

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

**Identifizierung neuer Kandidatengene der autosomal-
rezessiven Entwicklungsverzögerung und
Intelligenzminderung**

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

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

vorgelegt von

Wörz, Sarah Elisabeth

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Ueffing

Tag der Disputation: 14.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Definition und Klassifikation	2
1.2. Ätiologie	4
1.2.1. Nicht-genetische Ursachen	4
1.2.2. Genetische Ursachen	5
1.3. Next Generation Sequenzierung	7
1.4. Ziele.....	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Untersuchungskollektiv.....	9
2.2. Material	15
2.2.1. Verbrauchsmaterial	15
2.2.2. Chemikalien	15
2.2.3. Puffer, Lösungen	15
2.2.4. Enzyme	16
2.2.5. Kits.....	16
2.2.6. Geräte	16
2.2.7. Programme und Datenbanken.....	17
2.2.8. Primer	17
2.3. Exomsequenzierung	18
2.4. Filterungsschritte.....	19
2.5. Primer Design.....	20
2.6. DNA Aufreinigung und Konzentration	20
2.7. Amplifikation genomischer DNA.....	20
2.8. PCR	21
2.8.1. PCR mit dem Fast Start Kit von Roche.....	21
2.8.2. PCR mit Qiagen Long Range Taq	22
2.8.3. Agarose Gelelektrophorese.....	23
2.8.4. PCR Aufreinigung.....	23
2.9. Sanger Sequenzierung	24
2.9.1. Sequenzierreaktion	24

2.9.2. Sequenzieraufreinigung.....	25
2.9.3. Automatische Sequenzierung.....	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Bekannte Varianten in etablierten Genen.....	27
3.1.1. Familien ID-019 und ID-050	27
3.1.2. Familie ID-045.....	30
3.1.3. Familie ID-063.....	31
3.1.4. Familie ID-066.....	32
3.1.5. Familie ID-077	33
3.1.6. Familie ID-079.....	34
3.2. Neue Varianten in etablierten Genen	36
3.2.1. Familie ID-006.....	36
3.2.2. Familien ID-009 und ID-013	37
3.2.3. Familie ID-014.....	39
3.2.4. Familie ID-028.....	40
3.2.5. Familie ID-055.....	41
3.2.6. Familie ID-056.....	42
3.2.7. Familie ID-059.....	43
3.2.8. Familie ID-068.....	44
3.2.9. Familie ID-069.....	45
3.2.10. Familie ID-070.....	46
3.3. Kandidatengene	47
3.3.1. Familie ID-001	47
3.3.2. Familie ID-061	48
3.4. Ungelöste Fälle	50
4. Diskussion	51
4.1. Neue Varianten.....	53
4.2. Kandidatengene	58
4.3. Ungelöste Fälle und Ausblick	61
5. Zusammenfassung.....	63
6. Literaturverzeichnis	65
7. Erklärung zum Eigenanteil	76
Anhang.....	77

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenin
AAIDD	Association on Intellectual and Developmental Disabilities
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CNV	Kopienzahlvariante
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
F	Weiblich
G	Guanin
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
ICD-10-GM	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme Version 10 German Modification
IQ	Intelligenzquotienten
kb	Kilobasen
M	Männlich
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
NGS	Next Generation Sequenzierung
PCR	Polymerase Kettenreaktion

s	Sekunden
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Thymin
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
WAIS	Wechsler Adult Intelligence Scales
WICS	Wechsler Intelligence Scales for Children

