10: Stammbaum Familie TF004.....	49
Abbildung 11: Ergebnis Sequenzierung Familie TF004.....	50
Abbildung 12: Stammbaum Familie TF020.....	51
Abbildung 13: Ergebnis Sequenzierung Familie TF020, Mutation c.2533C>T in PTPRD in Exon 28	53
Abbildung 14: Ergebnis Sequenzierung Familie TF020, Mutation c.4690A>G in PTPRD in Exon 40	53
Abbildung 15: Stammbaum Familie TF023.....	55
Abbildung 16: Stammbaum Familie TF003.....	58
Abbildung 17: Ergebnis des CytoScan7590 K Array: Deletion auf Chromosom 4q21.22-21.23 bei TF003_1	59
Abbildung 18: Domänen in DENND5A	61
Abbildung 19: Deletion auf Chromosom 4q21.22-21.23 bei TF003_1 und Vergleich mit minimal kritischer Region des 4q21 Mikrodeletion Syndroms.....	72

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Phänotypen aller Patienten	31
Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl der Varianten nach Filterung.....	34
Tabelle 3: Übersicht über die Phänotypen der bisher identifizierten Patienten mit Mutation in DENND5A.....	64
Tabelle 4: Übersicht über die Phänotypen der bisher identifizierten Patienten mit Mutation in DNAJC6.....	67
Tabelle 5: Übersicht über die Phänotypen der Patienten mit identifizierter partieller Deletion der kritischen Region des 14q21 Mikrodeletionssyndrom.....	74

IV. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
ADMR	autosomal-dominante mentale Retardierung
ALP	Alkalische Phosphatase
ARMR	autosomal-rezessive mentale Retardierung
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CNV	<i>Copy number variation</i> , Kopienzahlvariante
cDNA	komplementäre DNA
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CT	Computertomographie
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
Del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
hg19	Human Genome Issue HG-19, GRCh37
IQ	Intelligenzquotient
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar
m	männlich
min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
mg	Milligramm
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MR	Mentale Retardierung
MRT	Magnetresonanztomographie
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NMD	<i>nonsense mediated mRNA decay</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RQ	relative Expression
s	Sekunde
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	ultraviolett
w	weiblich
WES	<i>Whole-Exome-Sequencing</i>
WGS	<i>Whole-Genome-Sequencing</i>

1. Einleitung

Die mentale Retardierung (MR) stellt nicht nur für die betroffenen Patienten und ihre Angehörigen eine lebenslange Herausforderung dar, sondern auch für die Gesellschaft, das Gesundheitssystem und die Forschung. Noch immer gibt es auch in den hoch entwickelten Industriestaaten eine inadäquate Versorgung und gesellschaftliche Integration von Menschen mit mentaler Retardierung (Lecomte et al., 2008). Ebenso ergeben sich oft Schwierigkeiten in der genetischen Diagnosefindung der mentalen Retardierung, was den weiteren Forschungsbedarf in diesem Bereich aufzeigt.

1.1 Krankheitsbild der mentalen Retardierung

1.1.1 Definition und Phänotyp

Nach Definition der ICD-10-Klassifikation ist die mentale Retardierung oder Intelligenzstörung (F70-F79 nach ICD-10) gekennzeichnet durch eine Beeinträchtigung geistiger Fähigkeiten, die sich in Einschränkungen der Kognition und Sprache, sowie des sozialen und adaptiven Verhaltens zeigt. Die Intelligenzstörung wird dabei durch einen herabgesetzten Intelligenzquotienten definiert (World Health Organisation, 2016). Die Einschränkungen treten während der Entwicklung in Kindheit oder Adoleszenz auf. Der Phänotyp der mentalen Retardierung ist sehr heterogen, zum einen bezüglich der Ausprägung der Intelligenzeinschränkung, zum anderen bezüglich oft auftretender zusätzlicher Symptome (Vissers et al., 2016). Allgemein wird zwischen der syndromalen oder spezifischen und der nicht-spezifischen Form der mentalen Retardierung unterschieden. Bei der syndromalen Form der mentalen Retardierung treten neben der geistigen Behinderung weitere Symptome wie Fehlbildungen oder motorische Störungen auf. Des Weiteren zeigen über 30 % der Patienten mit mentaler Retardierung eine komorbide psychiatrische Krankheit (Cooper et al., 2007; Deb et al., 2009). Bei der nicht-spezifischen Form steht die mentale Retardierung als einziges klinisches Zeichen im Vordergrund. Eine genaue Unterscheidung zwischen syndromaler und nicht-spezifischer Form der mentalen Retardierung gestaltet sich in der Praxis allerdings häufig schwierig. Zusätzliche, mildere Symptome sind oftmals unspezifisch oder aufgrund der Intelligenzminderung nur eingeschränkt diagnostizierbar. Insofern ist die Grenze zwischen syndromaler und nicht-spezifischer Form der mentalen

Retardierung nicht eindeutig zu ziehen und die Einteilung nur bedingt sinnvoll (Kaufman et al., 2010; Musante and Ropers, 2014).

1.1.2 Diagnose und Klassifikation

Die Diagnose und Einteilung des Schweregrades der mentalen Retardierung erfolgt anhand des Intelligenzquotienten (IQ).

Allgemein liegt unter einem IQ von 70 eine Intelligenzstörung vor. Nach ICD-10 wird eine weitere Einteilung in leichte (IQ 50-69), mittelgradige (IQ 35-49), schwere (IQ 20-34) und schwerste Intelligenzminderung (IQ < 20) vorgenommen (World Health Organisation, 2016).

Es ist darauf hinzuweisen, dass von einer starren Schweregradeinteilung allein anhand des IQs zunehmend abgesehen wird und stattdessen der Mensch mit seinen individuellen Symptomen in den Vordergrund rückt. So wird etwa nach der neusten Version des psychiatrischen Klassifikationssystems DSM der Schweregrad einer mentalen Retardierung nicht allein aufgrund der IQ-Werte als zwingend diagnostisches Kriterium beurteilt, sondern auch anhand der klinisch beobachtbaren funktionellen Einschränkungen des Betroffenen (American Psychiatric Association, 2013).

1.1.3 Epidemiologie

Die Prävalenz der mentalen Retardierung beträgt weltweit durchschnittlich 1-3 % (Rauch et al., 2006; Maulik et al., 2011; Vissers et al., 2016). In Entwicklungsländern liegt die Prävalenz höher. Dies ist auf schlechtere gesundheitliche Umstände und Versorgung, die zu einem die Gesundheit von Mutter und Kind beeinträchtigen kann, zum anderen umfassende pränatale Diagnostik verhindert, zurückzuführen (Maulik et al., 2011). 85 % der Patienten sind von einer milden mentalen Retardierung betroffen, 10 % zeigen eine moderate und 4 % bzw. 2 % eine schwere bzw. schwerste mentale Retardierung (Maulik et al., 2011).

1.1.4 Ursachen

Die Ursachen der mentalen Retardierung sind ähnlich divers wie das klinische Erscheinungsbild dieser Krankheit und umfassen sowohl nicht-genetische als auch genetische Ursachen. Trotz extremer Fortschritte in der genetischen Diagnostik und der

klinischen Erkennung nicht-genetischer Ursachen bleiben in bis zu 30-45 % der Fälle von moderater und schwerer mentaler Retardierung die Gründe bisher unbekannt (Vissers et al., 2016).

1.1.4.1 Nicht-genetische Ursachen

Zu den häufigsten nicht-genetischen Ursachen von mentaler Retardierung zählen externe Faktoren wie prä- und postnatale Infektionen, perinatale Hypoxie, Missbrauch von Alkohol oder anderen teratogenen Substanzen während der Schwangerschaft, Mangelernährung während der Schwangerschaft und Geburtstraumata (van Bokhoven, 2011; Vissers et al., 2016). Viele dieser Ursachen können insbesondere in den Industriestaaten durch Präventionsmaßnahmen immer mehr verhindert werden. So konnte zum Beispiel die Zahl der Säuglinge mit kongenitalem Rubella-Syndrom in den USA durch Einführung der Impfung gegen das Rubella-Virus in den 1960er Jahren stark reduziert werden (Silverman, 2009).

1.1.4.2 Genetische Ursachen

1.1.4.2.1 Chromosomale Aberrationen

In bis zu 15 % der Fälle ist eine mentale Retardierung auf eine mikroskopisch sichtbare chromosomale Aberration zurückzuführen (Michelson et al., 2011; Vissers et al., 2016). Als häufigste Form der mentalen Retardierung gilt die Trisomie 21 (OMIM: #190685) (Lejeune et al., 1959; Vissers et al., 2016). Weitere häufige chromosomale Aberrationen stellen Aneusomien des X-Chromosoms und unbalancierte Translokation dar (van Bokhoven, 2011). Auch andere strukturelle Chromosomenaberrationen, wie bestimmte Mikrodeletionen, sind mit mentaler Retardierung assoziiert. Als Beispiele sind hier das Prader-Willi- und Angelman Syndrom (15q11.2-q13), das Williams-Beuren Syndrom (7q11.23) und das Smith-Magenis Syndrom (17p11.2) zu nennen. Durch die Entwicklung von Mikroarray-Methoden rücken auch Kopienzahlvarianten (*Copy number variations*, CNVs), die sich als kleinere Duplikationen oder Deletionen zeigen, immer mehr in den Fokus. Bis zu 15-20 % der Fälle von mentaler Retardierung scheinen durch CNVs verursacht zu sein (Cooper et al., 2011; Ellison et al., 2013).

1.1.4.2.2 X-chromosomale mentale Retardierung

Lange Zeit lag der Fokus der Forschung an genetischen Ursachen für mentale Retardierung auf dem X-Chromosom. Dieses Interesse wurde in den 1990er Jahren durch die Entdeckung des X-chromosomalen Gens *FMR-1* als Ursache für das fragile X-Syndrom (Verkerk et al., 1991) eingeleitet und durch die Tatsache, dass mentale Retardierung bei Männern 30 bis 50 % häufiger auftritt, verstärkt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, vergleichsweise einfach Kopplungsstudien in Familien mit nur männlichen Betroffenen durchzuführen, da weibliche Träger von X-chromosomalen Mutationen in der Regel gesund sind und somit die Mutation über mehrere Generationen fortgetragen werden kann (Ropers, 2010). Bis heute sind über 100 X-chromosomale Gene als monogene Ursache von mentaler Retardierung identifiziert, die insgesamt bis zu 10 % der Fälle von mentaler Retardierung in männlichen Patienten erklären (Lubs et al., 2012; Vissers et al., 2016).

1.1.4.2.3 Autosomale Formen der mentalen Retardierung

Im Vergleich zu X-chromosomalen Formen der mentalen Retardierung wurden autosomale Formen der mentalen Retardierung lange Zeit weniger erforscht, da hier die Kartierung der betroffenen Gene erschwert war. Die Entwicklung neuer Analysemethoden, insbesondere auch des *Next Generation Sequencing* (NGS), hat in den letzten Jahren allerdings zu enormen Fortschritten geführt.

Bei autosomal-dominanter mentaler Retardierung (ADMR) zeigt sich die Problematik, dass große Stammbäume für Kopplungsanalysen kaum zu Verfügung stehen, da sich Betroffene selten fortpflanzen. Insofern ist davon auszugehen, dass die meisten Mutationen *de novo*, d.h. erstmals in einer Familie aufgrund einer Neumutation in einer der Keimzellen oder der bereits befruchteten Eizelle auftreten (Ropers, 2010; Ellison et al., 2013). Für syndromale Formen von ADMR können oftmals CNVs als ursächlich aufgedeckt werden (Vissers and Stankiewicz, 2012; Vissers et al., 2016). Ursachen für nicht-syndromale ADMR können zum Beispiel durch Trioanalysen mit Sequenzierung der betroffenen Patienten und deren gesunden Eltern, bei denen insbesondere die *de novo* entstandenen Varianten beachtet werden, identifiziert werden (Ellison et al., 2013). Auch in der Erforschung autosomal-rezessiver mentaler Retardierung (ARMR) ergeben sich zumindest in westlichen Ländern Schwierigkeiten aufgrund kleiner Familien mit

Einleitung

wenig Konsanguinität innerhalb der Familie, in denen das Auftreten rezessiver Erkrankungen selten ist. Oftmals werden Forschungen zu ARMOR darum an konsanguinen Familien durchgeführt. Nachkommen dieser Familien zeigen mehr homozygote Regionen in ihrem Genom, die von einem gemeinsamen Vorfahren ihrer mütterlichen und väterlichen Seite abstammen, sodass die Wahrscheinlichkeit für rezessive Erkrankungen steigt. Die Familien eignen sich dabei auch gut für Genkartierungsstudien. Bei Betroffenen aus konsanguinen Familien können anhand bestimmter genetischer Marker Homozygotie-Kartierungen durchgeführt werden, sodass nur diese homozygoten Regionen auf Kandidatengene untersucht werden können. Diese vorherige Auswahl von Genregionen war insbesondere vor Zeiten des NGS notwendig, da hier die einzelnen Kandidatengene mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert werden mussten (Musante and Ropers, 2014). Methoden des NGS erlauben es nun auch, Familien ohne Kopplungsanalysen zu untersuchen, etwa wenn die Familien für solche Analysen nicht geeignet sind oder keine möglichen Kandidatengene aufgrund von vorheriger Auswahl bestimmter Regionen, zum Beispiel bei compound-heterozygoter Vererbung, übersehen werden sollen. Insgesamt hat das NGS die Suche nach Kandidatengen stark vereinfacht. In der Datenbank sysID, in der alle bisher identifizierten MR-Gene vermerkt sind, finden sich bereits 400 Gene für ARMOR (Kochinke et al., 2016). In Zukunft ist durch die vermehrte und verbesserte Forschung ein immer schnellerer Anstieg dieser Anzahl an Genen für ARMOR zu erwarten (Musante and Ropers, 2014; Vissers et al., 2016).

1.1.5 Therapie

Die Therapie der mentalen Retardierung gestaltet sich bis heute schwierig. Kausale Therapien sind nur selten möglich, sodass sich die Therapie vor allem auf Maßnahmen zur Förderung der kognitiven, sozialen und emotionalen Kompetenzen der Betroffenen und Behandlung zusätzlicher Symptome konzentriert (Picker and Walsh, 2013). Die Problematik von kausalen Therapien ergibt sich durch die oft vorhandene Unkenntnis der Gründe der mentalen Retardierung und durch die Tatsache, dass viele Formen von mentaler Retardierung durch Störungen der neuronalen Entwicklung und Funktion verursacht werden, die meist irreversibel sind (Vissers et al., 2016).

Einleitung

Doch bereits heute können einige Formen von mentaler Retardierung durch eine Therapie verhindert werden. Insbesondere sind hierbei Stoffwechseldefekte zu nennen, wie die Phenylketonurie. Bei der Phenylketonurie kommt es aufgrund von Mutationen in dem Gen *PAH* zu einem Funktionsverlust des Enzyms Phenylalaninhydroxylase, sodass der Abbau von Phenylalanin gestört ist. Die Akkumulation von Phenylalanin führt als Hauptsymptom zu schwerer mentaler Retardierung. Die strikte Einhaltung einer phenylalaninarmen Diät nach der Geburt kann diese mentale Retardierung verhindern, was eine Testung auf Phenylketonurie im Rahmen des Neugeborenen-Screenings nötig macht (Al Hafid and Christodoulou, 2015).

Des Weiteren ist in den letzten Jahren durch das verbesserte Verständnis der molekularen Ursachen mentaler Retardierung auch das Interesse an der Erforschung möglicher Therapien von bis dato nicht therapiebaren Formen von mentaler Retardierung gewachsen. Zum Beispiel konnte für das Fragile X-Syndrom, bei dem unter anderem das GABAerge System im Gehirn gestört ist, ein positiver Effekt von GABA-Agonisten auf das soziale Verhalten von Patienten mit Fragilen X-Syndrom gezeigt werden (Berry-Kravis et al., 2012; Picker and Walsh, 2013). Auch für andere Krankheiten, wie das Rett-Syndrom, könnte eine Beeinflussung des GABAergen Systems eine wichtige therapeutische Möglichkeit darstellen (Braat and Kooy, 2015). Ein weiterer Ansatz ist der Einsatz von Histon-Deacetylase-Inhibitoren bei Formen von mentaler Retardierung, in denen die Histon-Acetylierung vermindert ist (Picker and Walsh, 2013).

Da in vielen Formen von mentaler Retardierung ähnliche neuronale Mechanismen und Signalwege beeinträchtigt sind, scheint es aufgrund der großen Vielfalt genetischer Ursachen von mentaler Retardierung am sinnvollsten, die Erforschung von Therapiemöglichkeiten auf jene allgemeinen Signalwege zu konzentrieren (Vissers et al., 2016). Insgesamt können solche neue Therapieformen zwar keine vollständige Wiederherstellung, aber eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten in Betroffenen mit mentaler Retardierung erreichen (van Bokhoven, 2011).

1.2 Next Generation Sequencing

Die Möglichkeit, DNA-Sequenzen Base für Base zu sequenzieren, hat die molekulare Forschung revolutioniert. In den letzten Jahrzehnten konnten, ausgehend von der

Einleitung

Sanger-Sequenzierung (Sanger et al., 1977), zahlreiche Fortschritte erreicht werden. Im Jahr 2004 erfolgte erstmals die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms im Rahmen des Humangenomprojektes (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Die steigende Verwendung der Sequenzierung in Forschung und Diagnostik hat zu einer großen Nachfrage nach schnelleren und kostengünstigeren Technologien zur Sequenzierung auch großer Mengen an genetischem Material geführt. So haben sich in den letzten Jahren Sequenziermethoden der neuen Generation (*Next Generation Sequencing*, NGS) entwickelt, die die Sequenzierung von DNA im Hochdurchsatzverfahren erlauben.

Grundlegend zeigen diese auf dem Markt angebotenen NGS-Systeme eine Kombination unterschiedlichster Methoden für die folgenden Schritte: Fragmentierung der DNA und Amplifikation der zu sequenzierenden Genom-Abschnitte, sodass eine Template-Bibliothek entsteht (*template preparation*), das eigentliche Sequenzieren und die Detektion der Sequenz (*sequencing and imaging*) und die Analyse der erhaltenen Daten (*data analysis*) (Bahassi et al. and Stambrook, 2014). Methoden des NGS können verwendet werden, um das gesamte Genom (*Whole-Genome-Sequencing*, WGS), nur die Exome (*Whole-Exome-Sequencing*, WES) oder auch nur bestimmte interessante, vorher ausgewählte Regionen des Genoms (*targeted sequencing*) zu sequenzieren. Für die Erforschung der genetischen Ursachen von mentaler Retardierung wird meistens die Exomsequenzierung (WES) verwendet, um nur den codierenden Bereich des Genoms zu untersuchen (Carvill and Mefford, 2015). Teilweise wird, wie bereits für die verschiedenen Erbgänge beschrieben, auch eine vorherige Auswahl bestimmter Genabschnitte durch Kopplungsanalysen getroffen und nur diese Auswahl sequenziert (Musante and Ropers, 2014). Auf die Sequenzierung des gesamten Genoms (WGS) wird bisher aus Kostengründen zumeist verzichtet (Carvill and Mefford, 2015). Allerdings konnte eine höhere Aufklärungsrate von Fällen von mentaler Retardierung mit Methoden des WGS im Vergleich zum WES gezeigt werden (Gilissen et al., 2014), was das WGS zu einer attraktiven Methode für die Zukunft macht.

Für die Suche nach krankheitsverursachenden Mutationen werden anschließend an die Sequenzierung die Rohdaten an das Referenzgenom (hg19) allignt und die Varianten durch bioinformatische Aufbereitung bestimmt. Hierbei ergeben sich eine große Anzahl von Varianten, von denen nur wenige tatsächlich pathogen sind (Lohman et al., 2014).

Zur Identifizierung der am wahrscheinlichsten pathogenen Varianten bedarf es einer Filterung und Priorisierung der Daten. Wichtig ist hierbei die Frequenz der Varianten in der Bevölkerung, die in verschiedenen Datenbanken wie dem *1000 Genome Project* (Abecasis et al., 2012) und dem *ExAC Browser* (Lek et al., 2016) zu finden sind. Des Weiteren ist eine Literaturrecherche zu den betreffenden Genen unerlässlich. Computergestützte Vorhersageprogramme wie PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010) und Sift (Kumar et al., 2009) helfen, die möglichen Auswirkungen der gefundenen Varianten auf die Proteinfunktion einzuschätzen. Um aus diesen Informationen auf die klinische Relevanz der Varianten zu schließen bedarf es allerdings weiterer funktioneller Untersuchung oder die Identifizierung weiterer von der Variante Betroffenen mit übereinstimmenden Phänotyp.

1.3 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollten bisher ungeklärte Fälle von mentaler Retardierung aufgeklärt und dabei neue Kandidatengene für mentale Retardierung identifiziert und bestätigt werden. Hierzu wurde in einem Untersuchungskollektiv aus 26 konsanguinen Familien aus Jordanien von jeweils einem Betroffenen aus den Familien eine Exomsequenzierung mittels NGS vorgenommen. In jedem sequenzierten Exom wurde nach möglicherweise krankheitsverursachenden CNVs gesucht. Des Weiteren wurde bei fünf Familien die Exome weiter ausgewertet, um monogene Ursachen für die mentale Retardierung zu identifizieren. Hierzu wurden gefundene Varianten nach bestimmten Kriterien priorisiert. Für die interessantesten Varianten wurde die Segregation in der Familie überprüft und gegebenenfalls weitere funktionelle Untersuchungen zur Bestätigung der Pathogenität der Variante angestellt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

96 Well PCR Plate	4titude® Ltd, Berlin
Autoklavierbeutel	neoLab Migge Laborbedarf, Leonberg
PCR Tubes	Starlab, Hamburg
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Sealingfolie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Chemikalien

Antartic Phospatase Reaction Buffer (10x)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	VWR, Radnor, USA
Exonuclease I Reaction Buffer (10x)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water	Biotium, Hayward, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	VWR, Radnor, USA
PCR Nucleotide Mix	Roche, Basel, Schweiz
QIAGEN® PCR Buffer (10x)	Qiagen, Hilden
Q-Solution	Qiagen, Hilden
SeaKem® LE Agarose	Lonza, Rockland, USA
Tris base	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.1.3 Lösungen und Puffer

10 x TBE Puffer	108 g Tris base 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 1 l H ₂ O
Ladepuffer	3 ml Glycerin (30%) 25 mg Bromphenolblau (0,25%)

7 ml H₂O

2.1.4 Kits

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100	Applied Biosystems, Foster City, USA
FastStart™ Taq DNA Polymerase, dNTPack	Roche, Basel, Schweiz
CleanDTR	GC Biotech, Alphen aan den Rijn, Niederlande
PAXgene Blood miRNA Kit	PreAnalytiX, Hombrechtikon
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuantiNova™ SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
REPLI-g® Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Längenstandards

GeneRuler 100 bp DNA ladder 0,1 µg/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
---------------------------------------	--

2.1.6 Enzyme

Antarktic Phosphatase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
Exonuclease I (<i>E.coli</i>)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

2.1.7 Geräte

Elektrophoresekammern	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelkämme für Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kühl-und Gefrierschränke und Truhen:	
(4 und -20 °C) Super	Kirsch, Offenburg
(-20 °C) Premium	Liebherr, Bulle
LightCycler® 480	Roche, Basel, Schweiz
Mikrowelle	Severin, Sundern
Sequenzierer ABI 3730	Applied Biosystems, Santa Clara, USA
Thermocycler:	
G-Storm GS1 Thermal Cycler	Alpha Metrix Biotechnology, Rödermark
C1000 Touch Thermal Cycler	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminat	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf

Material und Methoden

Vortex

7-2020 Vortex
Vortex Mixer VF2

neoLab Migge Laborbedarf, Leonberg
Janke&Küinkel, Staufen im Breisgau

Laborwaage

Waage XB620M
Waage 6200 C-FR

Precisa, Dietikon, Schweiz
Precisa, Dietikon, Schweiz
Millipore, Billerica, USA

Wasseraufbereitungsanlage

Zentrifugen:

Centrifuge 5418 R
Centrifuge 5804
Mini-Zentrifuge
Mini-Zentrifuge SU1550

Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
neoLab Migge Laborbedarf, Leonberg
Sunlab,
Eppendorf, Hamburg

Photometer

Pipetten

Eppendorf, Hamburg

2.1.8 Software und Datenbanken

1000 Genomes Project

<http://www.1000genomes.org/>

BioGPS

<http://biogps.org/>

NCBI Blast

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

NHLBI GO ESP Exome Variant Server

<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

CnvHunter

<https://github.com/imgag/ngs-bits/blob/master/doc/tools/CnvHunter.md>

NCBI ClinVar

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

DECIPHER v9.8

<https://decipher.sanger.ac.uk/>

ExAC Browser

<http://exac.broadinstitute.org/>

GSVar

Institutsintern entwickelt

GeneMatcher

<https://genematcher.org/>

HGMD

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

IGV Genome Browser

<https://www.broadinstitute.org/igv>

Mouse Genome Informatics (MGI)

<http://www.informatics.jax.org/>

NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

OMIM

<http://www.omim.org/>

Pfam 28.0

<http://pfam.xfam.org>

Primer 3 Version 4.0.0

<http://primer3.ut.ee/>

NCBI Pubmed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Material und Methoden

UCSC Genome Browser

<http://genome.ucsc.edu/>)

UGENE

<http://ugene.net/>

2.1.9 Primer

F-Primer		R-Primer	
ACTB_q_F	tccctggagaagagctacg	ACTB_q_R	gtagtttcgtggatgccaca
B2M_q_F	gggcattcctgaagctgac	B2M_q_R	ccattctctgctggatgacg
BHMT2_x5_F	tgctctcacaatatcaagcacac	BHMT2_x5_R	atctgctttatgttggaccagtag
CNTNAP4_x9_F	atagcaaggtttgaaggtgagaac	CNTNAP4_x9_R	catttccaatttgcctccttc
CTBP2_x1_F	ctgagttcctggcctttctgc	CTBP2_x1_R	aagtcaccatggagcagttcg
DENND5A_q_F1	agtacatccaggaagccagg	DENND5A_q_R1	ttccaccagcatcctcttg
DENND5A_x14_F	tgtgatttaagtaagggaaggg	DENND5A_x14_R	agtgacacctaagcagcaac
DNAJC6_EX6_F	Tggggaagtacagcaatctcag	DNAJC6_EX7_R	gcttgaagtgagggcggt
DNAJC6_RT_x6_F	gcaaagcgaccaggaattg	DNAJC6_RT_x8_R	acgtctcctgacagtgatg
FRMD4A_x23_F	gcctttctgcaccacctg	FRMD4A_x23_R	acctcccagtgatgaaccctc
GAPDH_q_F	tcttcaggagcgagatcc	GAPDH_q_R	tctcatggttcacacccatg
GLDC_Ex18F1	acctccacctcaccggtt	GLDC_Ex18R1	ggggetcccaacagcatt
NT5C2_EX17_F	gggatttgggagaaaactggg	NT5C2_EX17_R	gttgctgacctgggctt
PDHB_q_F	tcccattcaagacctgtgg	PDHB_q_R	ggcacagatttcagctcctac
PTPRD_x28_F2	tggaatgactgaaatgtgaac	PTPRD_x28_R2	cagccagacttgcttgacatt
PTPRD_x40_F2	gttcctgtcctctgattatgg	PTPRD_x40_R2	acaaccagaatgacttgctc
RPLP0_q_F	catcgtctttaaccctgcg	RPLP0_q_R	gcatcatggtgttcttgcc
TBP_q_F	accactccactgtatccctcc	TBP_q_R	ttatattcggegttccggg
TECPR1_x4_F2	cctctgctcacttctattctgg	TECPR1_x4_R2	aggggacagaagcagggac
TECPR_x13_F	cctgctgtgatggtgtcc	TECPR_x13_R	cctcggacaccctctctcc

2.2 Methoden

2.2.1 Next Generation Sequencing

Methoden des *Next Generation Sequencing* (NGS) bieten die Möglichkeit, ganze Genome vergleichsweise schnell und kostengünstig zu sequenzieren. Für die Exomsequenzierungen in der vorliegenden Arbeit wurde mit dem *NextSeq 500 System* von Illumina gearbeitet. Die Sequenzierung sowie die bioinformatische Aufbereitung wurde von der Core Facility c.ATG (Leitung: Prof. Dr. med. Olaf Rieß) durchgeführt.

2.2.1.1 Whole Exome Sequencing

Das *NextSeq 500 System* nutzt die Methode des Sequenzierens durch Synthese (*Sequencing-by-synthesis*, SBS) (Bentley et al., 2008).

Vor der eigentlichen Sequenzierung wird zunächst eine Template-Bibliothek mit der zu sequenzierenden DNA erstellt. Da in dieser Arbeit vor allem die kodierenden Bereiche des Genoms von Interesse waren, wurden jene Regionen zur Entstehung einer Exom-Bibliothek mit dem *SureSelectXT All ExonV5* Enrichment System von Agilent Technologies spezifisch angereichert (Gnirke et al., 2009; Agilent Technologies, 2015)

In diesem System wird die DNA zunächst in 200 – 500 bp Fragmente gespalten. An das 5'- und das 3'-Ende der Fragmente binden jeweils spezifische Adaptoren. Nach einer ersten Amplifizierung aller Adaptor-ligierten Fragmente und einigen Aufreinigungsschritten werden zu den DNA-Fragmenten biotinylierte RNA-Köder gegeben, die mit kodierenden Regionen der DNA hybridisieren. An die RNA-Köder binden mit Streptavidin beschichtete magnetische Kügelchen (*magnetic beads*). Nicht über die RNA-Köder an *magnetic beads* gebundene DNA-Fragmente werden durch Waschschrte eliminiert. Nach Auswaschen der *magnetic beads* und der RNA-Köder verbleiben die interessanten Regionen, in diesem Fall die Exone, die nun abermals durch eine PCR-Reaktion angereichert werden.

Bei der anschließenden Sequenzierung der ca. 100 bp langen Fragmente mit dem *NextSeq 500 System* kommt es zunächst zu einer Amplifizierung dieser Exom-Bibliothek durch eine sogenannte Brücken-Amplifizierung der DNA-Fragmente in *Clustern* (Abbildung 1) (Metzker, 2010; Illumina, 2016) Die einzelsträngigen DNA-Fragmente der Bibliothek werden dabei an einer sogenannten *flow cell* immobilisiert,

indem die Adaptoren an den Fragmenten mit komplementären Oligonukleotiden auf der *flow cell* hybridisieren. Diese Oligonukleotide stellen zugleich Primer dar. Ausgehend von diesen kann nun an den einzelnen DNA-Fragmenten ein neuer Strang synthetisiert werden. Durch wiederholte Schritte aus Brückenbildung durch Umklappen der DNA-Fragmente und Bindung an den jeweils anderen Primer auf der *flow cell* und anschließender Denaturierung wird jedes einzelne DNA-Fragment vielfach amplifiziert und *Cluster* aus Kopien desselben DNA-Fragments gebildet (Abbildung 1).

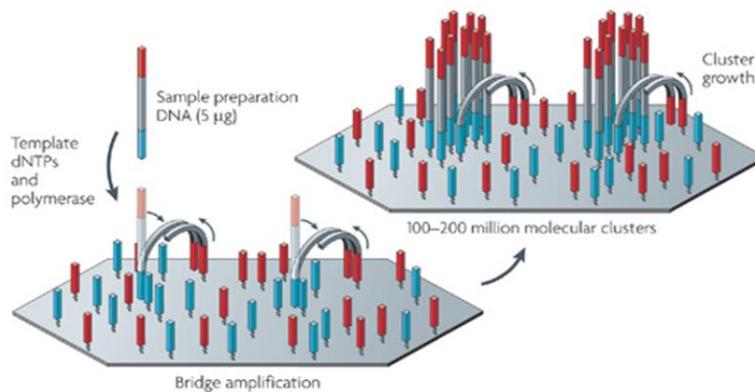


Abbildung 1 Brückenamplifikation und Entstehung der Cluster

Entnommen aus: Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies - the next generation." *Nat Rev Genet* 11(1): 31-46

Diese *Cluster* von DNA-Fragmenten werden nun sequenziert. Illumina nutzt hierfür eine Methode der zyklisch reversiblen Termination mit fluoreszierende reversiblen 3'-blockierte Terminatoren (Bentley et al., 2008; Metzker, 2010). Diese Terminatoren sind basenspezifisch fluoreszenzmarkierte dNTPs, die am 3'-Sauerstoff-Atom eine zusätzliche spaltbare Gruppe tragen. Mit diesen dNTPs synthetisiert eine DNA-Polymerase nun in mehreren Zyklen einen komplementären DNA-Strang an den einzelnen DNA-Fragmenten. Da die zusätzliche Gruppe am 3'-Ende der dNTPs das Anhängen weitere dNTPs durch die DNA-Polymerase während der Synthese verhindert und damit die Reaktion terminiert, wird in jedem Zyklus nur jeweils eines dieser dNTPs eingefügt und das Fluoreszenzsignal jenes dNTPs aufgezeichnet. Anschließend erfolgt ein Spaltungsschritt, bei dem die Fluoreszenzmarkierung und die terminierende Gruppe am 3'-Ende des eingebauten dNTPs abgespalten wird. Nun kann in einem neuen Zyklus erneut ein Terminator eingebaut werden, der nach Detektion des Signals zu einem

unterminierenden dNTP gespalten wird. Durch die in den Zyklen aufeinanderfolgenden Fluoreszenzsignale des eingebauten dNTPs wird die Sequenz der DNA bestimmt.

Die Sequenzierung der DNA mit dem *NextSeq 500* von Illumina erfolgte hierbei durch Paired-End-Sequencing, das die Sequenzierung der Fragmente von jeweils beiden Enden aus durchführt und so die Lesequalität und Spezifität der Sequenzen erhöht.

2.2.1.2 Aufbereitung der Daten

Die mit dem *NextSeq 500* System gewonnenen Daten wurden anschließend bioinformatisch aufbereitet. Nach Schritten der Qualitätskontrollen der Rohdaten und Entfernung der Adaptoren erfolgte zunächst das sogenannte *Mapping*, um die Positionen der Sequenzen im Genom durch Vergleich mit einer Referenzsequenz zu bestimmen. Hierfür wurde die Software *BWA-MEM* (Li, 2013) mit dem Human Genome hg19 als Referenzsequenz genutzt. Nach weiteren bioinformatischer Aufbereitung der Daten wurden im anschließenden Schritt des *Variant calling* mithilfe des Programms *Freebayes* (Marth, 2012) die Varianten in den Sequenzen im Vergleich zur Referenzsequenz bestimmt. Diesen Varianten wurden schließlich bereits bekannte Annotationen zugeordnet. Hierzu wurden unter anderem die Tools *SnpEff* (Cingolani et al., 2012), das neben der Annotation auch eine Voraussage der Effekte der Varianten auf die Gene bietet, sowie *SnpSift* (Cingolani et al., 2012), das unter anderem bei der Filterung der Daten und weiterer Bearbeitung hilft, verwendet. Die gesammelten Informationen wurden in dem am Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik von Dr. Marc Sturm (AG Genomik) entwickelten Programm *GSvar* zusammengetragen.

2.2.1.3 Filterung der Varianten

Der Ansatz des NGS liefert etwa 35.000 Varianten. Um unter diesen vielen Varianten die am wahrscheinlichsten pathogenen Varianten zu finden, müssen die Varianten nach bestimmten Kriterien gefiltert werden. Die im Folgenden diskutierten Varianten wurden mit dem institutseigenen Programm *GSvar* gefiltert.

2.2.1.3.1 Das Programm GSvar

In dem Programm *GSvar* werden alle in einem sequenzierten Exom gefundenen Varianten und bekannte Annotationen zu diesen zusammengetragen. Zu jeder Variante wird die genaue Position, die Art der Mutation, der Genotyp, das betroffene Gen und die Qualität der Sequenzierung an jener Stelle angegeben. Des Weiteren finden sich hilfreiche Informationen aus verschiedenen Datenbanken zur Häufigkeit der Variante in der Bevölkerung (MAF = *minor allele frequency*), zu bekannten SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), zur Konservierung der Variante, zur möglichen Pathogenität der Variante und zu bereits bekannten Mutationen in den von der Variante betroffenen Genen, die in den Mutations-Datenbanken HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) und ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) verzeichnet sind.

2.2.1.3.2 Filterung der Varianten mit dem Programm GSvar

Die Varianten wurden zunächst nach Häufigkeit, Pathogenität und Genotyp gefiltert. Varianten, die mit einer großen Häufigkeit in der allgemein gesunden Bevölkerung vorkommen, sind sehr wahrscheinlich nicht pathogen. Somit wurden mithilfe des Programm *GSvar* Varianten, deren MAF in den Datenbanken des *1000 Genome Project* (Abecasis et al., 2012), *ExAC Browser* (Lek et al., 2016) und des *NHLBI GO ESP Exome Variant Server* in den Versionen *ESP6500EA* und *ESP6500AA* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) mit größer als 1 % angegeben wurden, herausgefiltert. Des Weiteren wurden jene Varianten, die bereits mehr als fünfmal in der institutseigenen Patientendatenbank beschrieben wurden, herausgefiltert.

In *GSvar* wird außerdem die von dem zur Annotation verwendeten Tool *SnpEff* gegebene Einschätzung der Auswirkung der Variante angegeben. Diese einfache Einschätzung erfolgt anhand der vorliegenden Mutation und teilt diesen einen hohen, moderaten oder niedrigen Einfluss auf die korrekte Genexpression zu. Durch Herausfilterung der Varianten mit einem niedrigen Einfluss wurden nur exonische und nicht-synonyme Mutationen, sowie Spleißmutationen betrachtet.

Da die Stammbäume der untersuchten Familien autosomal-rezessive Vererbung der Mutationen wahrscheinlich machen, wurden weiterhin zunächst vor allem die homozygoten Varianten betrachtet. Bei nicht zufriedenstellenden Ergebnissen wurden

auch compound-heterozygote Varianten, sämtliche Varianten in Genen mit einem Eintrag in der *OMIM*-Datenbank, sowie alle Varianten, deren Auswirkung als hoch eingestuft wurde, betrachtet. Dadurch sollten keine bereits bekannten und autosomal-dominante Formen von mentaler Retardierung übersehen werden.

2.2.2 Analyse der gefilterten Varianten

2.2.2.1 Qualität der Sequenzierung

Ein wichtiges Qualitätsmerkmal in der Sequenzierung mit NGS ist die sogenannte Abdeckung. Um Sequenzierfehler auszugleichen, werden die einzelnen Basen durch Sequenzierung der vielen beim NGS entstehenden DNA-Fragmente mehrmals sequenziert. Eine hohe Deckung entspricht dabei einer hohen Anzahl an Sequenzierungen der einzelnen Basen, der sogenannten *reads*. Für die einzelnen Varianten wurden diese Informationen mithilfe des Programms *IGV (Integrative Genomics Viewer)* betrachtet, einem Programm zur Darstellung genomischer Daten (Robinson et al., 2011; Thorvaldsdóttir et al., 2013). Somit konnte die Echtheit der Varianten überprüft werden.

2.2.2.2 Literaturrecherche

Um die Bedeutung der Varianten für den Phänotyp des Patienten besser abzuschätzen, wurden Informationen zu den betreffenden Genen gesammelt. Im Fokus standen dabei die physiologische Funktion des vom Gen kodierten Proteins, das Expressionsmuster, sowie bereits bekannte Mutationen in dem Gen. Hierzu wurden die in der Datenbank *NCBI PubMed* vorhandenen Publikationen betrachtet, sowie die zusammenfassenden Informationen in dem *UCSC Genome Browser* (Kent et al., 2002), einem internetgestützten Tool zur Darstellung des menschlichen Genoms auf Basis einer Referenzsequenz. Die Expression der Proteine wurde auf Grundlage der Datenbank *BioGPS* (Wu et al., 2009) erfasst. Des Weiteren wurde nach Mausmodellen des betreffenden Gens in der Maus-Datenbank *MGI* (Eppig et al., 2015) gesucht. Schließlich wurden bereits bekannte, mit dem Gen assoziierte Krankheiten in der Datenbank *NCBI OMIM* (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine), einer Datenbank mit Informationen zu bekannten Erbkrankheiten, betrachtet.

Als besonders interessant galten Varianten in Genen, deren Genprodukte eine bekannte Funktion im Nervensystem besitzen, die im Nervensystem exprimiert werden oder die bereits mit neurologischen Krankheiten, insbesondere mit mentaler Retardierung, assoziiert sind. Gene, deren Produkte mit anderen bereits mit MR assoziierten Proteinen interagieren, wurden ebenfalls höher priorisiert.

2.2.2.3 Analyse der Pathogenität der Varianten

Um die mögliche Pathogenität der Varianten einzuschätzen, wurden die in *GSvar* implementierten Ergebnisse der Vorhersageprogramme *PolyPhen-2*, *Sift* und *MetaLR* genutzt. *PolyPhen-2* (Adzhubei et al., 2010) und *Sift* (Kumar et al., 2009) stellen Programme zur Vorhersage der Auswirkung von Aminosäureaustauschen dar. Die Berechnungen beruhen dabei vor allem auf der Konservierung der Aminosäuren an dieser Stelle und der Art des Aminosäureaustausches. *MetaLR* berechnet einen Vorhersagewert auf Grundlage der Werte von zehn verschiedenen anderen Vorhersagetools, sowie der Häufigkeit der Variante im *1000 Genome Project* (Dong et al., 2015).

2.2.2.4 Analyse des Aminosäureaustausches

Um eine genauere Einschätzung der möglichen Pathogenität der Varianten zu erlangen, wurde der durch die Variante hervorgerufene Aminosäureaustausch näher betrachtet. Bezüglich der Art des Aminosäureaustausches wurde insbesondere auf die Gruppeneinteilung der Aminosäuren geachtet. Ein Tausch einer Aminosäure aus einer Gruppe mit einer Aminosäure aus einer anderen Gruppe mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften kann eine größere Auswirkung auf die spätere Proteinstruktur bzw. -funktion haben.

Des Weiteren wurde die Konservierung der Aminosäure an dieser Stelle betrachtet. Eine hohe Konservierung von Aminosäuresequenzen über verschiedene Proteine gleicher Proteinfamilien und verschiedener Spezies spricht dafür, dass jene Aminosäuresequenz an dieser Stelle wichtig für die Proteinfunktion ist und folglich ein Austausch einer Aminosäure zu einer Einschränkung dieser Funktion führt. Zur Betrachtung der Konservierung in anderen Spezies wurde der *UCSC Genome Browser* mit der Referenzsequenz hg19 genutzt (Kent et al., 2002). Die Konservierung in ähnlichen

Proteinen und die mögliche Lage der Variante in einer Proteindomäne wurde mithilfe der Programme *NCBI Blast* und *Pfam* (Sonnhammer et al., 1997) untersucht. Beide Tools stellen Alignments zwischen einer vom Benutzer eingegebenen Sequenz und ähnlicher Sequenzen in der Proteindatenbank des jeweiligen Tools her und geben die Konservierung der einzelnen Aminosäuren an. Des Weiteren werden Informationen zu bekannten konservierten Domänen in den gesuchten Proteinen dargestellt. *NCBI Blast* wurde auf Grundlage der *Protein Data Bank* genutzt.

2.2.3 Analyse von CNV

2.2.3.1 Auffinden von CNVs mit dem Programm *CnvHunter*

Für jedes mit NGS sequenzierte Exom wurde außerdem eine Analyse von möglichen *Copy number variations* (CNVs) durchgeführt. Hierzu wurde das im Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik von Dr. Marc Sturm aus der AG Genomik entwickelte Programm *CnvHunter* (<https://github.com/imgag/ngs-bits/blob/master/doc/tools/CnvHunter.md>) verwendet. CNVs stellen Variationen der Anzahl an Kopien von bestimmten Abschnitten dar. Das Programm *CnvHunter* arbeitet daher grundlegend mit dem Vergleich der bei der Sequenzierung erreichten *reads* bei dem zu analysierenden Exom und der *reads* bei anderen Exomen desselben Sequenzierlaufs. Große Abweichungen in den Anzahlen der *reads* in bestimmten DNA-Abschnitten könnten darauf hindeuten, dass im untersuchten Exom jene Abschnitte in nur einer bzw. mehrfacher Kopie vorliegen. Die gefunden CNVs wurden mit bekannten CNVs in der *DECIPHER*-Datenbank (Firth et al., 2009) im *UCSC genome browser* mit dem Referenzgenom hg19 verglichen.

2.2.3.2 Bestätigung der CNVs durch Array-Technologie

Ein als sehr wahrscheinlich krankheitsverursachend eingeschätzter CNV wurde mithilfe eines Mikroarrays bestätigt. Mikroarrays sind Chips, auf denen sich bestimmte DNA-Sequenzen befinden. Wird eine Probe aus DNA auf die Chips gegeben, hybridisieren die Sequenzen dieser Probe mit der DNA. Die Hybridisierung gibt ein Signal ab, was aufgezeichnet wird. Anhand der Stärke des Signals kann auf die Menge der vorhanden DNA in der Probe und somit auf eventuelle Deletionen oder Duplikationen geschlossen werden. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit auf CytoScan 750K

Arrays (Affymetrix) von der Core Facility c.ATG (Leitung: Prof. Dr. Olaf Rieß) des Instituts durchgeführt.

2.2.4 Methoden mit Verwendung von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Extraktion der DNA aus Blutproben

Die DNA der Probanden wurde entweder im genetischen Labor des Department of Biotechnology and Genetic Engineering der Philadelphia University Amman in Jordanien oder des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikum Tübingen aus EDTA-Blutproben extrahiert. Hierzu wurde das *QIAamp DNA Blood Mini Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.4.2 Whole genome amplification mit dem *REPLI-g Mini Kit*

Proben mit schlechter Qualität bzw. geringen DNA Mengen wurden vor Durchführung einer PCR mithilfe des *REPLI-g Mini Kits* von Qiagen amplifiziert. Das *REPLI-g Mini Kit* funktioniert dabei nach der Methode der *multiple-displacement amplification* (MDA) (Blanco et al., 1989). Bei dieser Amplifikation wird nach Denaturierung der DNA und Bindung randomisierter Primer das Enzym phi29 DNA-Polymerase verwendet, das bei konstanter Temperatur komplementäre Stränge an den DNA-Templates synthetisiert. Diese neu synthetisierten Stränge werden wiederum als neue Templates verwendet.

Zur alkalischen Denaturierung der DNA wurden zunächst 2,5 µl des Puffers D1, der sich aus 9 µl des Puffers DLB und 32 µl Wasser zusammensetzt, zu 2,5 µl der zu amplifizierenden DNA gegeben, durch Vortexen gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Denaturierungspuffer zu neutralisieren, wurden 5 µl des Neutralisationspuffers N1, der zuvor aus 12 µl Stop solution und 68 ml Wasser hergestellt wurde, zu den Proben pipettiert. Anschließend wurden 10 µl Wasser, 29 µl REPLI-g Mini Reaction buffer und 1 µl REPLI-g DNA-Polymerase zu 10 µl der zuvor denaturierten DNA gegeben. Dieser Ansatz wurde für 16 Stunden bei 30 °C inkubiert, um die Amplifizierung der DNA zu vollziehen. Nach der Inkubationszeit wurde die Polymerase durch dreiminütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Für die weitere

Verwendung der Proben in der PCR-Reaktion wurden die Proben abschließend 1:20 verdünnt und als DNA-template in der PCR eingesetzt.

2.2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung spezifischer genomischer Abschnitte mithilfe einer thermostabilen Taq-Polymerase, die zuerst aus *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde (Saiki et al., 1988).

2.2.4.3.1 Prinzip der PCR

Für die PCR werden DNA, die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt enthält, für diesen DNA-Abschnitt spezifische Primer, die Taq-Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs) benötigt. Die optimalen Bedingungen für die Reaktion werden durch einen für das Enzym passenden Puffer hergestellt. Es werden zwei verschiedene, gegenläufige Primer (*forward Primer* und *reverse Primer*) verwendet, die so gewählt sind, dass sie den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt umschließen.

Die PCR läuft in drei Schritten ab, die zyklisch wiederholt werden. Im ersten Schritt, der *Denaturierung*, wird der PCR-Ansatz auf 94-98 °C erhitzt, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren. Anschließend wird der PCR-Ansatz im Schritt des *Annealings* auf ca. 55-65 °C abgekühlt, sodass die Primer an die nun einzelsträngige DNA binden können. Jeder Primer hat dabei eine eigene spezifische Annealingtemperatur, die von der Basenzusammensetzung der Primer abhängt. Um die Bindungsspezifität der Primer zu erhöhen, kann ein Touchdown-Programm eingesetzt werden, bei dem die Temperatur in jedem Zyklus gesenkt wird. Der letzte Schritt, die *Elongation*, dient zur Synthese eines neuen komplementären DNA-Stranges, ausgehend vom 3'-Ende der Primer, durch die Taq-Polymerase. Die Temperatur dieses Schrittes hängt von der verwendeten Polymerase ab und liegt bei 68-72 °C.

Diese drei Schritte werden meist 35-40x wiederholt. Die Menge an amplifizierten DNA-Abschnitten wächst dabei in jedem Schritt exponentiell an, da auch alle im vorherigen Zyklus erzeugten DNA-Abschnitte im nächsten Zyklus vervielfältigt werden.

An den letzten Zyklus schließt ein weiterer, finaler Elongations-Schritt an.

2.2.4.3.2 Primerdesign

Die verwendeten Primer wurden mithilfe von *Primer 3* (<http://primer3.ut.ee/>) designt. Dazu wurde die Sequenz des Exons, in der die gefundene Variante lag, sowie die das Exon umgebende intronische Sequenz anhand der Referenzsequenz hg19 im *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>) bestimmt. Die Primer wurden für die intronischen Sequenzen ausgewählt. Da cDNA keine intronischen Sequenzen mehr besitzt, wurden Primer zum Nachweis von Spleißveränderungen in exonische Bereiche gelegt. Dabei wurden *forward* und *reverse* Primer in unterschiedliche Exons gelegt um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eventuelle residuale genomische DNA zu verhindern.

Die Primer sollten dabei folgende Voraussetzung erfüllen: Für eine optimale Annealing-Temperatur bei ausreichender Spezifität des Primers sollte die Länge 19-25 bp betragen und der GC-Gehalt 30-70% ausmachen. Die Annealing-Temperatur sollte zwischen 59-65° C liegen, wobei sich die Temperatur des *forward*- und *reverse*-Primer um weniger als 1 °C unterscheiden sollten. Des Weiteren wurden Primer mit einem GC-clamp, also Primer mit einem G oder C am 3'-Ende, ausgewählt. Da die Bindung zwischen G und C aufgrund von drei Wasserstoffbrückenbindungen besonders stark ist, verstärkt der GC-clamp die Bindung des Primers am 3'-Ende, an dem später die Polymerase ansetzt.

Die Primer sollten keine häufigen SNPs und repetitiven Elemente enthalten und nicht mit sich selbst oder dem jeweiligen anderen *reverse*- bzw. *forward*-primer hybridisieren.

Die designten Primer wurden mit dem *in silico PCR-Tool* von UCSC geprüft.

2.2.4.3.3 Protokoll der PCR

Für die PCR wurde das *Taq PCR Core Kit* von Qiagen mit folgendem Ansatz verwendet:

Ansatz	Menge
dNTPs	0,4 µl
Puffer	2 µl
Primer f (10 pM)	0,8 µl

Material und Methoden

Primer r (10 pM)	0,8 µl
DNA	1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
H ₂ O	auf 20 µl

Folgendes Touchdownprogramm wurde verwendet:

Temperatur	Dauer	Zyklen
94 °C	3 Minuten	x1
94 °C	1 Minute	x10
68-59 °C	1 Minute	
72 °C	1 Minute	
94 °C	1 Minute	x30
59 °C	1 Minute	
72 °C	1 Minute	
72 °C	10 Minuten	x1
15 °C	Halten	

Konnte mit diesem PCR-Protokoll kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden, wurde das FastStart Taq DNA Polymerase von Roche, dNTPack mit folgendem Protokoll verwendet:

Ansatz	Menge
dNTPs	0,5 µl
10 x PCR-Puffer + MgCl	2,5 µl
Q-Solution	2 µl
Primer f (10 pM)	1 µl
Primer r (10 pM)	1 µl
DNA	2 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
H ₂ O.	auf 25 µl

Folgendes Touchdown-Programm wurde verwendet:

Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	5 Minuten	x1
94 °C	30 Sekunden	x10
65-56 °C	30 Sekunden	
72 °C	30 Sekunden	
94 °C	30 Sekunden	x30
55 °C	30 Sekunden	
72 °C	30 Sekunden	
72 °C	7 Minuten	x1
15 °C	Halten	

2.2.4.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Molekülen. Die Mischung der Moleküle wird in ein Gel aufgetragen und das Gel in eine ionische Pufferlösung gelegt. Durch Anlegung einer Spannung wandern die Moleküle im Gel entlang des Spannungsgradienten, wodurch die Moleküle der Größe nach aufgetrennt werden.

2.2.4.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 1,5 %iges Agarose-Gel verwendet. Hierzu wurden je nach Größe des Gels 0,6 g bzw. 1,2 g Agarose in 40 bzw. 80 ml 1x TBE Puffer durch Aufkochen gelöst. Anschließend wurden 1 bzw. 2 µl GelRed™ von Biotium hinzugefügt. Das unter UV-Licht fluoreszierende GelRed™ lagert sich in die DNA ein und macht die DNA unter UV-Licht sichtbar. Das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und die PCR-Produkte in Kammern aufgetragen, die durch Einsatz eines Kammes im Gel entstanden sind.

Vor Beladung des Gels wurden die PCR-Produkte mit einem Ladepuffer (6x) versetzt. Zusätzlich zu den PCR-Produkten wurde außerdem 1 µl des Längenstandards GeneRuler 100 bp DNA ladder von Thermo Fisher Scientific in das Gel aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 120 V für 20–30 Minuten angelegt und anschließend unter einem UV-Transilluminator Bilder der Gele zur Analyse gemacht.

2.2.4.4.2 Gelextraktion

Bei Durchführung der PCR mit cDNA zur Untersuchung von Spleißveränderungen konnten sich im Gel mehrere Banden ergeben, die aus dem Gel herausgeschnitten wurden, um das PCR-Produkt zur Sequenzierung der einzelnen Banden zu extrahieren. Nach Ausschneiden der Banden mit einem Skalpell und Überführung der Gelstücke in ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden die Proben mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* von Qiagen aufgereinigt. Hierzu wurden die Gelstücke zunächst gewogen und zu diesen das dreifache Volumen (100 mg ≈ 100 µl) des Puffers QG gegeben. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 50 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert, um ein Lösen des Gels zu erreichen. Nach Zugabe des einfachen Volumens an Isopropanol wurden die Proben in eine QIAquick Spin-Säule in einem 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 1 Minute bei

17900 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Zentrifugation nach Zugabe von 500 µl Puffer QG wiederholt. Nach Verwerfen des Durchflusses, wurde 750 µl des Puffers PE in die Säule gegeben und für 1 Minute bei 17900 g zentrifugiert, der Durchfluss entfernt und die Zentrifugation wiederholt. Zur Elution der PCR-Produkte wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, 50 µl Wasser dazugegeben und für 1 Minute bei 17900 g zentrifugiert.

2.2.4.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte für die anschließende Sequenzierung nutzbar zu machen, müssen die PCR-Produkte zunächst aufgereinigt werden. Hierzu wurden eine Exonuklease und eine Phosphatase verwendet, die nach der PCR überflüssige Desoxyribonukleinsäuren und Primer verdauen. Folgender Ansatz wurde verwendet:

Ansatz	Menge
Exonuklease-Puffer	1,25 µl
Exonuklease I (20 u/µl)	0,5 µl
Antarktische Phosphatase Puffer	1,25 µl
Antarktische Phosphatase	1 µl
H ₂ O	auf 5 µl

Für die Inkubation wurde folgendes Cyclerprogramm verwendet:

Temperatur	Dauer
37 °C	30 Minuten
80 °C	15 Minuten
10 °C	15 Minuten

2.2.4.6 Sequenzierung

2.2.4.6.1 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977). Für diese Methode werden die PCR-Produkte, die für das PCR-Produkt spezifischen Primer, eine Taq-Polymerase, dNTPS, sowie je nach Base unterschiedlich fluoreszierende ddNTPs benötigt. Den ddNTPs fehlt am 3'C-Atom die Hydroxygruppe, an die die Polymerase bei der DNA-Synthese ansetzt. Dadurch kommt es zu einem Abbruch der Synthese, sobald ein ddNTP statt eines dNTPs eingebaut wird. Wie bei einer PCR erfolgt ein ca. 30-mal wiederholter Zyklus aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation. Im Unterschied zur PCR wird aber nur ein

Material und Methoden

Primer pro Ansatz verwendet und die Sequenzierung dann mit *forward*- und *reverse*-Primer in unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. Während der Elongation baut die Polymerase zufällig ddNTPs oder dNTPs ein. Sobald ein ddNTP eingebaut wird, terminiert die Synthese, sodass DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Statistisch bricht somit die Reaktion an jeder Stelle in der DNA mindestens einmal ab. Da an dieser Stelle dann ein fluoreszierendes ddNTP eingebaut ist, kann dieses detektiert werden und somit die Base an jener Stelle bestimmt werden.

Für die Sequenzierung wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz	Menge
BigDye Puffer	1,5 µl
BigDye	1 µl
Primer (10 pM)	0,5 µl
PCR-Produkt	3 µl
Aqua dest.	auf 10 µl

Folgendes Cycloerprogramm wurde verwendet:

Temperatur	Dauer	Zyklen
96 °C	2 Minuten	x1
96 °C	10 Sekunden	x30
58 °C	5 Sekunden	
60 °C	3 Minuten	
60 °C	1 Minuten	x1
10 °C	Halten	

2.2.4.6.2 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte

Auch die Sequenzierungsprodukte müssen von überflüssigen dNTPs, ddNTPs und Primern gereinigt werden. Hierzu wurde das *CleanDTR* Kit von GC Biotech nach Herstellerangabe verwendet. Bei dieser Methode werden sogenannte *magnetic beads*, kleine magnetische Metallkügelchen, an die die PCR-Produkte binden, verwendet. Stellt man die Proben auf eine Magnetplatte, werden die Kügelchen mit den PCR-Produkten von der restlichen Flüssigkeit getrennt. Es erfolgen mehrere Waschschrirte mit 85 % Ethanol, bei der die Flüssigkeit jeweils verworfen wird, sodass nur die Kügelchen verbleiben, von denen die PCR-Produkte mit Wasser gelöst werden.