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

- Tabelle 1: Klassifizierung nach ICD-10-GM 2019
- Tabelle 2: Untersuchungskollektiv
- Tabelle 3: Primer
- Tabelle 4: Mastermix FastStart Kit Roche
- Tabelle 5: Sequenzierreaktion FastStart Kit Roche
- Tabelle 6: Mastermix Qiagen Long Range
- Tabelle 7: Sequenzierreaktion Qiagen Long Range
- Tabelle 8: Mastermix Sequenzieraufreinigung
- Tabelle 9: Sequenzierreaktion Sequenzieraufreinigung
- Tabelle 10: Mastermix Sangersequenzierung
- Tabelle 11: Sequenzierreaktion Sangersequenzierung
- Tabelle 12: Identifizierte Varianten
- Abbildung 1: Sequenzieraufreinigung
- Abbildung 2: Anteil konsanguiner Familien in dieser Studie
- Abbildung 3: Anteile an identifizierten DNA-Varianten
- Abbildung 4: Stammbaum Familie ID-019
- Abbildung 5: Stammbaum Familie ID-050
- Abbildung 6: Stammbaum Familie ID-045
- Abbildung 7: Stammbaum Familie ID-063
- Abbildung 8: Stammbaum Familie ID-066
- Abbildung 9: Stammbaum Familie ID-077
- Abbildung 10: Stammbaum Familie ID-079
- Abbildung 11: Stammbaum Familie ID-006
- Abbildung 12: Stammbaum Familie ID-009
- Abbildung 13: Stammbaum Familie ID-013
- Abbildung 14: Stammbaum Familie ID-014
- Abbildung 15: Stammbaum Familie ID-028
- Abbildung 16: Stammbaum Familie ID-055
- Abbildung 17: Stammbaum Familie ID-056
- Abbildung 18: Stammbaum Familie ID-059

Abbildung 19: Stammbaum Familie ID-068

Abbildung 20: Stammbaum Familie ID-069

Abbildung 21: Stammbaum Familie ID-070

Abbildung 22: Stammbaum Familie ID-001

Abbildung 23: Stammbaum Familie ID-061

1. Einleitung

Neurologische Entwicklungsstörungen treten schon in der Kindheit auf und sind ein lebenslanger Zustand, der die Patienten, ihre Familien und die Gesellschaft durch öffentliche Dienstleistungen vor viele Herausforderungen stellt (Najmabadi et al., 2011). Etwa 1-3% der Bevölkerung sind von einer Intelligenzminderung betroffen, welche zu der häufigsten Gruppe von neurologischen Entwicklungsstörungen gehört (Roeleveld et al., 1997, Leonard and Wen, 2002). Intelligenzminderung, früher auch als mentale Retardierung bezeichnet, ist durch kognitive Beeinträchtigung und Einschränkung der Funktionsfähigkeit definiert und kann durch unterschiedliche exogene Faktoren prä-, peri-, oder postnatal verursacht werden (Ropers, 2010). Es ist jedoch bekannt, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Ätiologie spielen und mindestens 25-50% der Fälle ausmachen (Vissers et al., 2016). Wie bei vielen anderen Erkrankungen ist das Erkennen der zugrunde liegenden genetischen Ursache ein komplexer und zeitaufwändiger Prozess, der jedoch für Patienten und Familien von großem Wert ist. In den letzten Jahren ermöglichten neue Technologien große Fortschritte bei der Entdeckung neuer genomischer Anomalien, die zu Entwicklungsverzögerung und Intelligenzminderung führen, darunter vor allem die Next Generation Sequenzierung (Nemoto et al.). Dieser Ansatz hat wesentlich neue Einblicke in die mit Intelligenzminderung verbundenen biochemischen Pathways ermöglicht und den diagnostischen Prozess enorm verbessert. Doch obwohl Fortschritte in der Genotypisierung und Sequenzierungstechnologie die Entdeckungsrate von Genen für Intelligenzminderung beschleunigt haben, bleiben immer noch viele Gene unentdeckt (Yang et al., 2013). Autosomal-rezessive Varianten spielen hierbei eine wichtige Rolle, da rezessive Varianten in heterozygoter Form in der Bevölkerung unentdeckt bleiben können (Harripaul et al., 2018). In Populationen mit einer hohen Rate an konsanguinen Ehen sind viele Mutationen rezessiv (Musante and Ropers, 2014) und konsanguine Ehen führen zu einem deutlichen Anstieg der Häufigkeit schwerer rezessiver

Erkrankungen (Modell and Darr, 2002). Etwa 1,3 Milliarden Menschen leben in konsanguinen Ehen vor allem aus Afrika, dem Nahen Osten, und Südasien. In diesen Ländern wird der Anteil konsanguiner Ehen auf über 20% geschätzt (Hamamy, 2012). Im Iran wird die Anzahl konsanguiner Ehen in der Bevölkerung auf etwa 40% geschätzt (Saadat et al., 2004). Auch in Bevölkerungsgruppen mit einer sehr niedrigen Anzahl an konsanguinen Ehen wird geschätzt, dass 13-24% der Kinder mit Entwicklungsverzögerung eine autosomal-rezessive Mutation tragen (Musante and Ropers, 2014).