2.2.4.6.3 Analyse der Sequenzen

Die Sequenzen wurden im Sequenzierer *ABI 3730 DNA Analyzer* von Applied Biosystems abgelesen. Hierbei werden die PCR-Produkte durch Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und die ddNTPs am Ende der Produkte durch Fluoreszenz angeregt. Durch Detektion der Farbsignale kann die Sequenz anhand der aus den Farbsignalen generierten Elektropherogramme bestimmt werden.

2.2.4.6.4 Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden im Programm *UGENE* (Okonechnikov et al., 2012) ausgewertet. Dieses Programm stellt anhand der Elektropherogramme der Sequenzen die Basen an jeder Stelle der Sequenz dar. Diese Sequenz wurde mithilfe des *Blat Tools* von UCSC gegen die Referenzsequenz hg19 verglichen, um zu ermitteln, ob die eingegebene Sequenz die gesuchte Variante enthält.

2.2.4.7 RNA-Extraktion aus PAXgene-Blutproben

Zur späteren RNA-Extraktion wurde den Patienten Blut in einem PAXgene-Blut-RNA-Röhrchen von PreAnalytiX abgenommen. Aus diesem wurde mithilfe des entsprechenden *PAXgene Blood RNA Kits* von PreAnalytiX die RNA nach Herstellerangaben extrahiert. Hierzu wurden die Proben zunächst zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Lyse der Zellen zu erreichen. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und 4 ml RNase-freies Wasser zu dem Pellet gegeben. Das Pellet wurde durch Vortexen gelöst und die Proben für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 300 µl des Puffers BM1 hinzugefügt und durch Vortexen ein Lösen des Pellets erreicht. Anschließend wurden die Proben in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 300 µl Puffer BM2 und 40 µl Proteinase K hinzugefügt, durch Vortexen gemischt und für 10 Minuten bei 55 °C auf dem Schüttlerinkubator bei 1000 rpm inkubiert. Die Proben wurden nun in eine PAXgene Shredder Spin-Säule, das sich in einem 2 ml Reaktionsgefäß befand, überführt und 3 Minuten bei 17000 g zentrifugiert. Der Überstand des Durchflusses wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 700 µl Isopropanol hinzugegeben und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden 700 µl der Proben in eine PAXgene RNA Spin-Säule in einem

Material und Methoden

2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 1 Minute bei 17000 g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Dies wurde für den zuvor verbliebenden Rest der Probe wiederholt. Nun wurden 350 µl des Puffers BM3 in die Säule gegeben, für 15 Sekunden bei 17000 g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Im Anschluss wurde ein DNase I Inkubationsmix aus 10 µl DNase I Stock-Lösung und 70 µl des Puffers RDD hergestellt, dieser direkt auf die Membran in der Säule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 350 µl des Puffers BM3 in die Säule gegeben, für 15 Sekunden bei 17000 g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Dieser Vorgang wurde zweimal mit 500 µl des Puffers BM4 wiederholt, beim letzten Mal mit einer längeren Zentrifugationszeit von 2 Minuten. Anschließend wurden die Proben noch einmal für 1 Minute bei 17000 g zentrifugiert und die Säule in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Dies wurde nach Zugabe von 40 µl des Puffers BR5 zweimal mit demselben Reaktionsgefäß wiederholt, um die RNA zu lösen. Die Proben wurden abschließend für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert.

2.2.4.8 Reverse Transkription

Um die RNA für Analysen mit PCR nutzbar zu machen, wurde die RNA mithilfe eines Reverse Transkriptase-Enzyms in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde, nach Messung der Konzentration der RNA-Proben, eine Reaktion zur Elimination von DNA mit folgendem Ansatz für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert:

Ansatz	Menge
gDNA Wipeout Puffer, 7x	2µl
Template RNA	in Konzentration 220 ng/µl
RNase-freies Wasser	auf 14 µl aufgefüllt

Für die eigentliche Reverse Transkription wurde anschließend folgender Ansatz zu den RNA-Proben gegeben:

Ansatz	Menge
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Puffer, 5x	4 µl

RT Primer Mix	1 μ l
---------------	-----------

Der RT Primer Mix enthält dabei verschiedene randomisierte Primer, um möglichst alle Regionen der RNA in cDNA umschreiben zu können. Die Proben wurden nach Zugabe des Reverse-Transkriptase-Mix für 30 Minuten bei 42 °C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend durch dreiminütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert.

2.2.4.9 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Mithilfe der qPCR kann die Expression von Genprodukten quantitativ eingeschätzt werden. Die qPCR basiert auf dem Prinzip einer konventionellen PCR, allerdings werden bei der qPCR die entstehenden PCR-Produkte mithilfe von Fluoreszenz in Echtzeit (*real-time*) detektiert. Dadurch kann die Menge der PCR-Produkte in der exponentiellen Phase der PCR für verschiedene Gene relativ zueinander beurteilt werden und über diesen Vergleich auf die eingesetzte cDNA-Menge geschlossen werden. Für diesen Vergleich wird der sogenannte Ct-Wert genutzt, der beschreibt in welchem Zyklus der PCR die Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet. Je mehr cDNA für die qPCR zu Verfügung stand, desto früher wird dieser Schwellenwert überschritten. Die initiale cDNA-Menge wird aus den Ct-Werten anhand einer Standardkurve, die aus verschiedenen Verdünnungen der DNA erstellt wurde, berechnet. In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung der cDNA im Vergleich zu Haushaltsgenen (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *PDHB*, *RPLP0*, *TBP*) durchgeführt. Um die berechnete initiale cDNA-Menge und damit die Expression beurteilen zu können, wurde die qPCR für die cDNA des Betroffenen und für drei weitere Kontroll-cDNAs von gesunden Personen durchgeführt.

2.2.4.9.1 Primerdesign für die qPCR

Das Primerdesign für die qPCR erfolgte analog zum Primerdesign der PCR mit *Primer3* (siehe 2.2.3.1.2 Primerdesign). Bei Verwendung von cDNA wurden die Primer hier so gewählt, dass sie in benachbarten, möglichst in allen Isoformen identischen Exonen lagen und einen Abstand von über 1000 bp hatten, sodass eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA nicht amplifiziert werden konnten.

2.2.4.9.2 Durchführung der qPCR

Die qPCR wurde mit dem *QuantiNova SYBR Green PCR Kit* von Qiagen für die zu untersuchenden Gene und Kontrollgene durchgeführt. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Mischung aller eingesetzten DNAs im gleichen Verhältnis mit den Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250 erstellt. Für jede cDNA und jedes Gen wurden jeweils drei technische Replikate pro Ansatz verwendet. Jeder Ansatz setzte sich aus 2 µl der cDNA und folgendem Primer-Mastermix zusammen:

Ansatz	Menge
H ₂ O	2 µl
SYBR Green	5 µl
Primer f und r (10 pM)	Je 0,5 µl

Die qPCR wurde in einer 384-wellplate mit dem LightCycler® 2.0 von Roche mit folgendem Cyclerprogramm durchgeführt:

Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	2 Minuten	x1
95 °C	5 Sekunden	x30
60 °C	10 Sekunden	

2.2.4.9.3 Auswertung der qPCR

Die qPCR-Daten wurden mithilfe des Programms *LightCycler® 480 Software 1.5* von Roche ausgewertet. Das Programm bestimmt den Schwellenwert der Fluoreszenz, bei dessen Überschreiten die Zykluszahl als Ct-Wert ausgegeben wird. Diese Ct-Werte wurden dann in einer relativen Quantifizierung anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode miteinander verglichen. Hierbei wird zunächst die Differenz ΔCt der Ct-Werte des Zielgens und der als endogenen Kontrolle eingesetzten Haushaltsgene gebildet, anschließend wird die Differenz $\Delta\Delta\text{Ct}$ aus den ΔCt -Werten der Probe und der Kontroll-DNAs berechnet. Die relative Expression RQ kann anhand der Formel $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ berechnet werden. Diese berechneten Werte für die relative Expression wurden anschließend für den Vergleich der Expression bei dem Betroffenen und den gesunden Kontrollen herangezogen.

3. Untersuchungskollektiv

Als Grundlage dieser Arbeit diene ein Untersuchungskollektiv von 26 konsanguinen Familien, in denen es mindestens einen Betroffenen mit ursächlich nicht gekläarter mentaler Retardierung gibt. Die Rekrutierung und Untersuchung der betroffenen Familienmitglieder wurde durch Dr. rer. nat. Tawfiq Froukh (Abteilung für Biotechnologie und Gentechnik, Philadelphia Universität Amman) und verschiedenen jordanischen Kinderärzten mit Unterstützung von PD Dr. med. Rami Abou Jamra (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Leipzig) durchgeführt. Eine ausführliche Anamnese wurde erhoben und ein Stammbaum erstellt. Des Weiteren wurden ebenfalls von anderen Ärzten zuvor erhobene Befunde betrachtet. In Tabelle 1 sind die Phänotypen aller Familien zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht über die Phänotypen aller Patienten

Patient	Verwandschaft	Geschlecht	Alter	Mentale Retardierung	Mikrozephalie	Epilepsie	weitere Symptome
TF001_1	Index	m	10	++	-	-	Nystagmus, metabolische Blutwerte auffällig
TF001_4	Bruder	m	9	++	-	-	Nystagmus, Morbus Hirschsprung, motorische Retardierung, metabolische Blutwerte auffällig
TF002_1	Index	m	24	++	-	-	Asthma
TF002_5	Bruder	m	21	++	-	-	Paralyse, Muskelhypotonie, ängstlich
TF003_1	Index	f	10	++	-	+	siehe 4.9.1
TF004_1	Index	m	15	+	-	-	siehe 4.5.1
TF004_4	Schwester	f	12	+	-	-	siehe 4.5.1
TF005_1	Index	m	21	+	-	-	-
TF005_7	Schwester	f	15	+	-	-	-
TF006_1	Index	f	13	++	-	-	Hydrozephalus, Muskelhypotonie, erhöhte Harnsäure, LDH und ALP
TF006_6	Schwester	f	11	++	-	-	-
TF007_1	Index	m	15	+	-	In Kindheit	Fasziale Auffälligkeiten, Fußdeformität mit Syndaktylie, motorische Retardierung
TF007_6	Bruder	m	13	++	-	-	Fasziale Auffälligkeiten, Fußdeformität
TF008_1	Index	m	16	++	-	+	Milde Schwerhörigkeit beidseits, Hämophilie A, motorische Retardierung
TF008_6	Bruder	m	10	++	-	+	Aortenstenose, motorische Retardierung
TF011_1	Index	f	17	++	+	+	motorische Retardierung, abnormaler Gang, Ataxie?
TF011_7	Bruder	m	2	++	+	+	motorische Retardierung, breitbeiniger Gang, Ataxie?,

Untersuchungskollektiv

							Gehirnatrophie im MRT
TF012_1	Index	m	13	++	-	+	Abruptio placentae, neonataler Ikterus, Hyperaktivität, Aggressivität
TF013_1	Index	m	9	++	+	-	Fasziale Auffälligkeiten, Hyperaktivität, Schwerhörigkeit beidseits
TF015_1	Index	w	19	+++	+	-	Motorische Retardierung, muskuläre Hypotonie, Ataxie?
TF015_7	Schwester	w	12	+++	+	-	Motorische Retardierung, Ataxie?
TF016_1	Index	w	12	+++	+	+	siehe 4.3.1
TF017_6		w	27	+	+	-	Motorische Retardierung, Eneuresis
TF017_8	Index	w	23	+	-	-	Motorische Retardierung, Eneuresis, Augenprobleme
TF018_1	Schwester	w	18	++	-	-	siehe 4.4.1
TF018_6	Index	m	13	++	-	-	siehe 4.4.1
TF019_1	Index	w	5	+++	?	-	Motorische Retardierung, Schlafstörungen, Obstipation
TF019_4	Bruder	m	4	+++	?	-	Motorische Retardierung, Schlafstörungen, Obstipation
TF020_1	Index	w	17	++	-	-	siehe 4.6.1
TF020_6	Bruder	m	12	++	-	-	siehe 4.6.1
TF020_7	Schwester	w	7	++	+	+	siehe 4.6.1
TF021_1	Index	w	5	++	-	-	Hyperaktivität
TF022_1	Index	m	22	++	+	+	-
TF022_7	Bruder	m	19	++	+	+	-
TF023_1	Index	m	16	++	+	-	siehe 4.7.1
TF023_9	Schwester	w	2	++	+	-	siehe 4.7.1
TF024_1	Index	w	9	+++	+	-	motorische Retardierung, keine Fähigkeit zu sitzen oder laufen, stereotype Bewegungsstörung der Hände, Sehinderung, Obstipation
TF025-1	Index	m	7	++	-	-	Hyperaktivität
TF025_4	Schwester	w	5	++	-	-	Hyperaktivität
TF026_1	Index	w	5	++	-	-	Autismus
TF026_2	Schwester	w	5	++	-	-	Autismus
TF027_1	Index	m	6	++	?	-	Behandlung der Mutter wegen Schilddrüsenkarzinoms während Schwangerschaft, Placenta praevia, Komplikationen während Geburt, Autismus
TF028_1	Index	m	5	++	?	+	Hyperaktivität, erhöhtes Hepatocaryoxporphyrin
TF028_2	Bruder	m	5	++	?	+	Hyperaktivität, erhöhtes Hepatocaryoxporphyrin
TF029_1	Index	w	16	++	+	+	Neuroregression mit Verlust der Sprache und motorischen Fähigkeiten, spastische Paraplegie
TF029_7	Bruder	m	8	-	-	+	Neuroregression mit zunehmender Aufmerksamkeitsbeeinträchtigung

Abkürzungen: mild: +; moderat: ++; schwer: +++; nicht vorhanden: -; unbekannt: ?

Nach Einholung einer schriftlichen Einverständniserklärung aller Probanden bzw. deren gesetzlicher Vertreter, wurde von allen Betroffenen, deren Eltern, sowie weiteren gesunden Geschwistern Blut abgenommen. Daraus wurden durch Mitarbeiter der genetischen Labore der Abteilung für Biotechnologie und Gentechnik der Philadelphia

Untersuchungskollektiv

Universität Amman oder des Instituts für Medizinische Genetik und angewandte Genomik des Universitätsklinikum Tübingen DNA isoliert (2.2.4.1). Aus mit PAXgene Blutröhrchen abgenommenen Blutproben wurde bei Bedarf RNA isoliert (2.2.4.7). Des Weiteren wurde bei einigen der betroffenen Probanden Hautbiopsien entnommen, aus denen durch Mitarbeiter der Abteilung für Biotechnologie und Gentechnik der Philadelphia Universität Amman Fibroblasten-Zelllinien kultiviert wurden. Für jeweils einen der Betroffenen einer Familie wurde anschließend eine Exomsequenzierung (Anreicherung mit *SureSelectXT All ExonV5* Kit (Agilent)) mit dem *Next Seq 500* System von Illumina durch die Core Facility c.ATG (Leitung: Prof. Dr. med. Olaf Rieß) durchgeführt. Die bioinformatische Aufbereitung der Daten erfolgte nach standardisierten Parametern in der Core Facility c.ATG. Mit den Daten der Exomsequenzierung wurde jede der 26 Familien auf möglicherweise krankheitsverursachende CNVs untersucht. Für die Suche nach auslösenden monogenen Varianten wurden im Rahmen dieser Arbeit die Familien TF004, TF016, TF018, TF020 und TF023 untersucht.

4. Ergebnisse

4.1 Exomsequenzierung von 26 Betroffenen mit mentaler Retardierung

Für jeweils einen der Betroffenen der rekrutierten Familien wurde eine Exomsequenzierung (angereichert mit *SureSelectXT All ExonV5*) mit dem *NextSeq 500 System* von Illumina in der Core Facility c.ATG (Leitung: Prof. Dr. Olaf Rieß) durchgeführt. Die bioinformatische Aufbereitung der Daten erfolgte nach standardisierten Parametern in der Core Facility c.ATG.

4.2 Analyse gefundener Varianten

Für fünf der 26 Familien wurden gefundene Varianten in den sequenzierten Exomen auf potentiell krankheitsverursachende Mutationen untersucht. Aufgrund der Konsanguinität der Familien wurden vorrangig homozygote Varianten betrachtet.

Für jede Probe wurden insgesamt um die 35000 Varianten identifiziert. Diese wurden dem Programm *GSvar* zunächst nach ihrer Häufigkeit gefiltert, sodass Varianten mit einer MAF >1% in den Datenbanken des *1000 Genome Project* (Abecasis et al., 2012), *ExAC Browser* (Lek et al., 2016) und des *NHLBI GO ESP Exome Variant Server* in den Versionen *ESP6500EA* und *ESP6500AA* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) und einem Vorkommen von über fünfmal in der institutseigenen Variantendatenbank herausgefiltert wurden. Durch Filterung anhand der von dem Tool *SnpEff* gegebenen Einschätzung zum Einfluss der Mutation auf die Genexpression wurden nur exonische nicht-synonyme und Spleißmutationen betrachtet. Dadurch verblieben pro Patient ca. 25-65 homozygote Varianten. Eine Übersicht über die Anzahl der Varianten nach den jeweiligen Filterschritten findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl der Varianten nach Filterung

Familie	alle Varianten	seltene Varianten (MAF<1%)	exonisch nicht-synonym oder Spleißvarianten	institutsintern <5 mal genannt	homozygot
TF004	36369	3018	820	506	35
TF016	35463	2757	774	497	34
TF018	34293	2776	781	489	68
TF020	36658	2987	841	566	23
TF023	37079	3086	865	551	45

Nach Überprüfung der Qualität dieser Varianten im *IGV Genome Browser*, wurden die Varianten durch computergestützte Vorhersageprogramme (*PolyPhen-2* (Adzhubei et al., 2010), *Sift* (Kumar et al., 2009), *MetaLR* (Dong et al., 2015)) weiter untersucht und die Konservierung der von der Variante betroffenen Aminosäure in anderen Spezies (*UCSC Genome Browser* (Kent et al., 2002)) und ähnlichen Proteinen, sowie die Lage der Variante in einer Proteindomäne (*Pfam* (Sonnhammer et al., 1997)) überprüft. Des Weiteren wurden durch Literaturrecherche in verschiedenen Datenbanken (*NCBI PubMed*, *UCSC Genome Browser* (Kent et al., 2002), *BioGPS* (Wu et al., 2009), *MGI* (Eppig et al., 2015)) eine mögliche Bedeutung des betreffenden Gens für den Phänotyp der Krankheit ergründet. Die Segregation der interessantesten Varianten in der Familie wurde anschließend mit Sanger-Sequenzierung überprüft. Im Anschluss sollen die Ergebnisse dieser Analyse für die Familien TF004, TF016, TF018, TF020 und TF023 näher beschrieben werden.

4.3 Identifizierung einer Mutation in *DENND5A* in Familie TF016

4.3.1 Phänotyp der Betroffenen aus Familie TF016

Familie TF016 stammt aus Jordanien und zeigt mehrere konsanguine Verbindungen (Abbildung 2). Von den vier Kindern ist die Tochter TF016_1 von einer epileptischen Enzephalopathie mit mentaler Retardierung betroffen. Eine weitere Tochter mit ähnlichem Phänotyp ist bereits im Alter von 10 Jahren verstorben. Ein Cousin der Kinder leidet an einer Epilepsie.

Nach einer unauffälligen Schwangerschaft und Geburt entwickelte sie sich motorisch regelrecht, zeigte aber bereits neonatal epileptische Anfälle. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war sie 7 Jahre alt, schwer mental retardiert und konnte nur wenige Worte sprechen. Ihre weiterhin bestehende Epilepsie mit generalisierten tonisch-klonischen Krämpfen wurde erfolglos mit Valproat (Convulex) und Phenobarbital (Luminal) behandelt. Außerdem zeigte die Patientin eine Wachstumsverzögerung (Körperlänge bei Untersuchung: 110 cm, unter der 3. Perzentile), eine Mikrozephalie (Kopfumfang bei Untersuchung: 41 cm, unter der 3. Perzentile) und ein geringes Gewicht. Es bestanden faziale Auffälligkeiten bestehend aus einem zeltförmigen Mund mit Eversion der Unterlippe, kurzem Philtrum, großen Ohren und prominenter Nase mit

großen Nares. Des Weiteren zeigte sie Verhaltensauffälligkeiten mit Angstzuständen und selbstverletzendem Verhalten.

In einem bei ihr durchgeführten CT ergaben sich vergrößerte Ventrikel und periventriculäre Kalzifikationen. Eine Testung auf Angelman-Syndrom war negativ, ebenso zeigten eine durchgeführte Blutuntersuchung mit Screening auf Organoazidopathien keine Auffälligkeiten.

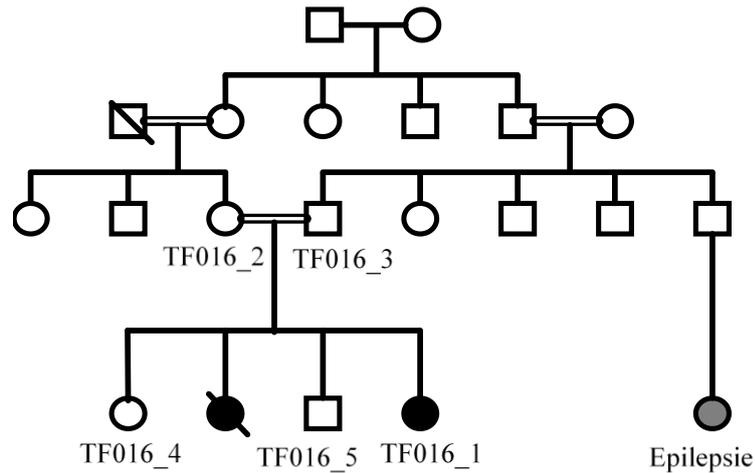


Abbildung 2: Stammbaum Familie TF016

DNA-Proben wurden von der Betroffenen (TF016_1), den beiden Eltern (TF016_2 und TF016_3), sowie zwei gesunden Geschwistern (TF016_4 und TF016_5) abgegeben. Außerdem wurde bei der Betroffenen (TF016_1) eine Hautbiopsie zur Gewinnung von Fibroblasten durchgeführt.

4.3.2 Exomsequenzierung Familie TF016

Für die betroffene Tochter TF016_1 wurde eine Exomsequenzierung mit dem *NextSeq 500* System von Illumina durchgeführt. Nach bioinformatischer Aufbereitung der Daten und Filterung (Tabelle 2) ergaben sich 34 homozygote Varianten. Das Tool *SnpEff* sagte für drei der homozygoten Varianten einen hohen Einfluss auf die Proteinstruktur aus. Diese Varianten lagen in den Genen *DENND5A*, *C17orf75* und *TSPEAR*. Insbesondere *DENND5A* erwies sich als interessantes Kandidatengen. Die Betroffene zeigte eine homozygote *frameshift*-Mutation c.2547delG, p.Lys850Serfs*11 in *DENND5A* (NM_015213.3). Diese Variante konnte in den öffentlichen Datenbanken nicht gefunden werden. Um die Segregation der Variante in *DENND5A* in der Familie zu

Ergebnisse

bestätigen, wurde eine Sanger-Sequenzierung des entsprechenden DNA-Abschnittes bei der gesunden Mutter TF016_2, dem gesunden Vater TF016_3, der gesunden Schwester TF016_4 und dem gesunden Bruder TF016_5 durchgeführt. Hierbei waren die Mutter und der Vater jeweils heterozygot für die Variante, die gesunde Schwester und der gesunde Bruder homozygot für den wildtyp.

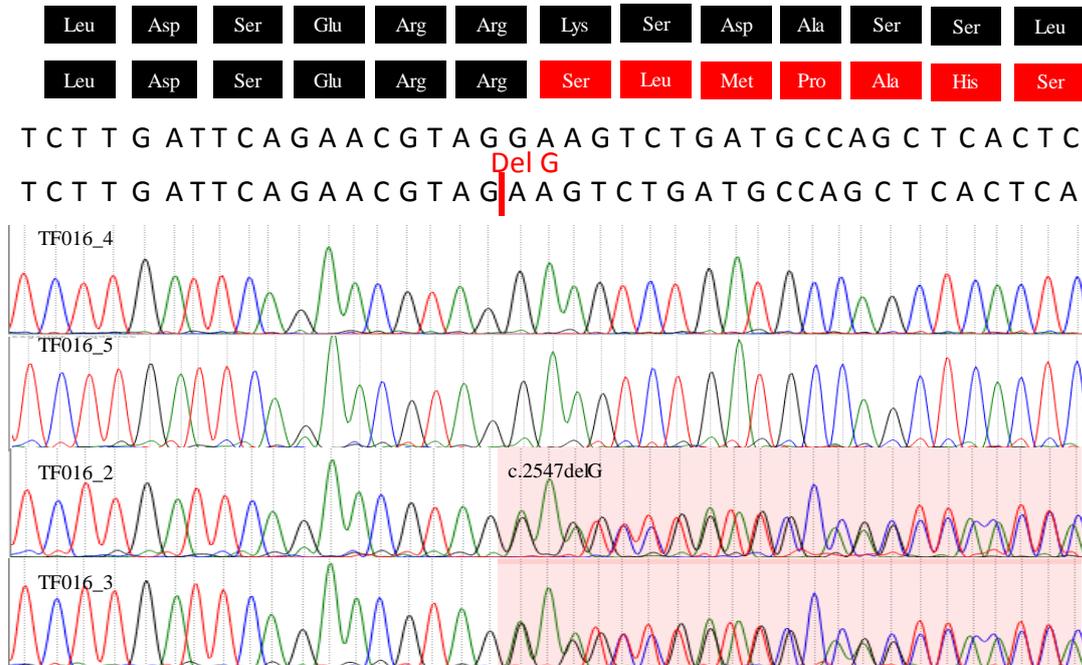


Abbildung 3: Ergebnis Sequenzierung TF016

TF016_4: gesunde Schwester; TF016_5: gesunder Bruder; TF016_3: Vater; TF016_4: Mutter
Die gesunde Schwester und der gesunde Bruder sind homozygot für den wildtyp, der Vater und die Mutter sind heterozygot für die Variante c.2547delG, die in einem *frameshift* resultiert

Damit segregiert die Variante in der Familie. Weitere Mutationen in interessanten Kandidatengen, sowie ein möglicherweise pathogener CNV konnten nicht identifiziert werden. Die Identifizierung der Mutation in *DENND5A* in der Familie *TF016* wurde bereits veröffentlicht (Han et al., 2016).

4.3.3 Phänotyp und Exomsequenzierung Familie I

In Kooperation mit Dr. Peter McPherson (Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Kanada) und Dr. Berge Minassian (Program in Genetics and Genome Biology, Department of Pediatrics (Neurology), Hospital for Sick Children, University of Toronto, Kanada) konnten zwei weitere betroffene Schwestern aus einer konsanguinen Familie aus Saudi-Arabien rekrutiert werden (Han et al., 2016). Die beiden Betroffenen entwickelten nach einer

unauffälligen Schwangerschaft und Geburt bereits in den ersten Lebenstagen Krampfanfälle. Zum Untersuchungszeitpunkt mit 14 bzw. 11 Jahren zeigten sie tägliche tonische, myoklonische, sowie generalisierte tonisch-klonische Anfälle, die jüngere Schwester außerdem eine Hyperekplexie. Des Weiteren konnten sie bei einer stark verzögerten mentalen Entwicklung nicht sprechen und zeigten eine spastische Tetraparese und eine Mikrozephalie. Ebenfalls zeigten sie die bei TF016_1 beobachteten fazialen Auffälligkeiten mit zeltförmigen Mund mit Eversion der Unterlippe, Steilgaumen, kurzem Philtrum, großen Ohren und prominenter Nase mit großen Nares. MRT- und CT-Aufnahmen des Kopfes ergaben diffuse kortikale Atrophie, eine Dysgenese des Corpus callosum, sowie eine Kalzifikation der Basalganglien. Bei der älteren Schwester ergab sich außerdem eine Dandy-Walker-Malformation mit diffusem Hydrocephalus (Han et al., 2016).

Durch Exomsequenzierung für die beiden Betroffenen wurde die homozygote *frameshift*-Mutation c.517_518delGA, p.Asp173Profs*8 in *DENND5A* identifiziert. Diese Variante konnte in den öffentlichen Datenbanken nicht gefunden werden. Die Variante und ihre Segregation mit dem Krankheitsbild in der Familie konnte mit Sanger-Sequenzierung bestätigt werden (Han et al., 2016).

4.3.4 Expression von *DENND5A* in TF016_1

Die *frameshift*-Mutation c.2547delG in Exon 14 (NM_015213.3) der Betroffenen TF016_1 sollte zu einem frühzeitigen Abbau der mRNA durch *Nonsense-mediated mRNA Decay* führen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde aus dem Blut der Betroffenen sowie von drei gesunden Kontrollen RNA extrahiert und diese mithilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde in einer quantitativen PCR mit Primern für in allen Isoformen von *DENND5A* exprimierten Exons (Exon 11 und 12 in der Hauptisoform) eingesetzt. Zur Erstellung der Standardkurve wurde eine Mischung der cDNAs aus den oben genannten Proben in den Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250 erstellt. Zur Standardisierung der verwendeten cDNA-Menge wurden neben den Primern für *DENND5A* auch die endogenen Kontrollen *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *PDHB*, *PO*, *TBP* eingesetzt.

Das Ergebnis der quantitativen PCR zeigt eine starke Variabilität der Expression von *DENND5A* im Blut auch in den gesunden Kontrollen (Abbildung 4).

Ergebnisse

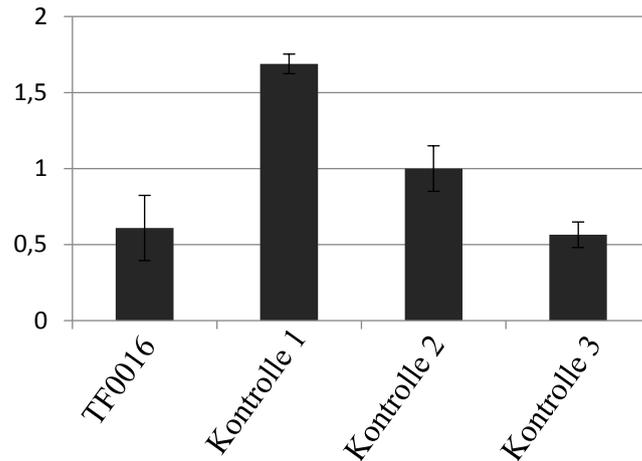


Abbildung 4: Expression von DENND5A in PAXgene RNA von dem Betroffenen TF016_1 und gesunden Kontrollen.

Aufgrund dieser Tatsache lässt sich keine signifikante Aussage zur Veränderung der Expression von DENND5A in der Betroffenen TF016_1 treffen. Allerdings zeigt die quantitative PCR auch für TF016_1 immer noch eine Restexpression von *DENND5A*, sodass es keinen vollständigen Abbau durch *Nonsense-mediated mRNA Decay* zu geben scheint. Da die Mutation c.2547delG; p.Lys850Serfs*11 aber zu einem *frameshift* in der für die Bindung an Interaktionspartner verantwortlichen RUN1-Domäne führt, ist von einem trunkierten Protein mit gestörter Funktion auszugehen.

4.3.5 Die Rolle von DENND5A in der neuronalen Entwicklung

Wie der Kooperationspartner Dr. Peter McPherson (Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Kanada) zeigen konnte, wird *DENND5A* vor allem in neuronalen Gewebe exprimiert, insbesondere während der Entwicklung. Dabei erfüllt DENND5A eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum und die Differenzierung von Nervenzellen. Knockdown von *DENND5A* in kultivierten Neuronen aus dem Hippocampus führte zu einer gestörten neuronalen Entwicklung mit gesteigerten Dendritenauswuchs. Auch ein Knockdown von *DENND5A* in PC12-Zellen führt zu einer vermehrten neuronalen Differenzierung, selbst ohne Stimulation durch den Nervenwachstumsfaktor (NGF). Die Bindung von NGF an seinen Rezeptor TrkA führt in PC12-Zellen zu einer anhaltenden Aktivierung des ERK-Signalweges, was die Differenzierung der Zellen stimuliert. Ein

Ergebnisse

Knockdown von *DENND5A* führt zu einer gesteigerten Aktivierung von ERK, auch ohne Stimulation durch NGF. Des Weiteren kommt es nach Knockdown von *DENND5A* zu einer Hochregulierung der Neurtrophin-Rezeptoren TrkA in PC12-Zellen und TrkB in kortikalen Neuronen der Ratte (Abbildung 5) (Han et al., 2016).

Insofern ist *DENND5A* über die Regulierung des NGF-induzierten ERK-Signalweges an der Differenzierung von Nervenzellen beteiligt. Das Fehlen der inhibierenden Wirkung von *DENND5A* könnte das Gleichgewicht der neuronalen Entwicklung stören und somit zu den Symptomen der Patienten führen.

Ergebnisse

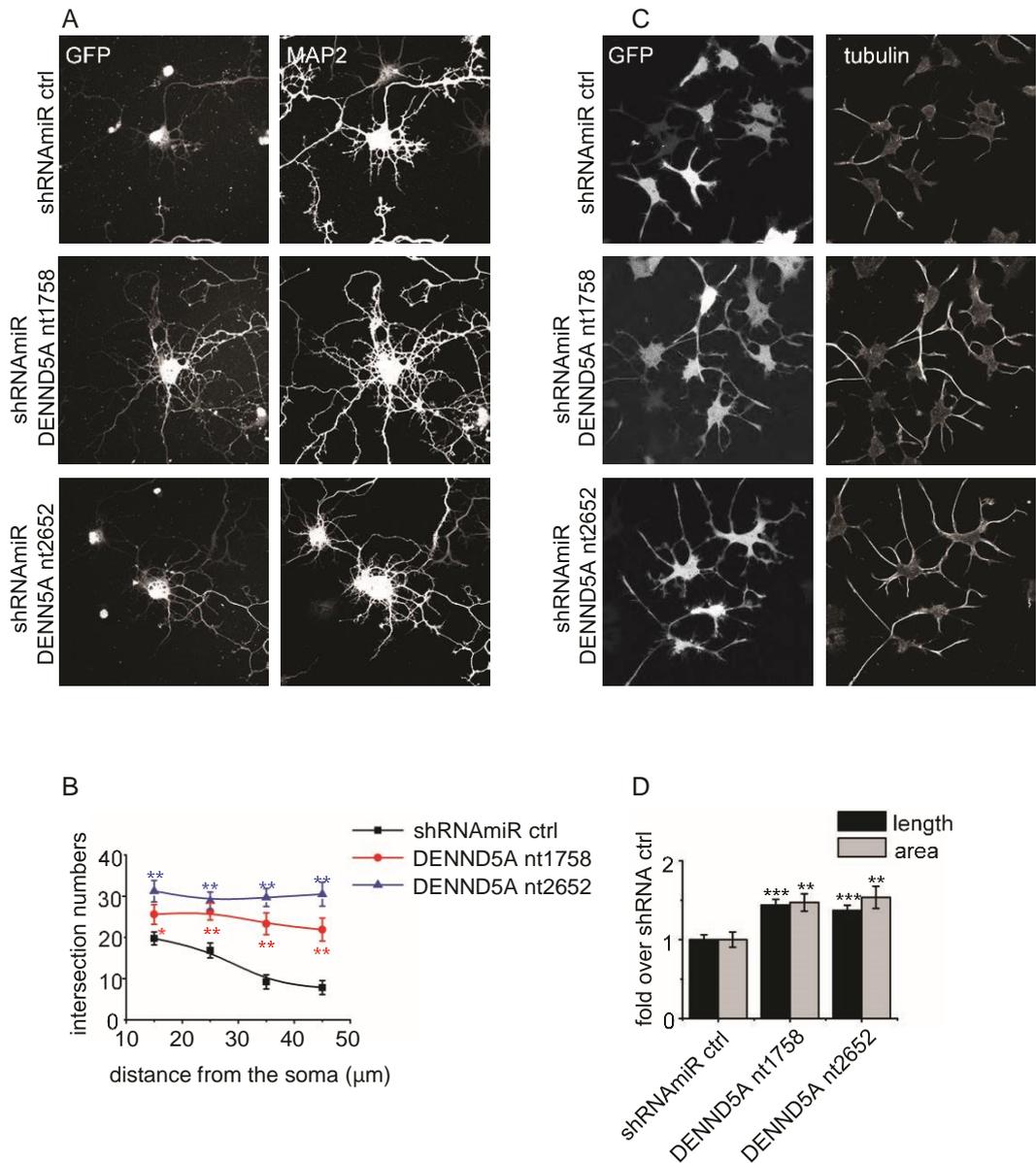


Abbildung 5: Knock-Down von DENND5A in kultivierten Hippocampus- und PC12-Zellen

A: Kultivierte Hippocampus-Neuronen wurden mit zwei verschiedenen auf DENND5A gerichteten, lentiviralen shRNAmir-Vektoren (shRNAmir DENND5A nt1758, shRNAmir DENND5A nt2652) zum Knock-Down von DENND5A und einem Kontroll-shRNAmir-Vektor (shRNAmir ctrl) transduziert. Die anschließend nachgewiesene GFP-Fluoreszenz weist die virale Expression und damit die erfolgte Transduktion nach. Indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen MAP2, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, zeigt die Ausbildung der Dendriten. In den Zellen mit Knock-Down von DENND5A zeigt sich eine gesteigerte Ausbildung von Dendriten im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieses bestätigt sich in Sholl-Analysen der Fluoreszenz-Bilder (**B**), in denen die Komplexität der Dendritenausbildung anhand der neuronalen Überschneidungspunkte in Relation zum Abstand vom Soma verdeutlicht wird. **C:** Auch in PC12-Zellen wurde eine Transduktion mit zwei verschiedenen lentiviralen auf DENND5A gerichteten shRNAmir-Vektoren (shRNAmir DENND5A nt1758, shRNAmir DENND5A nt2652) zum Knock-Down von DENND5A und einem Kontroll-shRNAmir-Vektor (shRNAmir ctrl) vorgenommen. Die indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen α -Tubulin weist in den Knock-Down-Zellen eine stärkere neuronale Differenzierung nach, wie sich in einer vergrößerten Gesamtfläche und längeren Neuriten zeigt (**D**). Die Abbildung wurde modifiziert nach Han et al., 2016 (Han et al., 2016)

4.4 Identifizierung einer Mutation in *DNAJC6* in Familie TF018

4.4.1 Phänotyp Familie TF018

Familie TF018 ist eine konsanguine jordanische Familie (Abbildung 6). Zwei der sechs Kinder der Familie sind von einer Neuroregression mit mentaler Retardierung betroffen. Bei den betroffenen Geschwistern (TF018_1 und TF018_6) entwickelten sich motorische und geistige Fähigkeiten verlangsamt, beide lernten verspätet sitzen und laufen. Ab einem Alter von ca. 10 Jahren kam es zu einem Rückgang der geistigen und motorischen Fähigkeiten und einer zunehmenden Spastizität in den oberen und unteren distalen Extremitäten. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Patienten 18 (TF018_1) und 13 (TF018_6) Jahre alt. Die Fähigkeit zu sprechen und zu laufen waren vollends verloren, die Interaktion mit der Umwelt war stark eingeschränkt. Die Patienten zeigten außerdem Hautauffälligkeiten bestehend aus Wundheilungsstörungen und tiefen vorderen und seitlichen Haaransätzen. Die Schmerzwahrnehmung war deutlich reduziert. Bei dem Betroffenen TF018_6 zeigten sich zudem geschwollene Knie.

Ein weiterer zum Zeitpunkt der Untersuchung 15jähriger Sohn der Familie (TF018_5) war ebenfalls von einer mentalen Retardierung, allerdings ohne Neuroregression, betroffen. Er konnte einige Worte sprechen und zeigte autistisches Verhalten und Jaktationen mit schraubenförmigen Bewegungen des Oberkörpers. Eine weitere Cousine der Betroffenen ist nach anamnestischen Angaben ebenfalls von einer leichter verlaufenden Neuroregression betroffen.

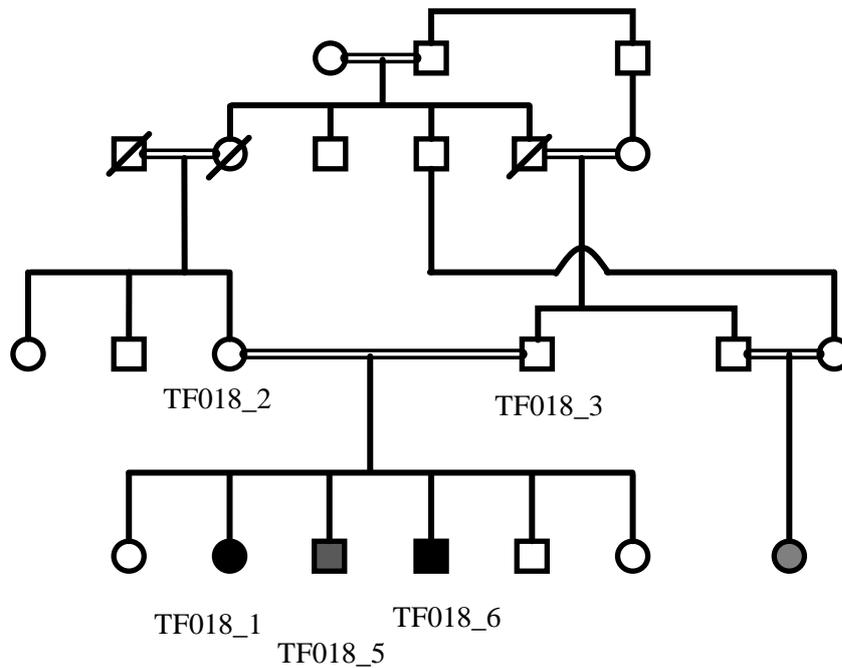


Abbildung 6: Stammbaum Familie TF018

Von den beiden von Neuroregression betroffenen Geschwistern (TF018_1 und TF018_6), der gesunden Schwester (TF018_4) und den Eltern (TF018_2 und TF018_3) liegen DNA-Proben vor. Von der Betroffenen TF018_1 wurde außerdem eine Hautbiopsie entnommen.

4.4.2 Exomsequenzierung Familie TF018

Für den jüngeren betroffenen Sohn TF018_6 wurde eine Exomsequenzierung mit dem *NextSeq 500* System von Illumina durchgeführt. Durch Filterung der bioinformatisch aufbereiteten Daten ergaben sich 68 homozygote Varianten (Tabelle 2). Für vier dieser Varianten wurde von dem Tool *SnpEff* aufgrund der vorliegenden Mutationsart ein hoher Effekt auf die Proteinstruktur vorhergesagt. Hierbei handelte es sich um Varianten in den Genen *DNAJC6*, *LRRC74A*, *KRTAP2-4*, *EMR2*.

Als besonders relevant erschien die Spleißvariante c.801-2A>G in *DNAJC6* (NM_001256864.1). Diese Variante wies in den öffentlichen Datenbanken eine MAF=0% auf. Im *UCSC genome browser* zeigte sich eine hohe Konservierung in anderen Spezies an dieser Stelle im Genom. Die Literaturrecherche ergab, dass jene Variante c.801-2A>G bereits in einer anderen Familie mit juvenilem Parkinson als kausal betrachtet wurde (Edvardson et al., 2012). Zwar handelte es sich hierbei ebenso

Ergebnisse

wie in Familie TF018 um eine Neuroregression, allerdings waren die intellektuellen Fähigkeiten der beschriebenen Betroffenen nicht eingeschränkt. Aufgrund dieser Tatsache wurde nach weiteren Kandidatengen gesucht. Es ergab sich eine weitere interessante homozygote missense-Variante c.2113G>A, p.Val705Met in *GLDC* (NM_000170.2). Diese Variante wurde von den *in-silico-Tools* als pathogen eingestuft. Es sind bereits mehrere Mutationen in *GLDC* bekannt, die zu dem Krankheitsbild der Glycin Enzephalopathie (OMIM: #605899) führen. Bei dieser Krankheit kommt es in unterschiedlichsten Schwereformen und mit variablem Krankheitsbeginn unter anderem zu mentaler Retardierung und Spastiken.

Für die Mutationen in *DNAJC6* und *GLDC* wurde die Segregation in der Familie mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

4.4.3 Sanger-Sequenzierung Familie TF018

Die Sanger-Sequenzierung wurde mit DNA der gesunden Mutter TF018_2, des gesunden Vaters TF018_3, der gesunden Schwester TF018_4, sowie der ältesten betroffenen Schwester TF018_1 durchgeführt.

Für die Variante in *GLDC* ergab sich keine Segregation, da die gesunde Mutter ebenfalls einen homozygoten Genotyp für die Mutation aufwies. Für die Mutation in *DNAJC6* konnte eine Segregation in der Familie nachgewiesen werden (Abbildung 7).

Ergebnisse

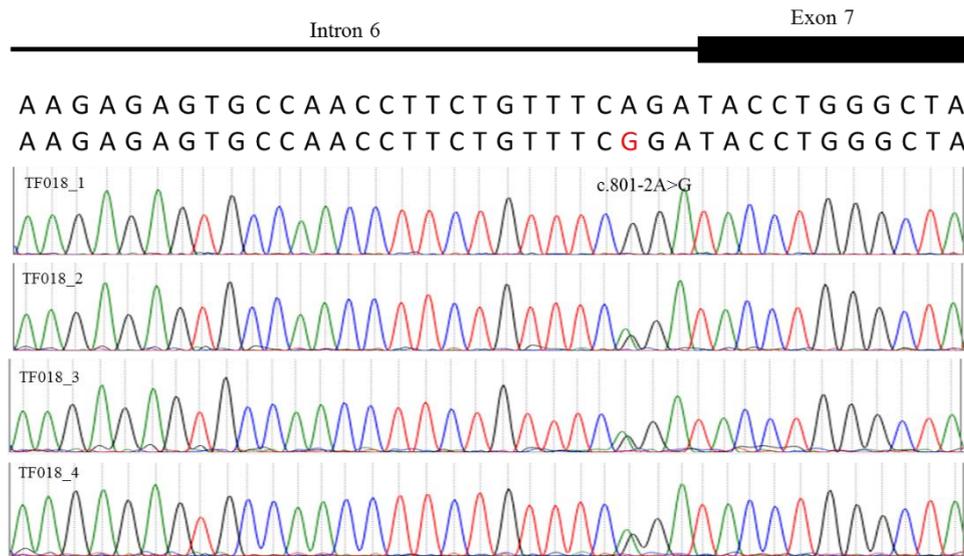


Abbildung 7: Ergebnis Sequenzierung TF018

TF018_1: Betroffene, TF018_2: Mutter, TF018_3: Vater, TF018_4: gesunde Schwester

Die Betroffene weist wie der betroffene Bruder die Mutation c.801-2A>G auf. Mutter, Vater und gesunde Schwester sind heterozygot für diese Mutation

Die Suche nach pathologischen CNVs in den Exomsequenzierungsdaten von TF018_6 ergab kein Ergebnis. Da die Segregation der Variante in *DNAJC6* mit dem Phänotyp in der Familie bestätigt wurde, wurde somit der Verdacht der Pathogenität der Mutation in *DNAJC6* erhärtet. Um einen Effekt jener Mutation auf das Spleißen nachzuweisen, wurde eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese mit der cDNA der Familie durchgeführt.

4.4.4 Untersuchung des Spleißens von *DNAJC6*

Da es sich bei der Mutation c.801-2A>G um eine Spleißmutation handelt, war von einem alternativen Spleißen von *DNAJC6* in den Betroffenen auszugehen. Edvardson et al., die jene Mutation bereits in Patienten mit juvenilem Parkinson identifizierten, konnten für ihre Patienten bereits das Vorhandensein zwei misgespleißter Transkripte und das Fehlen des normalen Transkripts nachweisen. Bei den zwei misgespleißten Transkripten handelte es sich um ein verkürztes Transkript mit Auslassen von Exon 7 und ein out-of-frame gespleißtes Transkript, mit einer Insertion der letzten 91 bp des Introns 6 vor das Exon 7 (Edvardson et al., 2012). Um ein alternatives Spleißen auch für die Patienten der Familie TF018 zu zeigen, wurde RNA aus dem Blut der Betroffenen TF018_1, der gesunden Schwester TF018_4 und einer gesunden Kontrolle TF006_4

Ergebnisse

extrahiert und diese mithilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mit der cDNA eine PCR mit Primern für *DNAJC6*, die den Bereich von Exon 6 bis Exon 8 (NM_001256864.1) umfassten, durchgeführt und die Amplifikate auf ein Gel aufgetragen (Abbildung 8).

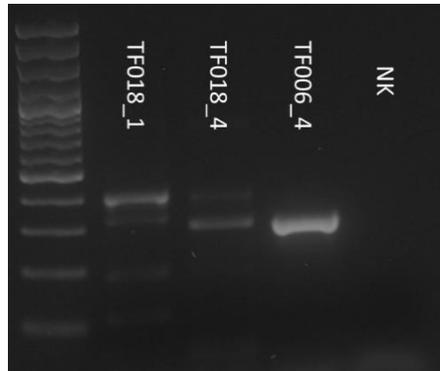


Abbildung 8: Alternatives Spleißen von DNAJC6 in TF018_1

TF018_1: Betroffene, TF018_4 heterozygote, gesunde Schwester, TF006_4: gesunde Kontrolle, NK: Negativkontrolle

Bei der Betroffenen liegen vier verschiedene Transkripte vor, bei der heterozygoten Schwester zwei verschiedene und bei der gesunden Kontrolle nur ein Transkript.

Um die verschiedenen Transkripte zu identifizieren, wurden die einzelnen Banden ausgeschnitten und mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert. Dabei ergab sich, dass es sich bei der starken Bande bei ca. 400 bp bei der Patientin TF018_1 um das ebenfalls von Edvardson et al. beschriebene out-of-frame gespleißte Transkript mit Insertion von 91 bp des Introns 6 vor das Exon 7 handelte. Gleichzeitig lag, wesentlich schwächer, das normal gespleißte Transkript vor, was der schwächeren Bande, die etwas größer als 300 bp ist, entsprach. Auch bei der heterozygoten, gesunden Schwester konnten diese beiden Transkripte nachgewiesen werden. Hier lag allerdings das normal gespleißte Transkript stärker vor als das out-of-frame gespleißte Transkript. Des Weiteren zeigten sich bei der Betroffenen TF018_1 noch zwei weitere Transkripte. Das eine ca. 200 bp große Transkript zeigt ein verkürztes Exon 7 mit einer Deletion der ersten 121 bp des Exon 7. Das andere ca. 100 bp große Transkript konnte nicht sequenziert werden. Allerdings kann vermutet werden, dass es sich aufgrund der Größe um das von Edvardson et al. beschriebene Transkript mit einer kompletten Deletion des Exon 7 handelt.

Ergebnisse

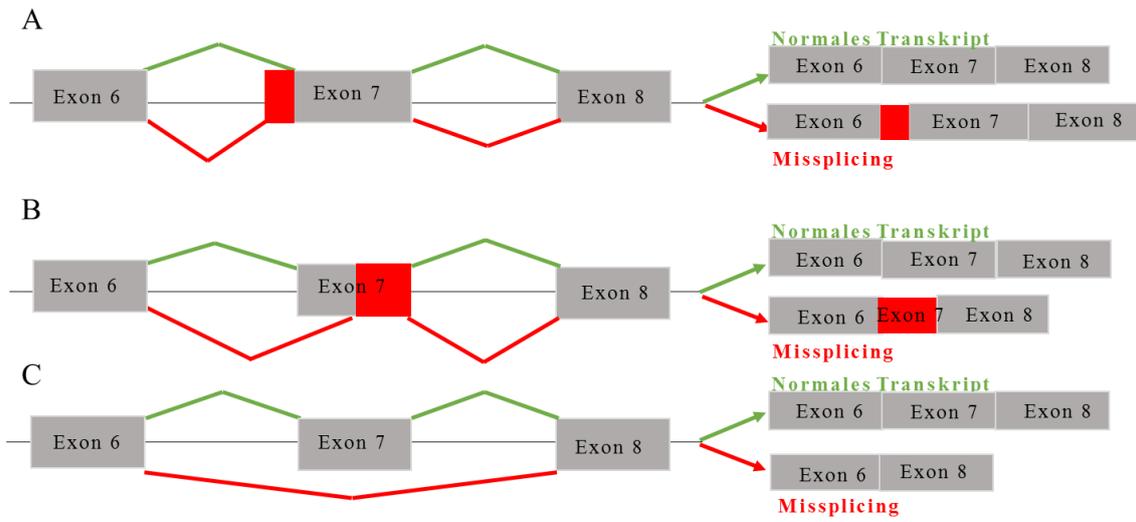


Abbildung 9: Schema des alternativen Spleißens von *DNAJC6* in der Betroffenen TF018_1

4.5 Identifizierung einer Mutation in *NT5C2* in Familie TF004

4.5.1 Phänotyp Familie TF004

Bei der Familie TF004 handelt es sich um eine konsanguine Familie aus Jordanien (Abbildung 10). Die Familie hat einen Sohn und eine Tochter, die beide von einer spastischen Paraplegie mit mentaler Retardierung betroffen sind. Eine weitere Tochter der Familie ist bereits in einem Alter von 11 Monaten verstorben. Es wurde angegeben, dass bei ihr die Diagnose einer infantilen systemischen Hyalinose gestellt wurde.

Bei dem Betroffenen TF004_1 gab die Mutter während der Schwangerschaft vermehrt Schmerzen und Hämaturien an. Nach Geburt fielen eine neonatale muskuläre Hypotonie sowie Dysphagien auf. Die motorische Entwicklung verlief verzögert, der Betroffene lernte erst mit 2,5 Jahren laufen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war er 15 Jahre alt und zeigte eine moderate mentale Retardierung in Kombination mit einer progredienten spastischen Parese. Während das Sprechen bei dem Betroffenen kaum beeinträchtigt war, bestanden vor allem Schwierigkeiten beim Lesen und Schreiben. Der Zeitpunkt des Beginns der spastischen Paraplegie ist nicht bekannt. Bei der Untersuchung lag vor allem eine Spastizität und Parese in den Beinen vor, das Laufen war aber ohne Hilfsmittel möglich.

Seine Schwester (TF004_4) wurde nach einer unauffälligen Schwangerschaft komplikationslos geboren, auch hier zeigten sich aber eine neonatale muskuläre Hypotonie und Dysphagien. Sie lernte ebenfalls erst mit 2,5 Jahren laufen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war sie 12 Jahre alt und zeigte eine moderate mentale Retardierung mit guten Sprachfähigkeiten und eine spastische Paraparese in den Beinen. Wie ihr Bruder konnte die Betroffene ohne Hilfsmittel laufen.

Außerdem zeigten beide Betroffenen Verhaltensauffälligkeiten, sie waren unruhig und zeigten verbale und nonverbale Aggressivität.

Ergebnisse

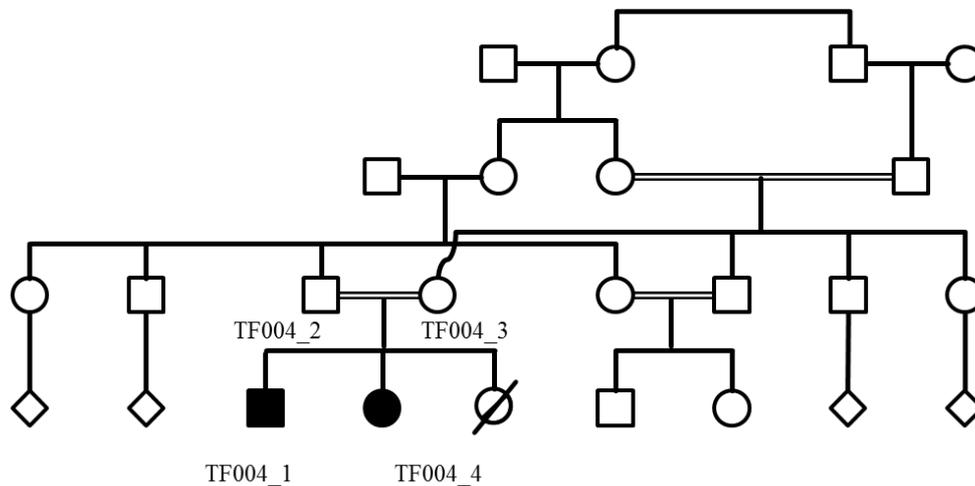


Abbildung 10: Stammbaum Familie TF004

Es liegen DNA-Proben des Vaters (TF004_2), der Mutter (TF004_3) und der betroffenen Geschwister (TF004_01 und TF004_4) vor.

4.5.2 Exomsequenzierung Familie TF004

Um die genetische Ursache für den Phänotyp der Patienten herauszufinden, wurde für den betroffenen Sohn der Familie TF004_1 eine Exomsequenzierung mit dem *NextSeq 500* System von Illumina durchgeführt. Nach bioinformatischer Aufbereitung der Daten und Filterung (Tabelle 2) verblieben 35 homozygote Varianten. Nur für eine dieser Varianten wurde von dem Tool *SnpEff* ein hoher Effekt auf die Proteinstruktur vorhergesagt. Bei dieser Variante handelte es sich um eine *frameshift*-Mutation c.1339dupC, p.Gln447fs in *NT5C2* (NM_001134373.2). Diese Variante konnte in den öffentlichen Datenbanken nicht gefunden werden. Bei der Literaturrecherche ergab sich, dass Mutationen in *NT5C2* bereits mit spastischer Paraplegie assoziiert wurden. So konnten bei neun Patienten mit hereditärer spastischer Paraplegie Mutationen in *NT5C2* gefunden werden. Diese Patienten zeigten neben einer verzögerten motorischen Entwicklung, Spastizität, vor allem in den Beinen, und einem abnormalen Gang zusätzlich geistige Einschränkungen mit Lernschwierigkeiten bis zu mentaler Retardierung. Außerdem konnte bei sechs der Patienten eine Dysplasie oder Hypoplasie des Corpus callosum festgestellt werden (Novarino et al., 2014). Aufgrund des übereinstimmenden Phänotyps der Betroffenen in Familie TF004 mit den beschriebenen

Patienten wurde *NT5C2* als interessantes Kandidatengen betrachtet und die Segregation der Mutation in der Familie mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

4.5.3 Sanger-Sequenzierung Familie TF004

Eine Sanger-Sequenzierung wurde mit der DNA des Vaters TF004_2, der Mutter TF004_3 und der betroffenen Schwester TF004_4 durchgeführt. Für den Vater ergab sich ein heterozygoter Genotyp für die Mutation, ebenso für die Mutter. Die betroffene Schwester ist wie ihr Bruder homozygot für die Variante (Abbildung 11).

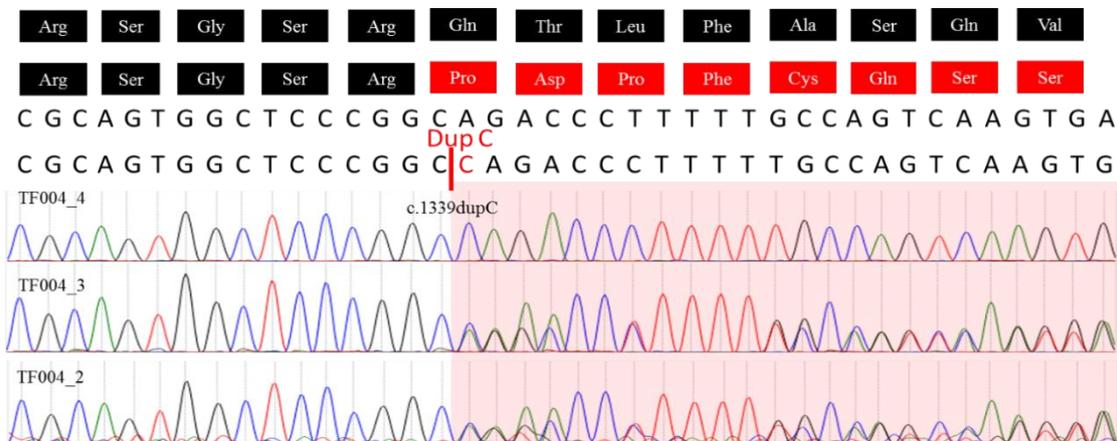


Abbildung 11: Ergebnis Sequenzierung Familie TF004

TF004_4: betroffene Schwester; TF004_3: Vater; TF004_2: Mutter

Die betroffene Schwester zeigt die Mutation c.1339dupC, die zu einem *frameshift* führt. Die Mutter und der Vater sind heterozygot für diese Mutation.

Somit konnte die Segregation der Variante in der Familie bestätigt werden. Da auch die Phänotypen der Patienten mit den beschriebenen Phänotypen übereinstimmten und kein krankheitsverursachender CNV gefunden wurde, wurde die Mutation in *NT5C2* als kausal betrachtet. Auf eine Überprüfung der anderen Varianten wurde daher verzichtet.

4.6 Identifizierung von Varianten in *PTPRD* in Familie TF020

4.6.1 Phänotyp Familie TF020

Familie TF020 ist eine konsanguine Familie aus Jordanien (Abbildung 12). Von den fünf Kindern der Familie sind drei Kinder von einer moderaten mentalen Retardierung betroffen. Schwangerschaft und Geburt der Kinder verliefen unauffällig. Die motorischen Fähigkeiten der Betroffenen entwickelten sich leicht verlangsamt, so konnte die älteste Betroffene (TF020_1) erst mit einem Jahr sitzen, die anderen beiden Betroffenen (TF020_6 und TF020_7) mit 9 Monaten.

Die beiden älteren Betroffenen TF020_1 und TF020_6 zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung im Alter von 20 bzw. 12 Jahren einen ähnlichen Phänotyp. Sie waren von einer moderaten mentalen Retardierung betroffen und konnten 3-4-Wort-Sätze sprechen. Beide konnten zudem erst nach einer nicht näher beschriebenen Operation an der Achillessehne laufen.

Die jüngste Betroffene TF020_7 war zum Zeitpunkt der Untersuchung 7 Jahre alt. Sie zeigte ebenfalls eine moderate mentale Retardierung, konnte aber nur einzelne Worte sprechen. Des Weiteren bestand bei ihr eine Epilepsie und eine Spastizität der Hände. In einem bei ihr durchgeführten MRT des Kopfes wurde eine Mega Cisterna magna festgestellt.

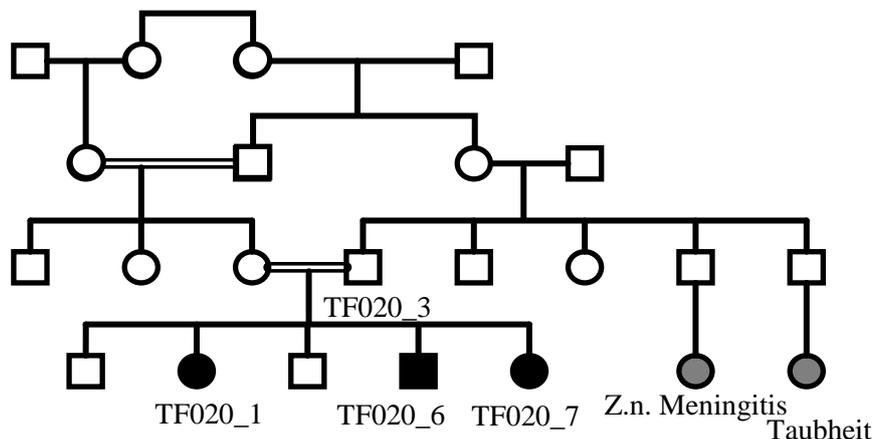


Abbildung 12: Stammbaum Familie TF020

Es wurden von dem Vater (TF020_3) und von den ältesten beiden Betroffenen (TF020_1 und TF020_6) Blutproben abgegeben. Zusätzlich liegen von der jüngsten Betroffenen (TF020_7) Proben von Fibroblasten-Zellen vor.

4.6.2 Exomsequenzierung TF020

Für die älteste Betroffene der Familie TF020_1 wurde eine Exomsequenzierung mit dem *Next Seq 500* System von Illumina durchgeführt. Nach bioinformatischer Aufbereitung der Daten ergaben sich durch Filterung 23 homozygote Varianten (Tabelle 2). Von diesen Varianten wurden für Varianten in *BHMT2*, *PLA2R1*, *PCDHGC4* und *TRMT2A* ein hoher Effekt auf die Proteinstruktur durch das Tool *SnEff* vorhergesagt. Nach Betrachtung der MAF und der Konservierung der Varianten, sowie der Literaturrecherche, erwies sich lediglich die Spleißvariante c.598+1G>A in *BHMT2* (NM_017614.4), als interessant. Nach dem *UCSC genome browser* befindet sich die Variante an einer in anderen Spezies hochkonservierten Stelle im Gen *BHMT2*. *BHMT2* codiert für eine Betain-Homocystein- S-Methyltransferase, die am Homocystein-Stoffwechsel beteiligt ist. Da dysregulierte Aminosäurestoffwechsel insgesamt zu Beeinträchtigungen des Nervensystems führen können, wurde die Segregation der Variante mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Aufgrund nur geringer Informationen zur Funktion von *BHMT2* und einer von *BioGPS* als niedrig angegebenen Expression von *BHMT2* im Nervensystem wurden noch weitere Varianten untersucht.

Da unter den homozygoten Varianten keine weiteren potentiellen Kandidatengene gefunden werden konnten, wurden außerdem die 95 compound-heterozygoten Varianten betrachtet. Hiervon erwiesen sich Varianten in zwei Genen, *TECPRI* und *PTPRD*, als interessant. Bei *PTPRD* (NM_002839.3) lagen zwei missense-Varianten, c.4690A>G, p.Ile1564Val und c.2533C>T, p.Pro845Ser, in von *UCSC genome browser* als hochkonserviert angegebenen Genabschnitten. In *TECPRI* (NM_015395.2) ergaben sich die zwei missense-Variante in ebenfalls hochkonservierten Bereichen c.1847A>G, p.Gln616Arg und c.328G>T, p.Ala110Ser. In dem Gen *PTPRD* konnte bereits eine Mikrodeletion bei einem Jungen mit Trigonocephalie, Gesichtsfehlbildungen, Taubheit, mentaler Retardierung und Sprachproblemen nachgewiesen werden (Choucair et al., 2015). *TECPRI* ist an der Autophagie in Zellen beteiligt (Ogawa et al., 2011; Chen and Zhong, 2012). Für beide Kandidatengene wurde die Segregation in der Familie mit Sanger-Sequenzierung überprüft.

4.6.3 Sanger-Sequenzierung TF020

Ergebnisse

Die Sanger-Sequenzierung wurde mit DNA des Vaters TF020_2 und des betroffenen Bruders TF020_6 durchgeführt, von den anderen Familienmitgliedern lagen keine DNA-Proben vor. Die Varianten in *TECPRI* und *BHMT2* konnten aufgrund des Genotyps des betroffenen Bruders, der die Varianten nicht aufwies, als Ursache für die mentale Retardierung ausgeschlossen werden. Für die beiden Mutationen in *PTPRD* konnte eine Segregation in der Familie nachgewiesen werden. Der gesunde Bruder TF020_6 wies für beide Varianten in *PTPRD* einen heterozygoten Genotyp auf, der Vater TF020_3 zeigte für die Variante c.2533C>T ebenfalls einen heterozygoten Genotyp, für die Variante c.4690A>G war er homozygot für den wildtyp (Abbildung 13, Abbildung 14).

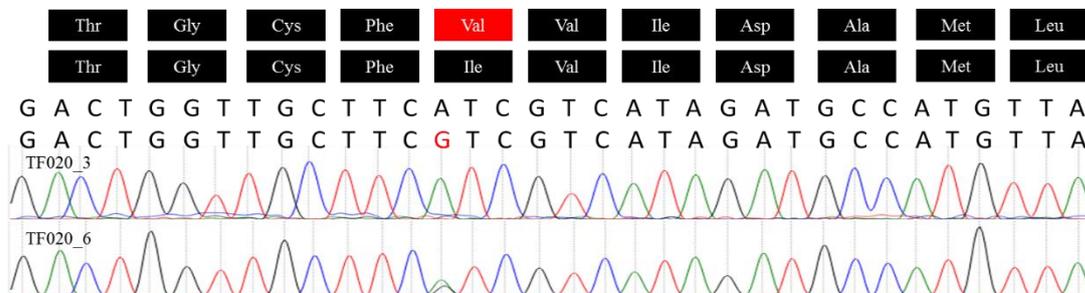


Abbildung 13: Ergebnis Sequenzierung Familie TF020, Mutation c.2533C>T in *PTPRD* in Exon 28
TF020_3: Vater, TF020_6: Bruder

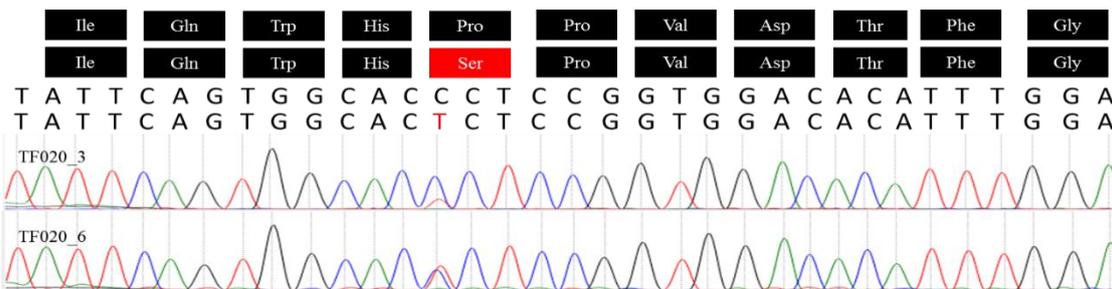


Abbildung 14: Ergebnis Sequenzierung Familie TF020, Mutation c.4690A>G in *PTPRD* in Exon 40
TF020_3: Vater, TF020_6: Bruder

Da keine weiteren interessanten Kandidatengene und kein interessanter CNV in Familie TF020 gefunden wurden, könnten die Varianten in *PTPRD* krankheitsverursachend sein. Um eine Pathogenität zu beweisen müssten aber weitere funktionelle Versuche unternommen werden.

4.7 Familie TF023

4.7.1 Phänotyp TF023

Familie TF023 ist eine große jordanische Familie mit vielen konsanguinen Verbindungen (Abbildung 15). Von den acht Kindern zeigen zwei Kinder eine moderate mentale Retardierung, ein weiteres betroffenes Kind ist im Alter von 14 Jahren verstorben.

Der älteste Betroffene (TF023_1) zeigte eine Entwicklungsverzögerung, er lernte erst verspätet laufen und sitzen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war er 17 Jahre alt und moderat mental retardiert. Er zeigte ein Strabismus und ein sehr aktives Verhalten mit Stereotypien wie wiederholtes Klatschen der Hände. Ein bei ihm durchgeführtes MRT ergab eine Agenesie des Corpus callosum und atrophische Veränderungen des Gehirns im frontalen Bereich.

Die jüngste Betroffene (TF023_9) war zum Zeitpunkt der Untersuchung 2 Jahre alt, ihre Entwicklung war ebenfalls verlangsamt. Sie konnte mit Unterstützung sitzen, aber noch nicht laufen und sprechen. Des Weiteren zeigte sie eine Spastizität der unteren und oberen Extremitäten. Bei der Betroffenen lag außerdem eine Septo-optische Dysplasie mit Sehinderung und Strabismus vor. In Verbindung mit dieser Septo-optischen Dysplasie zeigten sich im MRT der Patientin ein fehlendes Septum pellucidum und eine Agenesie des Corpus callosum, außerdem eine Kolpozephalie mit dilatierten Hinterhörnern der Seitenventrikel und ein leichter Hydrocephalus. Bei ihr wurde außerdem eine Hypothyreose diagnostiziert, die mit L-Thyroxin behandelt wird. Ein bei ihr durchgeführtes Blutbild war außer einer leichten Thrombozytopenie unauffällig.

Anamnestisch ergab sich außerdem der Verdacht, dass weitere, entferntere verwandte Familienmitglieder ebenfalls eine mentale Retardierung aufweisen.

eine homozygote *frameshift*-Mutation beschrieben, die als kausal für das Krankheitsbild einer mentalen Retardierung mit fazialen Auffälligkeiten, Strabismus und Agenesie des Corpus callosum und Hypoplasie des Cerebellums angesehen wurden (Fine et al., 2015). Aufgrund der Ähnlichkeiten des beschriebenen Phänotyps mit dem Phänotyp der Patienten wurde die Segregation der Variante in der Familie überprüft.

In *CNTNAP4* (NM_033401.3) lag die missense-Variante c.1399G>T, p.Ala467Ser vor. Diese Variante konnte in den öffentlichen Datenbanken nicht gefunden werden. Obwohl die Ergebnisse der computergestützten Vorhersageprogramme für die Einordnung der Pathogenität der Variante nicht eindeutig waren, wurde die Segregation der Variante in der Familie überprüft, da es sich bei *CNTNAP4* um ein Protein der Neurexin-Familie handelt (Spiegel et al., 2002).

4.7.3 Sanger-Sequenzierung TF023

Eine Sanger-Sequenzierung wurde mit der DNA der Mutter TF023_2, der gesunden Schwester TF023_4 und der betroffenen Schwester TF023_9 durchgeführt. Für alle drei Gene konnte die Segregation der Variante in der Familie nicht bestätigt werden, da die betroffene Schwester TF023_9 nicht homozygot für die Varianten war.

Nach diesem Ergebnis wurden auch die 71 compound-heterozygoten Varianten der Exomsequenzierung betrachtet, allerdings wurden keine interessanten Kandidatengene gefunden. Auch eine Überprüfung der mit dem *CNVHunter* gefundenen CNVs in dieser Familie ergab kein Hinweis auf einen krankheitsauslösenden CNV.

4.8 CNV-Analyse

Für alle der sequenzierten Exome der Betroffenen wurde eine Analyse möglicherweise pathogener CNVs durchgeführt. Zur Erkennung von CNVs wurde das im Institut von Dr. Marc Sturm aus der AG Genomik entwickelte Programm *CnvHunter* (<https://github.com/imgag/ngs-bits/blob/master/doc/tools/CnvHunter.md>) verwendet. Die gefunden CNVs wurden mit bekannten CNVs in der DECIPHER-Datenbank (Firth H. et al., 2009) im *UCSC genome browser* mit dem Referenzgenom hg19 verglichen, um krankheitsverursachende CNVs zu finden. Insgesamt konnte hierbei nur in einer Familie, TF003, ein interessanter CNV gefunden werden. Im Folgenden soll dieses Ergebnis ausführlicher dargestellt werden.

4.9 Identifizierung eines CNV in Familie TF003

4.9.1 Phänotyp TF003

Familie TF003 ist eine jordanische konsanguine Familie mit einer betroffenen Tochter (Abbildung 16). Die Betroffene entwickelte sich verlangsamt und lernte erst im Alter von 2,5 Jahren laufen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Betroffene 10 Jahre alt. Sie zeigte eine moderate mentale Retardierung, eine Wachstumsverzögerung (Körperlänge bei Untersuchung: 124 cm, unter der 3. Perzentile) und eine Mikrozephalie (Kopfumfang bei Untersuchung: 49 cm, unter der 3. Perzentile). Außerdem traten bei ihr Ataxie, choreatische Bewegungen und ein Tremor auf. Sie konnte nicht sprechen und zeigte (auto)aggressive Verhaltensauffälligkeiten und einen gestörten Schlafrhythmus. Weiterhin bestand eine Epilepsie, die in der Vergangenheit mit Carbamazepin behandelt wurde.

Ein bei der Betroffenen im Alter von einem Jahr durchgeführtes MRT ergab eine milde diffuse Gehirnatrophie, ein weiteres MRT im Alter von 7 Jahren zeigte allerdings keinerlei Auffälligkeiten. Eine Bluteruntersuchung mit großem Blutbild und Überprüfung der Elektrolyte, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure und Glucose war unauffällig.

Ergebnisse

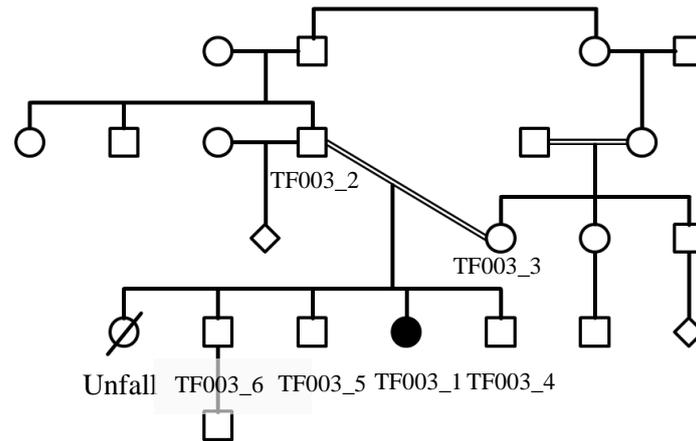


Abbildung 16: Stammbaum Familie TF003

4.9.2 Identifizierung eines CNV

Für die Betroffene TF003_1 wurde eine Exomsequenzierung mit dem *NextSeq500* System von Illumina durchgeführt. Nach bioinformatischer Aufbereitung der Daten wurde mit dem Programm *CnvHunter* nach CNVs gesucht und diese mit bekannten CNVs in der DECIPHER-Datenbank (Firth et al., 2009) im *UCSC genome browser* mit dem Referenzgenom hg19 verglichen. Dabei ergab sich eine 1,3 Mb umfassende Deletion auf Chromosom 4q21.22-21.23. Für diese Region sind bereits mehrere Deletionen bei Patienten mit 4q21 Mikrodeletion Syndrom (OMIM: #613509) bestehend aus mentaler Retardierung, Wachstumsverzögerung, Muskelhypotonie und fehlender oder verzögerter Sprachentwicklung beschrieben worden (Bonnet et al., 2010). Um den CNV zu bestätigen und das Vererbungsmuster aufzuklären, wurde eine Microarray-Untersuchung mit einem CytoScan7590 K Array für die Betroffene, die Mutter sowie zwei gesunde Brüder durchgeführt. Hierbei wurde die Deletion bestätigt und der von der Deletion betroffene Bereich auf 2,8 Mb erweitert (Abbildung 17). Weitere pathogene CNVs wurden nicht gefunden. Die Mutter und die gesunden Brüder zeigten keine Deletion an dieser Stelle, womit eine *de novo* Entstehung wahrscheinlich ist. Ohne DNA des Vaters lässt sich dies allerdings nicht sicher ausschließen. Durch die Bestätigung des CNV mit dem Array und der Übereinstimmung des Phänotyps der Betroffenen mit den bereits beschriebenen Patienten mit einer Deletion in Chromosom 4q21.22-21.23 wurde die Kausalität dieser Deletion für das Krankheitsbild der Betroffenen angenommen.

Ergebnisse

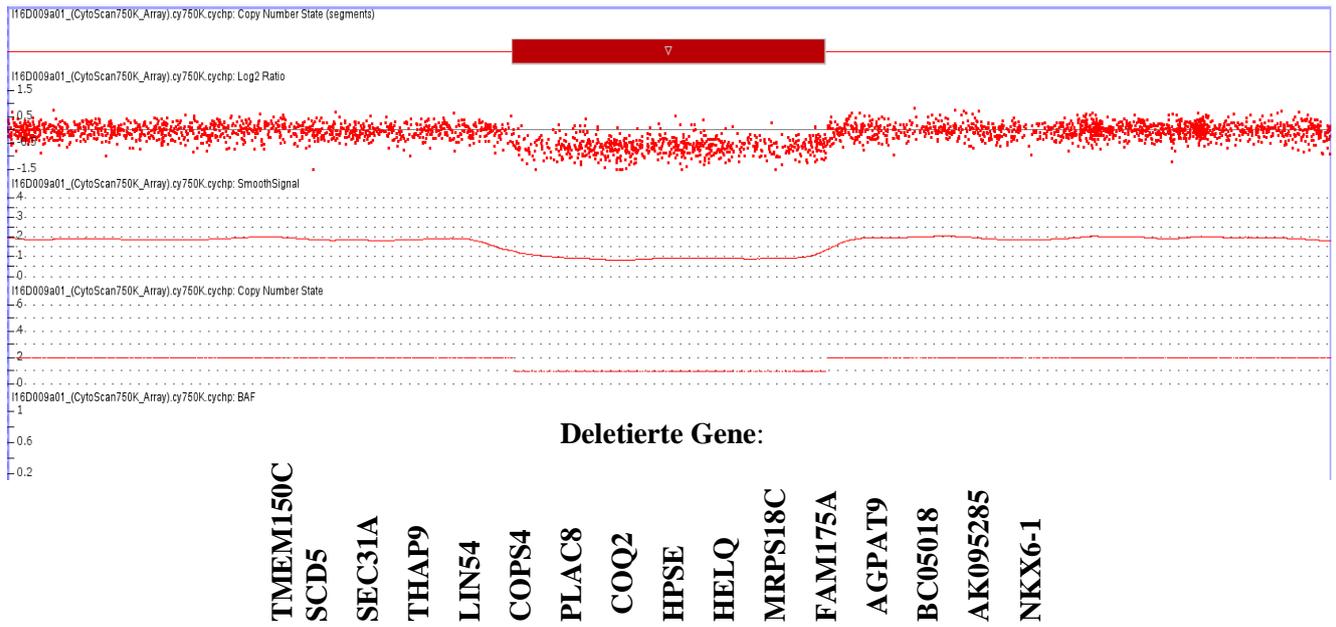


Abbildung 17: Ergebnis des CytoScan750 K Array: Deletion auf Chromosom 4q21.22-21.23 bei TF003_1

5. Diskussion

5.1 Identifizierung von Kandidatengen für MR mittels NGS

Die Entwicklung des NGS und die dadurch entstandene Möglichkeit, große Menge an genetischen Material in relativ kurzer Zeit zu sequenzieren, hat die Erforschung genetischer Ursachen von mentaler Retardierung revolutioniert. Bereits mehr als 900 Gene wurden bereits als ursächlich für mentale Retardierung identifiziert und die Zahl steigt immer weiter an (SysID-Datenbank, Kochinke et al., 2016). Die durch diese Zahl verdeutlichte starke genetische Heterogenität von mentaler Retardierung und die damit verbundene Schwierigkeit in der genetischen Abklärung von mentaler Retardierung zeigt den Bedarf an weiterer Identifizierung von Kandidatengen.

In dieser Arbeit wurden dazu die Exome von fünf konsanguinen Familien mittels NGS sequenziert. Nach bioinformatischer Aufbereitung der Daten wurden die gefundenen Varianten nach ihrer Pathogenität priorisiert. Hierbei wurde die Art der Mutation, ihr vorhergesagter Effekt auf die Proteinfunktion, die Funktion des Gens und möglicherweise bereits mit dem Gen assoziierte Pathologien beachtet. Anschließend wurde die Segregation der interessantesten Varianten mit dem Phänotyp in der Familie überprüft und gegebenenfalls weitere funktionelle Analysen angestellt. Hierbei konnte *DENND5A* als Kandidatengen mit höchster Priorität identifiziert werden. In zwei weiteren Familien konnten Mutationen in den bereits mit mentaler Retardierung assoziierten Genen *DNAJC6* und *NT5C2* gefunden werden. Als mögliches weiteres Kandidatengen ergab sich außerdem *PTPRD*. In einer der untersuchten Familie konnte keine relevante Variante identifiziert werden.

5.2 Identifizierung einer Mutation in *DENND5A* in Familie TF016 und Familie 1

In Familie TF016 konnte bei einer Betroffenen mit epileptischer Enzephalopathie mit schwerer mentaler Retardierung eine homozygote Frameshift-Mutation c.2547delG, p.Lys850Serfs*11 in *DENND5A* identifiziert werden. Durch Kooperation mit Dr. Berge Minassian (Program in Genetics and Genome Biology, Department of Pediatrics (Neurology), Hospital for Sick Children, University of Toronto, Kanada) konnten bei zwei weiteren Betroffenen aus einer saudi-arabischen konsanguinen Familie 1 eine

andere homozygote *frameshift*-Mutation c.517_518delGA, p.Asp173Profs*8 in *DENND5A* gefunden werden.

5.2.1 *DENND5A* als Kandidatengen für mentale Retardierung

DENND5A kodiert für einen GTP-Austauschfaktor für Proteine der Rab-Familie, der am trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert und am Vesikeltransport beteiligt ist (Recacha et al., 2009; Han et al., 2016).

DENND5A besteht aus einer DENN-Domäne am N-Terminus, sowie zwei RUN-Domänen RUN1 und RUN2, die eine PLAT-Domäne umgeben (Abbildung 18).

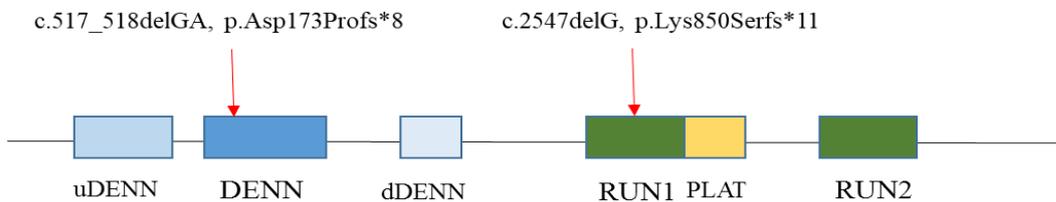


Abbildung 18: Domänen in *DENND5A*

Die roten Pfeile signalisieren die Mutationen bei Familie TF016 (c.2547delG, p.Lys850Serfs*11) und Familie I (c.517_518delGA, p.Asp173Profs*8). Eigene Darstellung, angelehnt an Han et al., 2016

Rab-Proteine erfüllen wichtige Funktionen in der Regulierung des Vesikeltransports in Zellen. Als G-Protein werden Rabs durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert. Dieser Austausch wird von den GTP-Austauschfaktoren (GEF=*Guanosine triphosphate exchange factor*) reguliert (Stenmark and Olkkonen, 2001). Mehr als 40 verschiedene GEFs sind bisher bekannt, davon machen einen Großteil DENN-Domäne enthaltende Proteine und DENN-Domäne-related Proteine aus (Ishida et al., 2016). Die DENN-Domäne mit ihrer Funktion als GEF ist hoch konserviert (Yoshimura et al., 2010; Ishida et al., 2016). Des Weiteren sind DENN-Domäne enthaltende Proteine an der Regulierung von MAPK/ERK-Signalwegen beteiligt (Levivier et al., 2001).

DENND5A wirkt als GEF für Rab39A/B (Yoshimura et al., 2010). Rab39A ist an der Regulation von Entzündungsprozessen (Becker et al., 2009), von Phagosomen und Autophagie (Seto et al., 2013), und über die Interaktion mit UACA an der neuronalen Differenzierung (Mori et al., 2013) beteiligt. Für Rab39B ist eine Beteiligung am Membranrecycling durch Vesikeltransport am Golgi-Apparat und hierüber an der Entwicklung von Synapsen bekannt (Giannandrea et al., 2010).

Die in DENND5A identifizierten RUN-Domänen können ebenfalls in Rab- und Rap-Signalwege regulierenden Proteinen gefunden werden (Fukuda et al., 2011). Für die RUN1 und RUN2-Domäne von DENND5A sind mehrere Interaktionspartner bekannt. Die RUN1-Domäne bindet an Rab6A/B (Recacha et al., 2009; Fukuda et al., 2011). Rab6A ist auf verschiedenen Ebenen des Vesikeltransportes am Golgi-Apparat beteiligt, einschließlich retrograder Transport vom Golgi-Apparat zum ER, intra-Golgi-Transport, Transport von exozytotischer Vesikel zur Membran und Transport von Recycling-Endosomen zum Golgi-Apparat (Martinez et al., 1994; White et al., 1999; Mallard et al., 2002; Grigoriev et al., 2007). DENND5A vermittelt hierbei unter anderem die Interaktion von Rab6A und Rab11 beim Transport von Recycling-Endosomen zum Golgi-Apparat und nach neueren Untersuchungen darüber hinaus in der Metaphase der Mitose (Miserey-Lenkei et al., 2007). Am Transport von Endosomen zum Golgi-Apparat ist DENND5A weiterhin über die Interaktion der RUN2-Domäne mit Sorting Nexin 1 (SN1), das ein Bestandteil des Retromer-Komplexes für das Recycling von Transmembran-Rezeptoren ist, beteiligt (Wassmer et al., 2009; Fernandes et al., 2012). Insgesamt übernimmt DENND5A über seine verschiedenen Interaktionen vielfältige Regulierungsaufgaben des Vesikeltransportes am Golgi-Netzwerk. Die in der Familie TF016 gefundene *frameshift*-Mutation liegt in der RUN1-Domäne, somit ist das Protein wahrscheinlich nicht funktionsfähig.

5.2.2 Störungen des Vesikeltransportes führen zu MR

Ein gestörter Vesikeltransport durch Mutationen in verschiedenen Genen wurde bereits mehrfach mit mentaler Retardierung assoziiert (van Bokhoven, 2011).

Eines dieser Gene ist *RAB39B*, für das DENND5A als GEF fungiert (Giannandrea et al., 2010). Giannandrea und Kollegen identifizierten in zwei Betroffenen aus verschiedenen Familien mit mentaler Retardierung, Krampfanfällen und Makrozephalie Mutationen in *RAB39B*. In funktionellen Untersuchungen konnten sie bei Fehlfunktionen von *RAB39B* ein gestörtes Neuronenwachstum mit verminderter Bildung von Nervenverzweigungen, sowie beeinträchtigter Synapsenbildung zeigen (Giannandrea et al., 2010).

In Betroffenen mit epileptischer Enzephalopathie mit mentaler Retardierung konnten außerdem Mutationen in weiteren am Vesikeltransport beteiligten Genen gefunden

werden. Für das Gen *TBC1D24* (OMIM: *613577) (Balestrini et al., 2016) konnte eine Interaktion mit ARF6 nachgewiesen werden (Falace et al., 2014). ARF6 reguliert über Aktinmodulation den Transport zwischen Plasmamembran und Endosomen und ist hierüber auch an der neuronalen und synaptischen Differenzierung beteiligt (Jaworski, 2007). Weiterhin wurden Mutationen in *IQSEC2* (OMIM: #309530), einem GEF von ARF6, in mehreren Patienten mit mentaler Retardierung mit Epilepsie und Mikrozephalie identifiziert (Shoubridge et al., 2010). In einer Familie mit sechs Betroffenen mit epileptischer Enzephalopathie mit psychomotorischer Entwicklungsverzögerung sind Mutationen in *NECAP1* (OMIM: #615833), das an der Endozytose von Clathrin-coated Vesikeln beteiligt ist, nachgewiesen worden (Alazami et al., 2014). Für ein weiteres als Dynamin an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligtes Protein sind Mutationen in dem hierfür codierenden Gen *DNMI* (OMIM: #616346) gefunden worden, die zu epileptischer Enzephalopathie führen (EuroEPINOMICS-RES Consortium et al., 2014; Deciphering Developmental Disorders Study, 2015; Dhindsa et al., 2015).

Weiterhin wurden bereits mehrere Proteine der verschiedenen Adaptor Protein Komplexe, die die Bindung von Clathrin an seine Interaktionspartner in Clathrin-coated Vesikeln vermitteln, wie AP4E1, AP4S1, AP4B1 und AP1S2, als Gene für mentale Retardierung beschrieben (Abou Jamra et al., 2011; Moreno-De-Luca et al., 2011; Cacciagli et al., 2014). Betroffene mit Mutationen in *AP1S2* zeigen ebenso wie die Betroffenen der Familien TF016 und 1 Kalzifikationen in den Basalganglien (Saillour et al., 2007; Cacciagli et al., 2014). Dieses könnte darauf hinweisen, dass diese Calcium-Einlagerungen durch gestörte Vesikel-Transportprozesse entstehen könnten.

Insgesamt sind Beeinträchtigungen des Vesikeltransports bereits mehrfach mit der Entstehung von mentaler Retardierung und epileptischer Enzephalopathie in Verbindung gebracht worden. Der Phänotyp der in dieser Arbeit vorgestellten Betroffenen passt zu den in der Literatur beschriebenen Krankheitsbildern. Angesichts der Funktion von *DENND5A* im Vesikeltransport, ist *DENND5A* somit als ein neues Gen für mentale Retardierung anzusehen. In der Zwischenzeit konnten durch Exomsequenzierungen von Anazi et al. in zwei weiteren Betroffenen mit epileptischer Enzephalopathie mit Mikrozephalie Mutationen in *DENND5A* identifiziert werden (Anazi et al., 2016).

Diskussion

Tabelle 3: Übersicht über die Phänotypen der bisher identifizierten Patienten mit Mutation in DENND5A

Patient	TF016_1	Han et al. Familie 1, Patient II-6	Han et al. Familie 1, Patient II-7	Anazi et al., Patient 16DG0219	Anazi et al., Patient 12DG1579
Mentale Retardierung	+ (schwer)	+ (schwer)	+ (schwer)	+	+
Epilepsie	+	+	+	+	+
Mikrozephalie	+	+	+	+	?
Wachstumsverzögerung	+	?	?	?	?
zerebrale Kalzifikationen	+	+	+	?	?
Weitere Auffälligkeiten im CT/MRT	vergrößerte Ventrikel	Kortikale Atrophie, Dysgenese Corpus callosum, Dandy- Walker- Malformation mit Hydrozephalus	Kortikale Atrophie, Dysgenese Corpus callosum	-	Hydrozephalus, Holoprosenceph alie
Fasziale Auffälligkeiten	zeltförmiger Mund, Eversion der Unterlippe, kurzes Philtrum, prominente Nase und Ohren	Zeltförmiger Mund, Eversion der Unterlippe, Steilgaumen, kurzes Philtrum, prominente Nase und Ohren	Zeltförmiger Mund, Eversion der Unterlippe, Steilgaumen, kurzes Philtrum, prominente Nase und Ohren	+	Hypotelorismus
Sonstige Symptome	selbstverletzend es Verhalten, Angstzustände	Spastische Tetraparese	Spastische Tetraparese, Hyperreflexie	Blindheit	Hyperreflexie, muskuläre Hypertonie, Asthma, chronische Obstipation

Abkürzungen: vorhanden: +; nicht vorhanden: -; unbekannt: ?

5.2.3 Rolle von DENND5A in der neuronalen Differenzierung

Wie in Kooperation mit Dr. Peter McPherson (Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Kanada) gezeigt werden konnte, ist DENND5A als inhibierender Regulator an der neuronalen Differenzierung beteiligt. Ein Verlust der Funktion von DENND5A führt zu einer Hochregulierung von Neurotrophin-Rezeptoren und einer verstärkten Aktivierung von ERK im durch die Rezeptoren vermittelten ERK-Signalweg, was schließlich zu einer unkontrollierten neuronalen Differenzierung führt (Han et al., 2016). Die genauen molekularen Mechanismen dieser Wirkung von DENND5A bleiben unklar. Durch einen beeinträchtigten Vesikeltransport könnte das Gleichgewicht aus Rezeptoreinbau und -ausbau in der Plasmamembran gestört sein und so mehr Neurotrophin-Rezeptoren vorhanden sein (Han et al., 2016). Weiterhin könnte auch eine direkte Beeinflussung von DENND5A auf den ERK-Signalweg bestehen. Eine Regulation von ERK-

Signalwegen wurde bereits für andere DENN-Domänen enthaltene Proteine gezeigt (Levivier et al., 2001).

Insgesamt zeigt sich, wie auch in der Literatur beschrieben, dass eine intakte Funktion des Golgi-Apparates und des Vesikeltransports für die Entwicklung des Nervensystems essenziell ist. Die Fehlfunktion von DENND5A führt zu einer gestörten neuronalen Differenzierung mit überschießender Dendriten- und Neuritenwachstum. Gleichzeitig könnte die in *DENND5A*-Knockout-Zellen beobachtete TrkA-Aktivierung in Abwesenheit von NGF zu Nervenzelluntergang führen, wie dies zumindest in Neuroblastoma-Zellen gezeigt wurde (Han et al., 2016; Ruggeri et al., 2016). Ein solches Ungleichgewicht in der neuronalen Entwicklung könnte die Symptome der Patienten erklären. In Zukunft ist daher die Untersuchung der genauen Funktion von DENND5A in Bezug auf die Entwicklung des Nervensystems und ein Zusammenhang dieser Prozesse mit den beobachteten Phänotypen von besonderem Interesse.

5.3 Identifizierung einer Mutation in *DNAJC6* in Familie TF018

In Betroffenen der Familie TF018 wurde die homozygote Spleißvariante c.801-2A>G in *DNAJC6* identifiziert. *DNAJC6* kodiert für das neurospezifische Protein Auxilin, das an der Wiederverwertung der Clathrin-coated Vesikel bei der Endozytose beteiligt ist (Ungewickell et al., 1995; Yim et al., 2010).

Die Mutation c.801-2A>G in *DNAJC6* wurde bereits in einer Familie mit juvenilen Parkinson als kausal identifiziert. Bei dieser Familie handelte es sich um eine konsanguine Familie mit zwei Betroffenen, die nach einer unauffälligen Entwicklung im Alter von 11 bzw. 7 Jahren typische Symptome von Parkinson wie Bradykinesie, Tremor und Rigor entwickelten und nach kurzen Verlauf von 2 bzw. 11 Jahren auf einen Rollstuhl angewiesen waren. Die mentalen Fähigkeiten der Betroffenen waren nicht eingeschränkt (Edvardson et al., 2012). Zwar zeigen im Vergleich die Betroffenen der Familie TF018 eine schwere mentale Retardierung und keine Zeichen von Tremor und Rigor, allerdings liegt bei ihnen ebenfalls ein früheinsetzender, schnell progredienter neuroregressiver Phänotyp vor.

Des Weiteren weisen die Befunde in anderen Betroffenen, bei denen eine Mutation in *DNAJC6* identifiziert werden konnte, auf eine Variabilität im Phänotyp hin. Elsayed und Kollegen berichteten von einem Patienten mit zunehmender mentaler und

Diskussion

physischer Verschlechterung, beginnend im Alter von 10 Jahren, ebenfalls ohne Zeichen von Tremor und zusätzlich auftretender Psychose mit Halluzinationen (Elsayed et al., 2016). In einer weiteren konsanguinen Familie wurde in vier Betroffenen mit mentaler Retardierung, Epilepsie, Bradykinesie, Rigor, Tremor und Pyramidenbahnzeichen Mutationen in *DNAJC6* identifiziert. Auch bei diesen Patienten konnte eine sehr schnelle Progression mit Beginn der ersten Symptome im 10. bzw. 11. Lebensjahr und Vorliegen einer kompletten Akinesie und Anarthrie 10-15 Jahre später beobachtet werden (Köroğlu et al., 2013). Schließlich konnte bei einem 7-jährigen Jungen mit starker Fettleibigkeit, mentaler Retardierung und Epilepsie eine die beiden Gene *DNAJC6* und *LEPR* betreffende 80 kb große Deletion nachgewiesen werden. Da *LEPR* für einen Leptin-Rezeptor codiert, wurde die Fettleibigkeit des Patienten auf die Deletion in *LEPR* zurückgeführt, der Phänotyp der mentalen Retardierung und Epilepsie auf *DNAJC6*. Auch dieser Patient zeigte zum Untersuchungszeitpunkt keine Anzeichen von Parkinson-Symptomen (Vauthier et al., 2012).

Insgesamt zeigen Mutationen in *DNAJC6* einen variablen Phänotyp mit verschiedenen ausgeprägten neurologischen Symptomen mit meist schnell fortschreitender Progression. Angesichts der nachgewiesenen Störung des Spleißens von *DNAJC6* in den Betroffenen der Familie TF018, kann die Mutation c.801-2A>G somit als krankheitsverursachend und die phänotypischen Merkmale als eine Erweiterung des Phänotyps der *DNAJC6*-Mutationen angesehen werden.

Diskussion

Tabelle 4: Übersicht über die Phänotypen der bisher identifizierten Patienten mit Mutation in *DNAJC6*

Patient	TF018_1, TF018_7	Edvardson et al., 2012	Elsayed et al., 2016	Köroğlu et al.	Vauthier et al.
Mutation	Spleißmutation c.801-2A>G	Spleißmutation c.801-2A>G	nonsense-Mutation, c.2365C>T, p.Gln789	nonsense-Mutation c.2200C>T, p.Q734X	80 kb Deletion auf Chromosom 1p31.3
Anzahl Betroffene	2	2	1	4	1
Neuroregression	+	+	+	+	-
motorische Regression	+	+	+	+	Keine Neuroregression, aber mentale Retardierung
mentale Regression	+	-	+	+	
Alter onset	10 Jahre	11 bzw. 7 Jahre	10,5 Jahre	10-11 Jahre	
Parkinson-Symptome	-	Bradykinesie, Rigor, Ruhetremor, posturale Instabilität, Hypomimie; Symptome L-Dopa-resistent	Bradykinesie, Rigor, posturale Instabilität	Bradykinesie, Rigor, Tremor, posturale Instabilität, Hypomimie, gutes Ansprechen auf L- Dopa	-
weitere Symptome	Spastizität in den oberen und unteren Extremitäten, Wundheilungsstörung	-	Spastizität, visuelle und auditorische Halluzinationen, Epilepsie	Epilepsie, Pyramidenbahn- zeichen	Adipositas, Epilepsie, milde Brachydaktylie
Verlauf	schnell progredient, rollstuhlgebunden nach ca. 5 Jahren	schnell progredient, rollstuhlgebunden nach 5 bzw. 10 Jahren	sehr schnell progredient, fast vollständige Akinesie nach 2 Jahren	schnell progredient, rollstuhlgebunden nach 10- 15 Jahren	Keine Progression der neurogenen Symptome

Abkürzungen: vorhanden: +; nicht vorhanden: -; unbekannt: ?

5.4 Identifizierung einer Mutation in *NT5C2* in Familie TF004

In Familie TF004 wurde bei beiden Betroffenen (TF004_1, TF004_4) die homozygote *frameshift*-Mutation c.1339dupC, p.Gln447fs in *NT5C2* identifiziert. *NT5C2* kodiert für die Purin-5'-Nukleotidase NT5C2, die Purinmoleküle, insbesondere IMP und GMP, hydrolysiert (Spsychala et al., 1988; Oka et al., 1994).

Mutationen in *NT5C2* wurden bereits in mehreren Patienten mit spastischer Paraplegie identifiziert. Diese aus fünf verschiedenen Familien stammenden Patienten zeigten ähnlich wie die Betroffenen der Familie TF004 eine im Kleinkindalter beginnende, progrediente spastische Paraparese in den Beinen. In allen außer einer Familie zeigten die Betroffenen intellektuelle Einschränkungen, die von Lernschwierigkeiten bis zur mentalen Retardierung reichten. Außerdem ergab sich bei den Patienten ebenfalls Hypoplasien bzw. Dysplasien des Corpus callosum (Novarino et al., 2014).

Störungen im Purinstoffwechsel sind bereits mit mehreren seltenen neurologischen Krankheiten assoziiert (Jinnah et al., 2013). So führen etwa Mutationen in dem Gen *HPRT*, das für das am Purinstoffwechsel beteiligte Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase codiert, zum Nesch-Lyhan-Syndrom (OMIM: #300322), dessen Phänotyp in variabler Ausprägung aus Hyperurikämie, psychomotorischer Retardierung und (auto-)aggressivem Verhalten besteht (Torres et al., 2012; Jinnah et al., 2013). Novarino und Kollegen konnten außerdem bei anderen Patienten Mutationen in weiteren am Purinstoffwechsel beteiligten Proteinen nachweisen (*AMPD2* und *ENTPD1*), die ebenfalls zu einer sehr früh einsetzenden spastischen Paraplegie führten (Novarino et al., 2014). Insofern scheint der Purinstoffwechsel ein neuer interessanter Stoffwechselweg zu sein, dessen Ungleichgewicht zur Entstehung von spastischer Paraplegie führen kann.

Die hier in Familie TF004 identifizierte Mutation wurde noch nicht beschrieben. Da die *frameshift*-Mutation zu einem vorzeitigem Stoppcodon vor den letzten 50 Basen des vorletzten Exons führt, ist von einem Abbau der mRNA durch *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) und damit einer fehlenden Bildung des Proteins auszugehen. In Anbetracht der Übereinstimmungen im Phänotyp der Betroffenen mit den bereits beschriebenen Patienten kann die Mutation somit als sehr wahrscheinlich krankheitsverursachend angesehen werden.

5.5 Identifizierung von Mutationen in *PTPRD* in Familie TF020

In Familie TF020 konnten mit Exomsequenzierung die zwei compound-heterozygoten missense-Varianten c.4690A>G, p.Ile1564Val und c.2533C>T, p.Pro845Ser in dem Gen *PTPRD* identifiziert werden, die mit dem Phänotyp in der Familie segregierten. *PTPRD* codiert für den Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor (PTPR) PTPR δ , der an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt ist (Takahashi and Craig, 2013).

PTPR δ gehört zu der Subfamilie IIa der PTPR, deren wichtige Funktion als Regulator der neuronalen Entwicklung über verschiedene Spezies konserviert ist (Van Vactor, 1998; Johnson and Van Vactor, 2003). Dabei sind sie insbesondere an Axonwachstum und -guidance (Stoker, 2001; Ensslen-Craig and Brady-Kalnay, 2004; Stoker, 2015), sowie an der Synaptogenese beteiligt (Ensslen-Craig and Brady-Kalnay, 2004; Takahashi and Craig, 2013; Stoker, 2015). Für PTPR δ als präsynaptisches Protein sind mehrere postsynaptische Interaktionspartner bekannt, über die PTPR δ die synaptische Differenzierung in inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen moduliert (Kwon et al., 2010; Takahashi et al., 2012; Yoshida et al., 2012; Yim et al., 2013). In Mausmodellen mit *PTPRD*-Knock-out-Mäusen zeigten diese ein beeinträchtigtes Lernverhalten, Wachstumsverzögerung und eine erhöhte Letalität, die mit Fütterungsschwierigkeiten in Verbindung gebracht wurden (Uetani et al., 2000).

PTPRD wurde bereits als Kandidatengen für den Phänotyp des Monosomie-9p-Syndroms, unter anderem bestehend aus Trigenocephalie und psychomotorischer Retardierung, diskutiert (Mitsui et al., 2013). Weiterhin wurde bei einem Jungen mit Trigenocephalie, Gesichtsfehlbildungen, Taubheit und mentaler Retardierung eine Mikrodeletion in *PTPRD* nachgewiesen (Choucair et al., 2015). Als besonders interessant für den Zusammenhang von *PTPRD* mit mentaler Retardierung erweist sich dabei die Interaktion von PTPR δ mit IL1RAPL1, etwa bei der Entwicklung exzitatorischer Synapsen (Valnegri et al., 2011). Mutationen in *IL1RAPL1* wurden in mehreren Patienten mit X-chromosomaler mentaler Retardierung, vorwiegend in moderater Ausprägung, identifiziert (OMIM: #300143). Auch Choucair und Kollegen postulierten einen möglichen Zusammenhang zwischen der mentalen Retardierung ihres Patienten mit der Mikrodeletion im *PTPRD*-Gen und der Interaktion von PTPR δ und IL1RAPL1. So konnte für IL1RAPL1 eine Expressionsverminderung um 92 % in Fibroblasten des Patienten nachgewiesen werden, was auf eine mögliche

Beeinträchtigung von *IL1RAPL1* durch den Verlust von *PTRPδ* hindeuten könnte (Choucair et al., 2015). Insofern stellt *PTPRD* ein interessantes Kandidatengen für mentale Retardierung dar. Inwiefern die in der Familie TF020 gefundenen Mutationen in *PTPRD* krankheitsverursachend sind, ist unklar, auch da die Beteiligung der bereits bekannten Mutationen in *PTPRD* an der mentalen Retardierung und das Vererbungsmuster dieses Phänotyps nicht vollständig geklärt ist. Die Assoziation von *PTPRD* mit dem Monosomie-9p-Syndrom weist auf eine Haploinsuffizienz hin, während es bei der von Choucair et al. beschriebenen Mikrodeletion auch heterozygote gesunde Träger gibt. Um die Pathogenität der Varianten in Familie TF020 nachzuweisen, sind weitere Untersuchungen, etwa zur Expression von *PTPRD* in den Patienten, anzustreben.

5.6 Diskussion Familie TF023

In Familie TF023 konnten durch die Exomsequenzierungen keine interessanten Kandidatengene, die mit dem Phänotyp in der Familie segregieren, gefunden werden. Mögliche Gründe hierfür können die fehlende Sequenzierung bzw. Variantenidentifizierung der ursächlichen Mutation aufgrund von schlechter Coverage oder Probleme beim *Variant calling* sein. Weiterhin ist eine falsche Einschätzung bei der Priorisierung der Varianten denkbar. Schließlich besteht die Möglichkeit, dass die Ursache der mentalen Retardierung der Patienten auf nicht-exonischer Ebene liegen, die durch die Exomsequenzierung nicht erfasst werden würde.

Um die Krankheitsursache in der Familie TF023 weiter zu untersuchen, kann eine weitere Exomsequenzierung der betroffenen TF023_9 hilfreich sein, um diese mit den Daten der bereits durchgeführten Exomsequenzierung vergleichen zu können.

5.7 Identifizierung von CNV mit NGS

Es wird angenommen, dass bis zu 15-20 % der Fälle von mentaler Retardierung durch CNVs verursacht sind (Cooper et al., 2011; Ellison et al., 2013). Dieser Prozentsatz zeigt die Notwendigkeit der Überprüfung von möglichen CNVs in Betroffenen von mentaler Retardierung. Hierbei kann auf die durch NGS gewonnenen Daten zurückgegriffen werden. In dieser Arbeit wurden die sequenzierten Exome aller 27 Familien auf das Vorliegen von möglicherweise pathogener CNVs untersucht. Hierzu

wurde das im Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik entwickelte Programm *CnvHunter* verwendet und die gefundenen CNVs mit bereits bekannten CNVs in der DECIPHER-Datenbank (Firth et al., 2009) im *UCSC genome browser* mit dem Referenzgenom hg19 verglichen.

5.8 Identifizierung einer Deletion in Familie TF003

In der Familie TF003 konnte durch Analyse der mit dem *CnvHunter* gefundenen CNVs eine 1,2 Mb umfassende Deletion auf Chromosom 4q21.22-21.23 gefunden werden, die durch ein durchgeführtes CytoScan7590 K Array bestätigt und dessen Größe auf 2,86 Mb (Chr4: 82,671,233-85,533,730) erweitert werden konnte.

Deletionen in diesem Bereich sind bereits als 4q21 Mikrodeletion Syndrom (OMIM: #613509) bekannt und eine 1,37 Mb große minimal kritische Region, die fünf Gene *PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPHI* umfassend, wurde als ursächlich für den typischen Phänotyp dieses Syndroms identifiziert (Bonnet et al., 2010). Bei der in Familie TF003 gefundenen Deletion sind nur drei dieser fünf Gene aus der kritischen Region deletiert: *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPHI* (Abbildung 19).

Diskussion

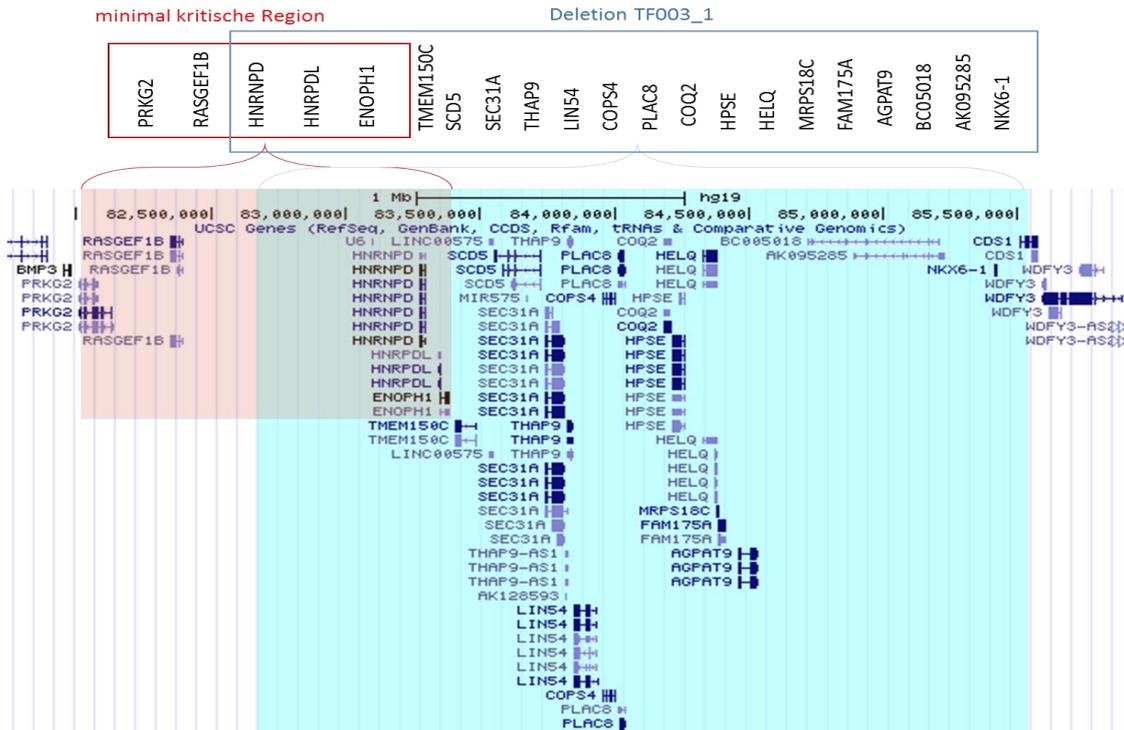


Abbildung 19: Deletion auf Chromosom 4q21.22-21.23 bei TF003_1 und Vergleich mit minimal kritischer Region des 4q21 Mikrodeletion Syndroms

Bei dem Betroffenen TF003_1 konnte eine 2,8 Mb große Deletion auf Chromosom 4q21.22-21.23 identifiziert werden. Der hierbei deletierte Bereich umfasst nur drei (HNRNPD, HNRPDL, ENOPH1) der fünf als minimal kritische Region definierten Gene des 4q21 Mikrodeletion Syndroms.

5.8.1 Vergleich der Phänotypen und Phänotyp-Genotyp-Korrelation

Betroffene des 14q21 Mikrodeletion Syndrom zeigen einen typischen Phänotyp, bestehend aus psychomotorischer Retardierung, Wachstumsverzögerung, Muskelhypotonie, fehlende oder verzögerte Sprachentwicklung und bestimmte Gesichtszüge. Als entscheidende Faktoren für diesen Phänotyp wurden bisher vor allem die beiden Gene *RASGEF1B* und *PRKG2* angesehen. *RASGEF1B* wird als Guanin-Austauschfaktor für Proteine der Ras-Familie stark im Gehirn exprimiert und für die mentale Entwicklungsstörung verantwortlich gemacht (Bonnet et al., 2010). *PRKG2* ist eine cGMP-abhängige Proteinkinase, die in Mäusen und Ratten deletiert zu Kleinwuchs und Skelettfehlbildungen führt (Pfeifer et al., 1996; Chikuda et al., 2004) und somit als Hauptfaktor für die Wachstumsverzögerung angesehen wird (Bonnet et al., 2010). Außerdem wurde eine Interaktion von *PRKG2* mit der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1 in der Regulation der Oberflächenexpression des AMPA-Rezeptors

nachgewiesen (Serulle et al., 2007), was auf eine Beteiligung der Deletion von *PRKG2* an der mentalen Retardierung der Betroffenen hindeuten kann (Bonnet et al., 2010).

Die Betroffene TF003_1 teilt einige der phänotypischen Merkmale des 14q21 Mikrodeletions-Syndroms, insbesondere die starke Wachstumsverzögerung, die mentale und motorische Retardierung und die fehlende Sprachentwicklung. Die muskuläre Hypotonie und die charakteristischen Gesichtsmerkmale konnten bei TF003_1 nicht beobachtet werden. Interessanterweise liegt bei der Betroffenen aber nur eine partielle Deletion der minimal kritischen Region vor, die beiden als Hauptfaktor identifizieren Gene *RASGEF1B* und *PRKG2* sind nicht betroffen (Abbildung 19). Eine solche partielle Deletion ohne Deletion der Gene *RASGEF1B* und *PRKG2* wurde bereits zuvor von Bhoj et al. beschrieben, der bei einer Patientin eine 2,0 Mb große Deletion identifizierte, die die gleichen Gene wie die Deletion bei TF003_1 umfasste. Die Betroffene zeigte ähnlich wie TF003_1 eine psychomotorische Retardierung, eine fehlende Sprachentwicklung und keine muskuläre Hypotonie. Allerdings fehlte bei ihr die starke Wachstumsverzögerung, was die Beteiligung einer Haploinsuffizienz in *PRKG2* auf die Wachstumsverzögerung zu bestätigen scheint (Bhoj et al., 2013). Hingegen konnte Yano et al. einen Patienten mit einer partiellen Deletion der minimal kritischen Region identifizieren, der ebenfalls trotz fehlender Deletion der Gene *RASGEF1B* und *PRKG2* eine Wachstumsverzögerung und eine mentale Retardierung aufwies. Eine Beteiligung einer Mangelernährung an diesen Merkmalen konnte aber nicht ausgeschlossen werden (Yano et al., 2015).

Drei weitere Patienten mit 4q21 Mikrodeletionssyndrom wurden weiterhin von Hu et al. beschrieben. Bei einem dieser Patienten konnte eine nur 761 Kb große Deletion gefunden werden, die ebenfalls nur die Gene *HNRNPD*, *HNRNPDL*, *ENOPH1* aus der kritischen Region umfasste, nicht aber *PRKG2* und *RASGEF1B*. Dieser Patient zeigte ebenso wie TF003_1 eine starke Wachstumsverzögerung, jedoch nur eine leichte Lernbehinderung und eine starke muskuläre Hypotonie. Hu et al. schlossen hieraus auf einen bisher unterschätzten Einfluss insbesondere von *HNRNPD* und *HNRNPDL* auf die für den Phänotyp des 14q21 Mikrodeletionssyndrom typische starke Wachstumsverzögerung (Hu et al., 2017). *HNRNPD* und *HNRNPDL* gehören zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNP), die die Transkription und die folgende Modifizierung der mRNA regulieren. Mutationen in *HNRNPDL*

führen zur muskulären Gliedergürteldystrophie Typ 1G (LGMD1G, OMIM: #609115) (Vieira et al., 2014). Bei einem Knockdown von *HNRNPD* in Zebrafischen konnte eine gestörte Entwicklung der Körpergestalt, wie zu kurze Schwanzflossen, und eine Beeinträchtigung der Bewegungsabläufe festgestellt werden (Vieira et al., 2014), was auf eine Beteiligung von *HNRNPD* an der Regulierung des Wachstums hinweisen könnte.

Tabelle 5: Übersicht über die Phänotypen der Patienten mit identifizierter partieller Deletion der kritischen Region des 14q21 Mikrodeletionssyndrom

Patient	TF003_1	Bhoj et al, 2013	Yano et al, 2015	Hu et al, 2017
Größe der Deletion	1,2 Mb	2,0 Mb	1,6 Mb	761 Mb
deletierte Gene aus der minimal kritischen Region	<i>HNRNPD</i> , <i>HNRPDL</i> , <i>ENOPH1</i>	<i>HNRNPD</i> , <i>HNRPDL</i> , <i>ENOPH1</i>	<i>HNRNPD</i> , <i>HNRPDL</i> , <i>ENOPH1</i>	<i>HNRNPD</i> , <i>HNRPDL</i> , <i>ENOPH1</i>
mentale Retardierung	+++	+	++	-, leichte Lernbehinderung
Wachstumsverzögerung	+	-	+	+
Muskuläre Hypotonie	-	-	+	+
Fehlende Sprachentwicklung	+	+	+	-
weitere Symptome	Mikrozephalie, Ataxie, choreatische Bewegungen, Tremor, Autoaggressivität, gestörter Schlafrhythmus Epilepsie	Makrozephalie, kleine Hände und Füße, auffällige Gesichtsmerkmale, Autoaggressivität	Epilepsie, kortikale Atrophie mit vergrößerten Ventrikeln im MRT, auffällige Gesichtsmerkmale	Morbus Crohn, Astigmatismus

Abkürzungen: vorhanden: +; nicht vorhanden: -; unbekannt: ?

Insofern geben diese verschiedenen Phänotypen einen Hinweis darauf, dass *PRKG2* und *RASGEF1B* nicht allein für die für das 14q21 Mikrodeletionssyndroms typischen Merkmale der Wachstumsverzögerung und mentalen Retardierung verantwortlich sind, sondern andere Gene, insbesondere *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPH1* einen bisher unterschätzten Einfluss haben können.

Des Weiteren zeigen einige der anderen phänotypischen Merkmale von TF003_1 ebenfalls Übereinstimmungen mit bisherigen Befunden, so wurde Epilepsie (Yano et al., 2015) und (auto-)aggressives Verhalten (Bhoj et al., 2013; Komlósi et al., 2015) bereits mehrmals in anderen Betroffenen beschrieben. Die motorischen Funktionsstörungen wie Ataxie, Tremor und choreatischen Bewegungen, sind bislang

nicht bei anderen Betroffenen bekannt und bilden damit eine mögliche Erweiterung des bisherigen Phänotyps.

Insgesamt zeigt der Phänotyp der Betroffenen TF003_1, die trotz fehlender Deletion der beiden Gene *PRKG2* und *RASGEF1B* eine starke Wachstumsverzögerung und mentale Retardierung aufweist, dass das bisherige Verständnis der Phänotyp-Genotyp-Korrelation in Patienten mit dem 4q21 Mikrodeletion Syndrom überdacht werden sollte. Hierzu benötigt es eine weitere Untersuchung der an der Deletion beteiligten Gene, um ihre Funktion und pathogenen Auswirkungen bei Fehlfunktionen zu verstehen.

5.9 Fazit und Ausblick

5.9.1 Identifizierung von Kandidatengen für MR mithilfe von NGS

Insgesamt haben die Methoden des NGS die Suche nach genetischen Ursachen von mentaler Retardierung stark vereinfacht und zu einer steigenden Anzahl an identifizierten Genen geführt (Topper et al., 2011; Vissers et al., 2016). Gegenüber früheren Sequenziermethoden bietet das NGS die Möglichkeit, sehr große Gen-Abschnitte bis hin zum ganzen Genom, in kurzer Zeit zu sequenzieren. Hiermit bleibt die Suche nach Kandidatengen nicht nur auf bestimmte genetische Abschnitte und in ihrer Funktion bereits erforschter Gene beschränkt (Topper et al., 2011).

Somit ist die Identifizierung neuer, bisher nicht mit mentaler Retardierung assoziierter Gene möglich. Probleme ergeben sich hierbei besonders bei der Beurteilung und Priorisierung der gefundenen Varianten. Literaturrecherche, Programme zur Einschätzung der Auswirkungen der Mutationen und weitere funktionelle Untersuchungen können hierbei hilfreich sein. Einen sichereren Hinweis auf die Pathogenität einer Mutation liefern Mutationen in demselben Gen in anderen Patienten mit ähnlichem Phänotyp. Hierzu ist eine Vernetzung und Kooperation der Forscher weltweit nötig, wie es bereits durch Online-Plattformen wie *GeneMatcher* (<https://genematcher.org/>) (Sobreira et al., 2015) heute möglich ist. Auch in dieser Arbeit konnte durch eine Kooperation, die durch Nutzung von *GeneMatcher* entstand, das Gen *DENND5A* als neues Gen für mentale Retardierung identifiziert werden.

Des Weiteren sind Methoden des NGS hilfreich, Mutationen in bereits bekannten MR-Genen zu identifizieren. Auch in dieser Arbeit konnten in zwei Familien die bereits

bekannten Gene *DNAJC6* und *NT5C2* gefunden werden, außerdem ein CNV in einer bereits bekannten MR-Region. Diese Befunde können, wie in dieser Arbeit, zu einer Erweiterung der phänotypischen Merkmale bestimmter Syndrome und einer besseren Genotyp-Phänotyp-Korrelation beitragen und somit das Verständnis der Funktion der untersuchten Gene fördern. Weiterhin bietet das NGS auch diagnostische Möglichkeiten. Das Screening von Patienten nach Mutationen in bereits bekannten Genen kann die Diagnostik sehr vereinfachen und beschleunigen (Soden et al., 2014; Carvill and Mefford, 2015). Hierbei kann auch der Einsatz von *targeted-sequencing* mit gezielter Sequenzierung von MR-Genen hilfreich sein (Martínez et al., 2016).

Trotz der Erfolge in der Identifizierung neuer MR-Gene durch NGS bleiben immer noch viele Fälle mentaler Retardierung ungeklärt. In bis zu 60 % der Fälle von schwerer mentaler Retardierung kann keine Ursache gefunden werden (Ellison et al., 2013; Carvill and Mefford, 2015). Beachtet werden muss, dass auch beim NGS bestimmte Genabschnitte nicht analysiert werden können, etwa durch Probleme mit der Deckung oder beim *Variant calling*. Außerdem können verschiedene Maßstäbe zur Priorisierung der gefundenen Varianten angelegt werden, von denen der Aufklärungserfolg abhängt. Des Weiteren werden meist WES-Methoden den teureren WGS-Methoden vorgezogen. In einer Studie konnte aber verdeutlicht werden, dass durch WGS deutlich mehr für MR verantwortliche Mutationen in den codierenden Genabschnitten identifiziert werden können als durch WES (Gilissen et al., 2014). Hierbei wurden die nicht-codierenden Genbereiche noch nicht miteingezogen, die weiteres Potential für bisher nicht erkannte pathologische Veränderungen bieten (Carvill and Mefford, 2015).

5.9.2 Identifizierung von CNVs mittels NGS

Die Entwicklung der Methoden des NGS haben auch die Detektion von CNVs verändert. Klassischerweise werden diese mit Hybridisierungsmethoden, wie FISH oder Mikroarrays, identifiziert. In den letzten Jahren wurden jedoch zunehmend Programme entwickelt, die die Daten aus Sequenzierung mit NGS-Methoden zur Detektion von CNVs nutzen. Bei der Anwendung dieser Programme bei WES ergeben sich aber nach wie vor Schwierigkeiten, da die Bruchpunkte von CNVs nicht unbedingt in den *targeted regions* liegen und somit viele CNVs übersehen oder nicht akkurat bestimmt werden (Zhao et al., 2013; Pirooznia et al., 2015). Vergleichende Studien zeigen eine sehr viel

schlechtere Detektion von CNVs in WES-Daten als in WGS-Daten (Tan et al., 2014). Auch in dieser Arbeit zeigten sich Diskrepanzen bei der Genauigkeit der CNV-Identifikation mit dem Programm *CnvHunter*. Erst die Überprüfung des gefundenen CNV in der Familie TF003 mit einem Mikroarray ergab die genauen Bruchpunkte, da auch hier die genauen Bruchpunkte in nicht-kodierenden Bereichen lagen, die vom WES nicht abgedeckt werden. Ebenso kann nicht ausgeschlossen werden, dass in anderen Familien pathogene CNVs nicht detektiert wurden. Insofern stellen Programme wie *CnvHunter* eine Möglichkeit da, bei ohnehin vorliegenden WES-Daten relativ schnell und kostengünstig nach CNVs zu suchen, sollten aber zur Erhöhung der Aussagekraft und Sicherheit mit anderen Methoden kombiniert werden.

5.9.3 Ausblick

Insgesamt erweist sich NGS als wichtige Methode in der Identifizierung genetischer Ursachen von mentaler Retardierung, sowohl bei Betrachtung von monogenen Ursachen als auch von CNV. Weiterhin bestehende Probleme in der Aufklärung von NGS-Fällen könnten in der Zukunft durch Zunahme von WGS gegenüber WES, sowie Kombination verschiedener diagnostischer Möglichkeiten (Puri et al., 2016) angegangen werden. Die Möglichkeiten, NGS auch in der Diagnostik von mentaler Retardierung einzusetzen, könnte den Patienten eine schnellere Diagnose ermöglichen. Gleichzeitig ist beim Einsatz von NGS in der Diagnostik der ethische Aspekt angesichts einer großen Menge an genetischen Daten und dem Umgang mit zufällig gefundenen potentiell schädigenden Mutationen nicht außer Acht zu lassen.

Letztlich ergeben sich durch die Erforschung der genetischen Ursachen von mentaler Retardierung neue Erkenntnisse über die molekularen Vorgänge des Nervensystems, die immer ein Potential für neue therapeutische Ansätze liefern könnten.

6. Zusammenfassung

Die mentale Retardierung, gekennzeichnet durch eine in der Entwicklungsperiode auftretende Einschränkung der geistigen Fähigkeiten, präsentiert sich als eine bezüglich des Phänotyps und der Ursachen sehr heterogene Krankheit. In den letzten Jahren konnte die Erforschung der genetischen Ursachen mentaler Retardierung große Fortschritte verzeichnen, dennoch bleiben viele Fälle mentaler Retardierung ungeklärt. In dieser Arbeit sollten bisher ungeklärte Fälle von mentaler Retardierung aufgeklärt und dabei neue Kandidatengene für mentale Retardierung identifiziert und bestätigt werden. In einem Untersuchungskollektiv aus 26 konsanguinen, jordanischen Familien wurde für jeweils einen Betroffenen aus den Familien eine Exomsequenzierung mittels NGS vorgenommen. In jedem sequenzierten Exom wurde nach möglicherweise krankheitsverursachenden CNVs gesucht. Die Exome von fünf Familien wurden auf monogene Ursachen der mentalen Retardierung untersucht. Hierzu wurde eine Priorisierung der gefundenen Varianten nach bestimmten Kriterien vorgenommen und die Segregation der aussichtsreichsten Kandidatenvarianten in den Familien mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Gegebenenfalls wurden weitere funktionelle Analysen angestellt, um die Pathogenität der Kandidatenmutationen zu untersuchen.

Auf diese Weise konnte in einer Familie mit epileptischer Enzephalopathie mit schwerer mentaler Retardierung und Verkalkungen in den Basalganglien eine homozygote *frameshift*-Mutation in *DENND5A* identifiziert werden. *DENND5A* ist als GTP-Austauschfaktor für Proteine der rab-Familie am Vesikeltransport am Golgi-Apparat beteiligt. Die Rekrutierung zweier weiterer betroffener Geschwister aus einer anderen Familie mit ähnlichem Phänotyp und homozygoter *frameshift*-Mutation in *DENND5A* und funktionelle Untersuchung von *DENND5A* durch unseren Kooperationspartner konnten die Einordnung von *DENND5A* als neues Gen für mentale Retardierung bestätigen.

In zwei weiteren Familien konnten Mutationen in bereits bekannten Genen für mentale Retardierung (*DNAJC6*, *NT5C2*) nachgewiesen werden. Der Phänotyp der Betroffenen entspricht und erweitert die bereits in der Literatur für Mutationen in diesen Genen beschriebene Krankheitsbilder.

In einer weiteren Familie wurden compound-heterozygote Mutationen in *PTPRD* identifiziert. *PTPRD* codiert für den Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor PTPR δ , der

Zusammenfassung

an der Entwicklung des Nervensystems und insbesondere der Synaptogenese beteiligt ist. Die Pathogenität der Varianten in *PTPRD* müssten noch weiter untersucht werden, um *PTPRD* als Gen für mentale Retardierung zu bestätigen.

Schließlich konnte für eine Familie ein CNV als Ursache für die mentale Retardierung bestätigt werden. Hierbei handelte es sich um eine 2,86 Mb große Deletion in einer bereits für das 4q21 Mikrodeletions Syndrom bekannten Region. Der Phänotyp der Betroffenen in Verbindung mit den von der Deletion erfassten Genen liefert einen neuen Beitrag zu der bisher angenommenen Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei dem 4q21 Mikrodeletions Syndrom.

Insgesamt konnten somit in vier Familien die genetische Ursache der mentalen Retardierung aufgeklärt und dabei ein neues Gen für mentale Retardierung identifiziert und bestätigt werden.

7. Literaturverzeichnis

Abecasis, G. R., A. Auton, L. D. Brooks, M. A. DePristo, R. M. Durbin, R. E. Handsaker, H. M. Kang, G. T. Marth, G. A. McVean and G. P. Consortium (2012). "An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes." Nature **491**(7422): 56-65.

Abou Jamra, R., O. Philippe, A. Raas-Rothschild, S. H. Eck, E. Graf, R. Buchert, G. Borck, A. Ekici, F. F. Brockschmidt, M. M. Nöthen, A. Munnich, T. M. Strom, A. Reis and L. Colleaux (2011). "Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature." Am J Hum Genet **88**(6): 788-795.

Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A. S. Kondrashov and S. R. Sunyaev (2010). "A method and server for predicting damaging missense mutations." Nat Methods **7**(4): 248-249.

Agilent Technologies (2015). SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library Protocol.

Al Hafid, N. and J. Christodoulou (2015). "Phenylketonuria: a review of current and future treatments." Transl Pediatr **4**(4): 304-317.

Alazami, A. M., H. Hijazi, A. Y. Kentab and F. S. Alkuraya (2014). "NECAP1 loss of function leads to a severe infantile epileptic encephalopathy." J Med Genet **51**(4): 224-228.

American Psychiatric Association (2013). "DSM-5 Intellectual Disability Fact Sheet." from <http://www.dsm5.org/Documents/Intellectual%20Disability%20Fact%20Sheet.pdf>.

Anazi, S., S. Maddirevula, E. Faqeih, H. Alsedairy, F. Alzahrani, H. E. Shamseldin, N. Patel, M. Hashem, N. Ibrahim, F. Abdulwahab, N. Ewida, H. S. Alsaif, H. Al Sharif, W. Alamoudi, A. Kentab, F. A. Bashiri, M. Alnaser, A. H. AlWadei, M. Alfadhel, W. Eyaid, A. Hashem, A. Al Asmari, M. M. Saleh, A. AlSaman, K. A. Alhasan, M. Alsughayir, M. Al Shammari, A. Mahmoud, Z. N. Al-Hassnan, M. Al-Husain, R. Osama Khalil, N. Abd El Meguid, A. Masri, R. Ali, T. Ben-Omran, P. El Fishway, A. Hashish, A. Ercan Sencicek, M. State, A. M. Alazami, M. A. Salih, N. Altassan, S. T. Arold, M. Abouelhoda, S. M. Wakil, D. Monies, R. Shaheen and F. S. Alkuraya (2016). "Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield." Mol Psychiatry.

Bahassi el, M. and P. J. Stambrook (2014). "Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics." Mutagenesis **29**(5): 303-310.

Balestrini, S., M. Milh, C. Castiglioni, K. Lüthy, M. J. Finelli, P. Verstreken, A. Cardon, B. G. Stražišar, J. L. Holder, G. Lesca, M. M. Mancardi, A. L. Poulat, G. M. Repetto, S. Banka, L. Bilo, L. E. Birkeland, F. Bosch, K. Brockmann, J. H. Cross, D. Doummar, T. M. Félix, F. Giuliano, M. Hori, I. Hüning, H. Kayserili, U. Kini, M. M. Lees, G. Meenakshi, L. Mewasingh, A. T. Pagnamenta, S. Peluso, A. Mey, G. M. Rice, J. A. Rosenfeld, J. C. Taylor, M. M. Troester, C. M. Stanley, D. Ville, M. Walkiewicz, A. Falace, A. Fassio, J. R. Lemke, S. Biskup, J. Tardif, N. F. Ajeawung, A. Tolun, M. Corbett, J. Gecz, Z. Afawi, K. B. Howell, K. L. Oliver, S. F. Berkovic, I. E. Scheffer, F. A. de Falco, P. L. Oliver, P. Striano, F. Zara, P. M. Campeau and S. M. Sisodiya (2016). "TBC1D24 genotype-phenotype correlation: Epilepsies and other neurologic features." *Neurology* **87**(1): 77-85.

Becker, C. E., E. M. Creagh and L. A. O'Neill (2009). "Rab39a binds caspase-1 and is required for caspase-1-dependent interleukin-1beta secretion." *J Biol Chem* **284**(50): 34531-34537.

Bentley, D. R., S. Balasubramanian, H. P. Swerdlow, G. P. Smith, J. Milton, C. G. Brown, K. P. Hall, D. J. Evers, C. L. Barnes, H. R. Bignell, J. M. Boutell, J. Bryant, R. J. Carter, R. Keira Cheetham, A. J. Cox, D. J. Ellis, M. R. Flatbush, N. A. Gormley, S. J. Humphray, L. J. Irving, M. S. Karbelashvili, S. M. Kirk, H. Li, X. Liu, K. S. Maisinger, L. J. Murray, B. Obradovic, T. Ost, M. L. Parkinson, M. R. Pratt, I. M. Rasolonjatovo, M. T. Reed, R. Rigatti, C. Rodighiero, M. T. Ross, A. Sabot, S. V. Sankar, A. Scally, G. P. Schroth, M. E. Smith, V. P. Smith, A. Spiridou, P. E. Torrance, S. S. Tzonev, E. H. Vermaas, K. Walter, X. Wu, L. Zhang, M. D. Alam, C. Anastasi, I. C. Aniebo, D. M. Bailey, I. R. Bancarz, S. Banerjee, S. G. Barbour, P. A. Baybayan, V. A. Benoit, K. F. Benson, C. Bevis, P. J. Black, A. Boodhun, J. S. Brennan, J. A. Bridgham, R. C. Brown, A. A. Brown, D. H. Buermann, A. A. Bundu, J. C. Burrows, N. P. Carter, N. Castillo, M. Chiara E Catenazzi, S. Chang, R. Neil Cooley, N. R. Crake, O. O. Dada, K. D. Diakoumakos, B. Dominguez-Fernandez, D. J. Earnshaw, U. C. Egbujor, D. W. Elmore, S. S. Etchin, M. R. Ewan, M. Fedurco, L. J. Fraser, K. V. Fuentes Fajardo, W. Scott Furey, D. George, K. J. Gietzen, C. P. Goddard, G. S. Golda, P. A. Granieri, D. E. Green, D. L. Gustafson, N. F. Hansen, K. Harnish, C. D. Haudenschild, N. I. Heyer, M. M. Hims, J. T. Ho, A. M. Horgan, K. Hoschler, S. Hurwitz, D. V. Ivanov, M. Q. Johnson, T. James, T. A. Huw Jones, G. D. Kang, T. H. Kerelska, A. D. Kersey, I. Khrebtukova, A. P. Kindwall, Z. Kingsbury, P. I. Kokko-Gonzales, A. Kumar, M. A. Laurent, C. T. Lawley, S. E. Lee, X. Lee, A. K. Liao, J. A. Loch, M. Lok, S. Luo, R. M. Mammen, J. W. Martin, P. G. McCauley, P. McNitt, P. Mehta, K. W. Moon, J. W. Mullens, T. Newington, Z. Ning, B. Ling Ng, S. M. Novo, M. J. O'Neill, M. A. Osborne, A. Osnowski, O. Ostadan, L. L. Paraschos, L. Pickering, A. C. Pike, D. Chris Pinkard, D. P. Pliskin, J. Podhasky, V. J. Quijano, C. Raczky, V. H. Rae, S. R. Rawlings, A. Chiva Rodriguez, P. M. Roe, J. Rogers, M. C. Rogert Bacigalupo, N. Romanov, A. Romieu, R. K. Roth, N. J. Rourke, S. T. Ruediger, E. Rusman, R. M. Sanches-Kuiper, M. R. Schenker, J. M. Seoane, R. J. Shaw, M. K. Shiver, S. W. Short, N. L. Sizto, J. P. Sluis, M. A. Smith, J. Ernest Sohna Sohna, E. J. Spence, K. Stevens, N. Sutton, L. Szajkowski, C. L. Tregidgo, G. Turcatti, S. Vandevondele, Y. Verhovskiy, S. M. Virk, S. Wakelin, G. C. Walcott, J. Wang, G. J. Worsley, J. Yan, L. Yau, M. Zuerlein, J. C. Mullikin, M. E. Hurler, N. J. McCooke, J. S. West, F. L. Oaks, P. L. Lundberg, D. Klenerman, R. Durbin and A. J. Smith (2008).

"Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry." Nature **456**(7218): 53-59.

Berry-Kravis, E. M., D. Hessler, B. Rathmell, P. Zarevics, M. Cherubini, K. Walton-Bowen, Y. Mu, D. V. Nguyen, J. Gonzalez-Heydrich, P. P. Wang, R. L. Carpenter, M. F. Bear and R. J. Hagerman (2012). "Effects of STX209 (arbaclofen) on neurobehavioral function in children and adults with fragile X syndrome: a randomized, controlled, phase 2 trial." Sci Transl Med **4**(152): 152ra127.

Bhoj, E., S. Halbach, D. McDonald-McGinn, C. Tan, R. Lande, D. Waggoner and E. Zackai (2013). "Expanding the spectrum of microdeletion 4q21 syndrome: a partial phenotype with incomplete deletion of the minimal critical region and a new association with cleft palate and Pierre Robin sequence." Am J Med Genet A **161A**(9): 2327-2333.

Blanco, L., A. Bernad, J. M. Lazaro, G. Martin, C. Garmendia and M. Salas (1989). "Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication." J Biol Chem **264**(15): 8935-8940.

Bonnet, C., J. Andrieux, M. Béri-Dexheimer, B. Leheup, O. Boute, S. Manouvrier, B. Delobel, H. Copin, A. Receveur, M. Mathieu, G. Thiriez, C. Le Caignec, A. David, M. C. de Blois, V. Malan, A. Philippe, V. Cormier-Daire, L. Colleaux, E. Flori, H. Dollfus, V. Pelletier, C. Thauvin-Robinet, A. Masurel-Paulet, L. Faivre, M. Tardieu, N. Bahi-Buisson, P. Callier, F. Mugneret, P. Edery, P. Jonveaux and D. Sanlaville (2010). "Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech." J Med Genet **47**(6): 377-384.

Braat, S. and R. F. Kooy (2015). "The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders." Neuron **86**(5): 1119-1130.

Cacciagli, P., J. P. Desvignes, N. Girard, M. Delepine, D. Zelenika, M. Lathrop, N. Lévy, D. H. Ledbetter, W. B. Dobyns and L. Villard (2014). "AP1S2 is mutated in X-linked Dandy-Walker malformation with intellectual disability, basal ganglia disease and seizures (Pettigrew syndrome)." Eur J Hum Genet **22**(3): 363-368.

Carvill, G. L. and H. C. Mefford (2015). "Next-Generation Sequencing in Intellectual Disability." J Pediatr Genet **4**(3): 128-135.

Chen, D. and Q. Zhong (2012). "A tethering coherent protein in autophagosome maturation." Autophagy **8**(6): 985-986.

Chikuda, H., F. Kugimiya, K. Hoshi, T. Ikeda, T. Ogasawara, T. Shimoaka, H. Kawano, S. Kamekura, A. Tsuchida, N. Yokoi, K. Nakamura, K. Komeda, U. I. Chung and H. Kawaguchi (2004). "Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch

from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes." Genes Dev **18**(19): 2418-2429.

Choucair, N., C. Mignon-Ravix, P. Cacciagli, J. Abou Ghoch, A. Fawaz, A. Mégarbané, L. Villard and E. Chouery (2015). "Evidence that homozygous PTPRD gene microdeletion causes trigonocephaly, hearing loss, and intellectual disability." Mol Cytogenet **8**: 39.

Cingolani, P., V. M. Patel, M. Coon, T. Nguyen, S. J. Land, D. M. Ruden and X. Lu (2012). "Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift." Front Genet **3**: 35.

Cingolani, P., A. Platts, L. Wang le, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, S. J. Land, X. Lu and D. M. Ruden (2012). "A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3." Fly (Austin) **6**(2): 80-92.

Cooper, G. M., B. P. Coe, S. Girirajan, J. A. Rosenfeld, T. H. Vu, C. Baker, C. Williams, H. Stalker, R. Hamid, V. Hannig, H. Abdel-Hamid, P. Bader, E. McCracken, D. Niyazov, K. Leppig, H. Thiese, M. Hummel, N. Alexander, J. Gorski, J. Kussmann, V. Shashi, K. Johnson, C. Rehder, B. C. Ballif, L. G. Shaffer and E. E. Eichler (2011). "A copy number variation morbidity map of developmental delay." Nat Genet **43**(9): 838-846.

Cooper, S. A., E. Smiley, J. Morrison, A. Williamson and L. Allan (2007). "Mental ill-health in adults with intellectual disabilities: prevalence and associated factors." Br J Psychiatry **190**: 27-35.

Deb, S., H. Kwok, M. Bertelli, L. Salvador-Carulla, E. Bradley, J. Torr, J. Barnhill and W. P. A. S. o. P. o. I. D. Guideline Development Group of the (2009). "International guide to prescribing psychotropic medication for the management of problem behaviours in adults with intellectual disabilities." World Psychiatry **8**(3): 181-186.

Deciphering Developmental Disorders Study (2015). "Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders." Nature **519**(7542): 223-228.

Dhindsa, R. S., S. S. Bradrick, X. Yao, E. L. Heinzen, S. Petrovski, B. J. Krueger, M. R. Johnson, W. N. Frankel, S. Petrou, R. M. Boumil and D. B. Goldstein (2015). "Epileptic encephalopathy-causing mutations in DNMI1 impair synaptic vesicle endocytosis." Neurol Genet **1**(1): e4.

Dong, C., P. Wei, X. Jian, R. Gibbs, E. Boerwinkle, K. Wang and X. Liu (2015). "Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies." Hum Mol Genet **24**(8): 2125-2137.

Literaturverzeichnis

Edvardson, S., Y. Cinnamon, A. Ta-Shma, A. Shaag, Y. I. Yim, S. Zenvirt, C. Jalas, S. Lesage, A. Brice, A. Taraboulos, K. H. Kaestner, L. E. Greene and O. Elpeleg (2012). "A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism." PLoS One **7**(5): e36458.

Ellison, J. W., J. A. Rosenfeld and L. G. Shaffer (2013). "Genetic basis of intellectual disability." Annu Rev Med **64**: 441-450.

Elsayed, L. E., V. Drouet, T. Usenko, I. N. Mohammed, A. A. Hamed, M. A. Elseed, M. A. Salih, M. E. Koko, A. Y. Mohamed, R. A. Siddig, M. I. Elbashir, M. E. Ibrahim, A. Durr, G. Stevanin, S. Lesage, A. E. Ahmed and A. Brice (2016). "A Novel Nonsense Mutation in DNAJC6 Expands the Phenotype of Autosomal-Recessive Juvenile-Onset Parkinson's Disease." Ann Neurol **79**(2): 335-337.

Ensslen-Craig, S. E. and S. M. Brady-Kalnay (2004). "Receptor protein tyrosine phosphatases regulate neural development and axon guidance." Dev Biol **275**(1): 12-22.

Eppig, J. T., J. A. Blake, C. J. Bult, J. A. Kadin, J. E. Richardson and M. G. D. Group (2015). "The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease." Nucleic Acids Res **43**(Database issue): D726-736.

EuroEPINOMICS-RES Consortium, Epilepsy Phenome/Genome Project and Epi4K Consortium (2014). "De novo mutations in synaptic transmission genes including DNM1 cause epileptic encephalopathies." Am J Hum Genet **95**(4): 360-370.

Falace, A., E. Buhler, M. Fadda, F. Watrin, P. Lippiello, E. Pallesi-Pocachard, P. Baldelli, F. Benfenati, F. Zara, A. Represa, A. Fassio and C. Cardoso (2014). "TBC1D24 regulates neuronal migration and maturation through modulation of the ARF6-dependent pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(6): 2337-2342.

Fernandes, H., E. Franklin, F. Jollivet, K. Bliedtner and A. R. Khan (2012). "Mapping the interactions between a RUN domain from DENND5/Rab6IP1 and sorting nexin 1." PLoS One **7**(4): e35637.

Fine, D., H. Flusser, B. Markus, Z. Shorer, L. Gradstein, S. Khateeb, Y. Langer, G. Narkis, R. Birk, A. Galil, I. Shelef and O. S. Birk (2015). "A syndrome of congenital microcephaly, intellectual disability and dysmorphism with a homozygous mutation in FRMD4A." Eur J Hum Genet **23**(12): 1729-1734.

Firth, H. V., S. M. Richards, A. P. Bevan, S. Clayton, M. Corpas, D. Rajan, S. Van Vooren, Y. Moreau, R. M. Pettett and N. P. Carter (2009). "DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources." Am J Hum Genet **84**(4): 524-533.

Literaturverzeichnis

Fukuda, M., H. Kobayashi, K. Ishibashi and N. Ohbayashi (2011). "Genome-wide investigation of the Rab binding activity of RUN domains: development of a novel tool that specifically traps GTP-Rab35." Cell Struct Funct **36**(2): 155-170.

Giannandrea, M., V. Bianchi, M. L. Mignogna, A. Sirri, S. Carrabino, E. D'Elia, M. Vecellio, S. Russo, F. Cogliati, L. Larizza, H. H. Ropers, A. Tzschach, V. Kalscheuer, B. Oehl-Jaschkowitz, C. Skinner, C. E. Schwartz, J. Gecz, H. Van Esch, M. Raynaud, J. Chelly, A. P. de Brouwer, D. Toniolo and P. D'Adamo (2010). "Mutations in the small GTPase gene RAB39B are responsible for X-linked mental retardation associated with autism, epilepsy, and macrocephaly." Am J Hum Genet **86**(2): 185-195.

Gilissen, C., J. Y. Hehir-Kwa, D. T. Thung, M. van de Vorst, B. W. van Bon, M. H. Willemsen, M. Kwint, I. M. Janssen, A. Hoischen, A. Schenck, R. Leach, R. Klein, R. Tearle, T. Bo, R. Pfundt, H. G. Yntema, B. B. de Vries, T. Kleefstra, H. G. Brunner, L. E. Vissers and J. A. Veltman (2014). "Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability." Nature **511**(7509): 344-347.

Gnirke, A., A. Melnikov, J. Maguire, P. Rogov, E. M. LeProust, W. Brockman, T. Fennell, G. Giannoukos, S. Fisher, C. Russ, S. Gabriel, D. B. Jaffe, E. S. Lander and C. Nusbaum (2009). "Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing." Nat Biotechnol **27**(2): 182-189.

Grigoriev, I., D. Splinter, N. Keijzer, P. S. Wulf, J. Demmers, T. Ohtsuka, M. Modesti, I. V. Maly, F. Grosveld, C. C. Hoogenraad and A. Akhmanova (2007). "Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers." Dev Cell **13**(2): 305-314.

Han, C., R. Alkhatir, T. Froukh, A. G. Minassian, M. Galati, R. H. Liu, M. Fotouhi, J. Sommerfeld, A. J. Alfrook, C. Marshall, S. Walker, P. Bauer, S. W. Scherer, O. Riess, R. Buchert, B. A. Minassian and P. S. McPherson (2016). "Epileptic Encephalopathy Caused by Mutations in the Guanine Nucleotide Exchange Factor DENND5A." Am J Hum Genet **99**(6): 1359-1367.

Hu, X., X. Chen, B. Wu, I. M. Soler, S. Chen and Y. Shen (2017). "Further defining the critical genes for the 4q21 microdeletion disorder." Am J Med Genet A **173**(1): 120-125.

Illumina (2016). An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.

International Human Genome Sequencing Consortium (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." Nature **431**(7011): 931-945.

Ishida, M., M. E Oguchi and M. Fukuda (2016). "Multiple Types of Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs) for Rab Small GTPases." Cell Struct Funct **41**(2): 61-79.

Jaworski, J. (2007). "ARF6 in the nervous system." Eur J Cell Biol **86**(9): 513-524.

Jinnah, H. A., R. L. Sabina and G. Van Den Berghe (2013). "Metabolic disorders of purine metabolism affecting the nervous system." Handb Clin Neurol **113**: 1827-1836.

Johnson, K. G. and D. Van Vactor (2003). "Receptor protein tyrosine phosphatases in nervous system development." Physiol Rev **83**(1): 1-24.

Kaufman, L., M. Ayub and J. B. Vincent (2010). "The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review." J Neurodev Disord **2**(4): 182-209.

Kent, W. J., C. W. Sugnet, T. S. Furey, K. M. Roskin, T. H. Pringle, A. M. Zahler and D. Haussler (2002). "The human genome browser at UCSC." Genome Res **12**(6): 996-1006.

Komlósi, K., B. Duga, K. Hadzsiev, M. Czakó, G. Kosztolányi, A. Fogarasi and B. Melegh (2015). "Phenotypic variability in a Hungarian patient with the 4q21 microdeletion syndrome." Mol Cytogenet **8**: 16.

Köroğlu, Ç., L. Baysal, M. Cetinkaya, H. Karasoy and A. Tolun (2013). "DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability." Parkinsonism Relat Disord **19**(3): 320-324.

Kumar, P., S. Henikoff and P. C. Ng (2009). "Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm." Nat Protoc **4**(7): 1073-1081.

Kwon, S. K., J. Woo, S. Y. Kim, H. Kim and E. Kim (2010). "Trans-synaptic adhesions between netrin-G ligand-3 (NGL-3) and receptor tyrosine phosphatases LAR, protein-tyrosine phosphatase delta (PTPdelta), and PTPsigma via specific domains regulate excitatory synapse formation." J Biol Chem **285**(18): 13966-13978.

Lek, M., K. J. Karczewski, E. V. Minikel, K. E. Samocha, E. Banks, T. Fennell, A. H. O'Donnell-Luria, J. S. Ware, A. J. Hill, B. B. Cummings, T. Tukiainen, D. P. Birnbaum, J. A. Kosmicki, L. E. Duncan, K. Estrada, F. Zhao, J. Zou, E. Pierce-Hoffman, J. Berghout, D. N. Cooper, N. DeFlaux, M. DePristo, R. Do, J. Flannick, M. Fromer, L. Gauthier, J. Goldstein, N. Gupta, D. Howrigan, A. Kiezun, M. I. Kurki, A. L. Moonshine, P. Natarajan, L. Orozco, G. M. Peloso, R. Poplin, M. A. Rivas, V. Ruano-Rubio, S. A. Rose, D. M. Ruderfer, K. Shakir, P. D. Stenson, C. Stevens, B. P. Thomas, G. Tiao, M. T. Tusie-Luna, B. Weisburd, H. H. Won, D. Yu, D. M. Altshuler, D. Ardissino, M. Boehnke, J. Danesh, S. Donnelly, R. Elosua, J. C. Florez, S. B. Gabriel, G. Getz, S. J. Glatt, C. M. Hultman, S. Kathiresan, M. Laakso, S. McCarroll, M. I. McCarthy, D. McGovern, R. McPherson, B. M. Neale, A. Palotie, S. M. Purcell, D. Saleheen, J. M. Scharf, P. Sklar, P. F. Sullivan, J. Tuomilehto, M. T. Tsuang, H. C. Watkins, J. G. Wilson, M. J. Daly, D. G. MacArthur and C. Exome Aggregation (2016). "Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans." Nature **536**(7616): 285-291.

Levivier, E., B. Goud, M. Souchet, T. P. Calmels, J. P. Mornon and I. Callebaut (2001). "uDENN, DENN, and dDENN: indissociable domains in Rab and MAP kinases signaling pathways." Biochem Biophys Res Commun **287**(3): 688-695.

Li, H. (2013). "Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM."

Lubs, H. A., R. E. Stevenson and C. E. Schwartz (2012). "Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery." Am J Hum Genet **90**(4): 579-590.

Mallard, F., B. L. Tang, T. Galli, D. Tenza, A. Saint-Pol, X. Yue, C. Antony, W. Hong, B. Goud and L. Johannes (2002). "Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform." J Cell Biol **156**(4): 653-664.

Marth, E. G. a. G. (2012). "Haplotype-based variant detection from short-read sequencing."

Martínez, F., A. Caro-Llopis, M. Roselló, S. Oltra, S. Mayo, S. Monfort and C. Orellana (2016). "High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing." J Med Genet.

Martinez, O., A. Schmidt, J. Salaméro, B. Hoflack, M. Roa and B. Goud (1994). "The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport." J Cell Biol **127**(6 Pt 1): 1575-1588.

Maulik, P. K., M. N. Mascarenhas, C. D. Mathers, T. Dua and S. Saxena (2011). "Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies." Res Dev Disabil **32**(2): 419-436.

McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, J. H. U. B., MD). "Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®." from <http://omim.org/>.

Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies - the next generation." Nat Rev Genet **11**(1): 31-46.

Michelson, D. J., M. I. Shevell, E. H. Sherr, J. B. Moeschler, A. L. Gropman and S. Ashwal (2011). "Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society." Neurology **77**(17): 1629-1635.

Miserey-Lenkei, S., F. Waharte, A. Boulet, M. H. Cuif, D. Tenza, A. El Marjou, G. Raposo, J. Salamero, L. Hélot, B. Goud and S. Monier (2007). "Rab6-interacting protein 1 links Rab6 and Rab11 function." Traffic **8**(10): 1385-1403.

Literaturverzeichnis

- Mitsui, N., K. Shimizu, H. Nishimoto, H. Mochizuki, M. Iida and H. Ohashi (2013). "Patient with terminal 9 Mb deletion of chromosome 9p: refining the critical region for 9p monosomy syndrome with trigonocephaly." Congenit Anom (Kyoto) **53**(1): 49-53.
- Moreno-De-Luca, A., S. L. Helmers, H. Mao, T. G. Burns, A. M. Melton, K. R. Schmidt, P. M. Fernhoff, D. H. Ledbetter and C. L. Martin (2011). "Adaptor protein complex-4 (AP-4) deficiency causes a novel autosomal recessive cerebral palsy syndrome with microcephaly and intellectual disability." J Med Genet **48**(2): 141-144.
- Mori, Y., T. Matsui, D. Omote and M. Fukuda (2013). "Small GTPase Rab39A interacts with UACA and regulates the retinoic acid-induced neurite morphology of Neuro2A cells." Biochem Biophys Res Commun **435**(1): 113-119.
- Musante, L. and H. H. Ropers (2014). "Genetics of recessive cognitive disorders." Trends Genet **30**(1): 32-39.
- Novarino, G., A. G. Fenstermaker, M. S. Zaki, M. Hofree, J. L. Silhavy, A. D. Heiberg, M. Abdellateef, B. Rosti, E. Scott, L. Mansour, A. Masri, H. Kayserili, J. Y. Al-Aama, G. M. Abdel-Salam, A. Karminejad, M. Kara, B. Kara, B. Bozorgmehri, T. Ben-Omran, F. Mojahedi, I. G. Mahmoud, N. Bouslam, A. Bouhouche, A. Benomar, S. Hanein, L. Raymond, S. Forlani, M. Mascaro, L. Selim, N. Shehata, N. Al-Allawi, P. S. Bindu, M. Azam, M. Gunel, A. Caglayan, K. Bilguvar, A. Tolun, M. Y. Issa, J. Schroth, E. G. Spencer, R. O. Rosti, N. Akizu, K. K. Vaux, A. Johansen, A. A. Koh, H. Megahed, A. Durr, A. Brice, G. Stevanin, S. B. Gabriel, T. Ideker and J. G. Gleeson (2014). "Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders." Science **343**(6170): 506-511.
- Ogawa, M., Y. Yoshikawa, T. Kobayashi, H. Mimuro, M. Fukumatsu, K. Kiga, Z. Piao, H. Ashida, M. Yoshida, S. Kakuta, T. Koyama, Y. Goto, T. Nagatake, S. Nagai, H. Kiyono, M. Kawalec, J. M. Reichhart and C. Sasakawa (2011). "A Tecpr1-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens." Cell Host Microbe **9**(5): 376-389.
- Oka, J., A. Matsumoto, Y. Hosokawa and S. Inoue (1994). "Molecular cloning of human cytosolic purine 5'-nucleotidase." Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 917-922.
- Okonechnikov, K., O. Golosova, M. Fursov and U. team (2012). "Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit." Bioinformatics **28**(8): 1166-1167.
- Pfeifer, A., A. Aszódi, U. Seidler, P. Ruth, F. Hofmann and R. Fässler (1996). "Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein mice lacking cGMP-dependent protein kinase II." Science **274**(5295): 2082-2086

Literaturverzeichnis

- Picker, J. D. and C. A. Walsh (2013). "New innovations: therapeutic opportunities for intellectual disabilities." Ann Neurol **74**(3): 382-390.
- Pirooznia, M., F. S. Goes and P. P. Zandi (2015). "Whole-genome CNV analysis: advances in computational approaches." Front Genet **6**: 138.
- Puri, R. D., M. Tuteja and I. C. Verma (2016). "Genetic Approach to Diagnosis of Intellectual Disability." Indian J Pediatr **83**(10): 1141-1149.
- Rauch, A., J. Hoyer, S. Guth, C. Zweier, C. Kraus, C. Becker, M. Zenker, U. Hüffmeier, C. Thiel, F. Rüschenhoff, P. Nürnberg, A. Reis and U. Trautmann (2006). "Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation." Am J Med Genet A **140**(19): 2063-2074.
- Recacha, R., A. Boulet, F. Jollivet, S. Monier, A. Houdusse, B. Goud and A. R. Khan (2009). "Structural basis for recruitment of Rab6-interacting protein 1 to Golgi via a RUN domain." Structure **17**(1): 21-30.
- Robinson, J. T., H. Thorvaldsdóttir, W. Winckler, M. Guttman, E. S. Lander, G. Getz and J. P. Mesirov (2011). "Integrative genomics viewer." Nat Biotechnol **29**(1): 24-26.
- Ropers, H. H. (2010). "Genetics of early onset cognitive impairment." Annu Rev Genomics Hum Genet **11**: 161-187.
- Ruggeri, P., L. Cappabianca, A. R. Farina, L. Gneo and A. R. Mackay (2016). "NGF FLIPs TrkA onto the death TRAIL in neuroblastoma cells." Cell Death Dis **7**: e2139.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.
- Saillour, Y., G. Zanni, V. Des Portes, D. Heron, L. Guibaud, M. T. Iba-Zizen, J. L. Pedespan, K. Poirier, L. Castelnau, C. Julien, C. Franconnet, D. Bonthron, M. E. Porteous, J. Chelly and T. Bienvenu (2007). "Mutations in the AP1S2 gene encoding the sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex are associated with syndromic X-linked mental retardation with hydrocephalus and calcifications in basal ganglia." J Med Genet **44**(11): 739-744.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Serulle, Y., S. Zhang, I. Ninan, D. Puzzo, M. McCarthy, L. Khatri, O. Arancio and E. B. Ziff (2007). "A GluR1-cGKII interaction regulates AMPA receptor trafficking." Neuron **56**(4): 670-688.

Literaturverzeichnis

Seto, S., K. Sugaya, K. Tsujimura, T. Nagata, T. Horii and Y. Koide (2013). "Rab39a interacts with phosphatidylinositol 3-kinase and negatively regulates autophagy induced by lipopolysaccharide stimulation in macrophages." PLoS One **8**(12): e83324.

Shoubridge, C., P. S. Tarpey, F. Abidi, S. L. Ramsden, S. Rujirabanjerd, J. A. Murphy, J. Boyle, M. Shaw, A. Gardner, A. Proos, H. Puusepp, F. L. Raymond, C. E. Schwartz, R. E. Stevenson, G. Turner, M. Field, R. S. Walikonis, R. J. Harvey, A. Hackett, P. A. Futreal, M. R. Stratton and J. Gécz (2010). "Mutations in the guanine nucleotide exchange factor gene IQSEC2 cause nonsyndromic intellectual disability." Nat Genet **42**(6): 486-488.

Silverman, W. (2009). "Prevention of intellectual and developmental disabilities." Intellect Dev Disabil **47**(4): 320-322.

Sobreira, N., F. Schiettecatte, D. Valle and A. Hamosh (2015). "GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene." Hum Mutat **36**(10): 928-930.

Soden, S. E., C. J. Saunders, L. K. Willig, E. G. Farrow, L. D. Smith, J. E. Petrikin, J. B. LePichon, N. A. Miller, I. Thiffault, D. L. Dinwiddie, G. Twist, A. Noll, B. A. Heese, L. Zellmer, A. M. Atherton, A. T. Abdelmoity, N. Safina, S. S. Nyp, B. Zuccarelli, I. A. Larson, A. Modrcin, S. Herd, M. Creed, Z. Ye, X. Yuan, R. A. Brodsky and S. F. Kingsmore (2014). "Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders." Sci Transl Med **6**(265): 265ra168.

Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy and R. Durbin (1997). "Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments." Proteins **28**(3): 405-420.

Spiegel, I., D. Salomon, B. Erne, N. Schaeren-Wiemers and E. Peles (2002). "Caspr3 and caspr4, two novel members of the caspr family are expressed in the nervous system and interact with PDZ domains." Mol Cell Neurosci **20**(2): 283-297.

Spychala, J., V. Madrid-Marina and I. H. Fox (1988). "High Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP." J Biol Chem **263**(35): 18759-18765.

Stenmark, H. and V. M. Olkkonen (2001). "The Rab GTPase family." Genome Biol **2**(5): REVIEWS3007.

Stoker, A. W. (2001). "Receptor tyrosine phosphatases in axon growth and guidance." Curr Opin Neurobiol **11**(1): 95-102.

Literaturverzeichnis

Stoker, A. W. (2015). "RPTPs in axons, synapses and neurology." Semin Cell Dev Biol **37**: 90-97.

Takahashi, H. and A. M. Craig (2013). "Protein tyrosine phosphatases PTP δ , PTP σ , and LAR: presynaptic hubs for synapse organization." Trends Neurosci **36**(9): 522-534.

Takahashi, H., K. Katayama, K. Sohya, H. Miyamoto, T. Prasad, Y. Matsumoto, M. Ota, H. Yasuda, T. Tsumoto, J. Aruga and A. M. Craig (2012). "Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTP δ trans-synaptic interaction." Nat Neurosci **15**(3): 389-398, S381-382.

Tan, R., Y. Wang, S. E. Kleinstejn, Y. Liu, X. Zhu, H. Guo, Q. Jiang, A. S. Allen and M. Zhu (2014). "An evaluation of copy number variation detection tools from whole-exome sequencing data." Hum Mutat **35**(7): 899-907.

Thorvaldsdóttir, H., J. T. Robinson and J. P. Mesirov (2013). "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration." Brief Bioinform **14**(2): 178-192.

Topper, S., C. Ober and S. Das (2011). "Exome sequencing and the genetics of intellectual disability." Clin Genet **80**(2): 117-126.

Torres, R. J., J. G. Puig and H. A. Jinnah (2012). "Update on the phenotypic spectrum of Lesch-Nyhan disease and its attenuated variants." Curr Rheumatol Rep **14**(2): 189-194.

Uetani, N., K. Kato, H. Ogura, K. Mizuno, K. Kawano, K. Mikoshiba, H. Yakura, M. Asano and Y. Iwakura (2000). "Impaired learning with enhanced hippocampal long-term potentiation in PTP δ -deficient mice." EMBO J **19**(12): 2775-2785.

Ungewickell, E., H. Ungewickell, S. E. Holstein, R. Lindner, K. Prasad, W. Barouch, B. Martin, L. E. Greene and E. Eisenberg (1995). "Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles." Nature **378**(6557): 632-635.

Valnegri, P., C. Montrasio, D. Brambilla, J. Ko, M. Passafaro and C. Sala (2011). "The X-linked intellectual disability protein IL1RAPL1 regulates excitatory synapse formation by binding PTP δ and RhoGAP2." Hum Mol Genet **20**(24): 4797-4809.

van Bokhoven, H. (2011). "Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities." Annu Rev Genet **45**: 81-104.

Van Vactor, D. (1998). "Protein tyrosine phosphatases in the developing nervous system." Curr Opin Cell Biol **10**(2): 174-181.

Literaturverzeichnis

- Vauthier, V., S. Jaillard, H. Journal, C. Dubourg, R. Jockers and J. Dam (2012). "Homozygous deletion of an 80 kb region comprising part of DNAJC6 and LEPR genes on chromosome 1P31.3 is associated with early onset obesity, mental retardation and epilepsy." Mol Genet Metab **106**(3): 345-350.
- Verkerk, A. J., M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, Y. H. Fu, D. P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M. F. Victoria and F. P. Zhang (1991). "Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome." Cell **65**(5): 905-914.
- Vieira, N. M., M. S. Naslavsky, L. Licinio, F. Kok, D. Schlesinger, M. Vainzof, N. Sanchez, J. P. Kitajima, L. Gal, N. Cavacana, P. R. Serafini, S. Chuartzman, C. Vasquez, A. Mimbacas, V. Nigro, R. C. Pavanello, M. Schuldiner, L. M. Kunkel and M. Zatz (2014). "A defect in the RNA-processing protein HNRPDL causes limb-girdle muscular dystrophy 1G (LGMD1G)." Hum Mol Genet **23**(15): 4103-4110.
- Vissers, L. E., C. Gilissen and J. A. Veltman (2016). "Genetic studies in intellectual disability and related disorders." Nat Rev Genet **17**(1): 9-18.
- Vissers, L. E. and P. Stankiewicz (2012). "Microdeletion and microduplication syndromes." Methods Mol Biol **838**: 29-75.
- Wassmer, T., N. Attar, M. Harterink, J. R. van Weering, C. J. Traer, J. Oakley, B. Goud, D. J. Stephens, P. Verkade, H. C. Korswagen and P. J. Cullen (2009). "The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network." Dev Cell **17**(1): 110-122.
- White, J., L. Johannes, F. Mallard, A. Girod, S. Grill, S. Reinsch, P. Keller, B. Tzschaschel, A. Echard, B. Goud and E. H. Stelzer (1999). "Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells." J Cell Biol **147**(4): 743-760.
- World Health Organisation (2016). "International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems." from <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en>.
- Wu, C., C. Orozco, J. Boyer, M. Leglise, J. Goodale, S. Batalov, C. L. Hodge, J. Haase, J. Janes, J. W. Huss and A. I. Su (2009). "BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources." Genome Biol **10**(11): R130.
- Yano, S., M. McNamara, S. Halbach and D. Waggoner (2015). "4q21 microdeletion in a patient with epilepsy and brain malformations." Am J Med Genet A **167**(6): 1409-1413.

Literaturverzeichnis

- Yim, Y. I., T. Sun, L. G. Wu, A. Raimondi, P. De Camilli, E. Eisenberg and L. E. Greene (2010). "Endocytosis and clathrin-uncoating defects at synapses of auxilin knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4412-4417.
- Yim, Y. S., Y. Kwon, J. Nam, H. I. Yoon, K. Lee, D. G. Kim, E. Kim, C. H. Kim and J. Ko (2013). "Slitrks control excitatory and inhibitory synapse formation with LAR receptor protein tyrosine phosphatases." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(10): 4057-4062.
- Yoshida, T., T. Shiroshima, S. J. Lee, M. Yasumura, T. Uemura, X. Chen, Y. Iwakura and M. Mishina (2012). "Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule." J Neurosci **32**(8): 2588-2600.
- Yoshimura, S., A. Gerondopoulos, A. Linford, D. J. Rigden and F. A. Barr (2010). "Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors." J Cell Biol **191**(2): 367-381.
- Zhao, M., Q. Wang, P. Jia and Z. Zhao (2013). "Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives." BMC Bioinformatics **14 Suppl 11**: S1.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Olaf Rieß durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Olaf Rieß in Zusammenarbeit mit Dr. Rebecca Buchert-Lo (Leiterin AG Mentale Retardierung) und Dr. rer. nat. Tawfiq Froukh (Abteilung für Biotechnologie und Gentechnik, Philadelphia Universität Amman).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung und Anleitung durch Dr. Rebecca Buchert-Lo von mir eigenständig durchgeführt.

Die Rekrutierung und Bereitstellung der Patientendaten und Blutproben erfolgte durch Dr. rer. nat. Tawfiq Froukh (Abteilung für Biotechnologie und Gentechnik, Philadelphia Universität Amman) und jordanischen Kinderärzten mit Unterstützung von PD Dr. med. Rami Abou Jamra (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Leipzig). Die DNA der Probanden wurde entweder von Mitarbeitern des genetischen Labors des Department of Biotechnology and Genetic Engineering der Philadelphia University Amman in Jordanien oder des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikum Tübingen aus den Blutproben extrahiert.

Die Durchführung des *Next Generation Sequencing* und die Aufbereitung der Daten, sowie die unter 4.9.2 durchgeführte Microarray-Untersuchung erfolgte in der Core Facility c.ATG (Leitung: Prof. Dr. med. Olaf Rieß) des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik Tübingen.

Die Rekrutierung, Untersuchung und Exomsequenzierung der unter 4.3.3 dargestellten Familie I, sowie die unter 4.3.5 beschriebenen Versuche erfolgten durch Dr. Peter McPherson (Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Kanada) und Dr. Berge Minassian (Program in Genetics and Genome Biology, Department of Pediatrics (Neurology), Hospital for Sick Children, University of Toronto, Kanada).

Tübingen, 14.11.2017

9. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Han, C., R. Alkhatir, T. Froukh, A. G. Minassian, M. Galati, R. H. Liu, M. Fotouhi, J. Sommerfeld, A. J. Alfrook, C. Marshall, S. Walker, P. Bauer, S. W. Scherer, O. Riess, R. Buchert, B. A. Minassian and P. S. McPherson (2016). "Epileptic Encephalopathy Caused by Mutations in the Guanine Nucleotide Exchange Factor DENND5A." Am J Hum Genet **99**(6): 1359-1367

10. Danksagung

Ich möchte mich bei all den Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und ohne die diese Arbeit wohl nie zustande gekommen wäre:

Bei Herrn Prof. Dr. Rieß möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen, sowie die fachliche Hilfe und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Rebecca Buchert-Lo für die sehr gute Betreuung, ihre unermüdliche Bereitschaft der Erklärung und Einarbeitung in wissenschaftliche Themen, die ständige Erreichbarkeit und Hilfsbereitschaft bei Fragen, für die Inspiration und Motivation.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für die fachliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich mich bei allen meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die während des Studiums und besonders bei der Arbeit an dieser Doktorarbeit immer liebevoll und unterstützend an meiner Seite standen.