1.1. Definition und Klassifikation

Die American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD) definiert Entwicklungsverzögerung als eine Behinderung, die durch erhebliche Einschränkungen sowohl der intellektuellen Funktionsfähigkeit als auch des adaptiven Verhaltens gekennzeichnet ist und viele soziale und praktische Fertigkeiten des Alltags umfasst. Sie entsteht vor dem Alter von 18 Jahren (Schalock et al., 2010). Hierbei wird intellektuelle Funktionsfähigkeit auch als Intelligenz bezeichnet und bezieht sich auf allgemeine mentale Fähigkeiten wie Lernen, Denken, Problemlösen etc. (Schalock et al., 2010). Die Intelligenz kann mit Hilfe von Intelligenzquotienten (IQ)-Tests gemessen werden. Diese sind unter anderem der Wechsler Adult Intelligence Scales (WAIS) oder der Wechsler Intelligence Scales for Children (WICS) (Ropers, 2010).

Adaptives Verhalten ist die Sammlung konzeptioneller, sozialer und praktischer Fähigkeiten, die von Menschen im Alltag erlernt und ausgeführt werden.

Konzeptionellen Fähigkeiten umfassen Sprechen, Lesen und das Verständnis von Geld-, Zeit-, und Zahlenkonzepten. Unter soziale Fähigkeiten werden zwischenmenschliche Fähigkeiten, soziale Verantwortung, Selbstwertgefühl, Leichtgläubigkeit, soziale Problembewältigung, und die Fähigkeit Regeln/Gesetzen zu befolgen, verstanden. Praktischen Fähigkeiten beinhalten Aktivitäten des alltäglichen Lebens (Schalock et al., 2010).

Standardisierte Tests wie der Diagnostic Adaptive Behavior Scale können Einschränkungen des adaptiven Verhaltens bestimmen (Tasse et al., 2016).

1. Einleitung

Die Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme Version 10 German Modification (ICD-10-GM) bezeichnet Intelligenzminderung als eine verzögerte oder unvollständige Entwicklung der geistigen Fähigkeiten mit besonderer Beeinträchtigung von Fähigkeiten, die zur Intelligenz beitragen und welche sich während der Entwicklung ausprägen, wie Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten (Blanz et al., 2009).

Wie stark die Intelligenzminderung ausgeprägt ist wird anhand standardisierter Intelligenztests gemessen und wie folgt klassifiziert:

Tabelle 1: Klassifizierung nach ICD-10-GM 2019 (Blanz et al., 2009)

Klassifikation	IQ	Erwachsenen Intelligenzalter	Anmerkungen
Leichte Intelligenzminderung	50-69	9 bis <12 Jahre	Lernschwierigkeiten in der Schule
Mittelgradige Intelligenzminderung	35-49	6 bis <9 Jahre	Deutliche Entwicklungsverzögerung, Unterstützung im alltäglichen Leben wird benötigt
Schwere Intelligenzminderung	20-34	3 bis <6 Jahre	Andauernde Unterstützung notwendig
Schwerste Intelligenzminderung	<20	<3 Jahre	Eigene Versorgung, Kontinenz, Kommunikation, Beweglichkeit hochgradig beeinträchtigt
Dissoziierte Intelligenz			Deutliche Diskrepanz (mind. 15 IQ-Punkte) zwischen Sprach-IQ und Handlungs-IQ
Andere Intelligenzminderung			Beurteilung mit Hilfe der üblichen Verfahren nicht möglich z.B. bei Blinden, Taubstummen
Nicht näher bezeichnete Intelligenzminderung			Informationen nicht ausreichend für die Einordnung in eine der oben genannten Kategorien

Neben der Klassifikation nach ICD-10-GM kann die Intelligenzminderung klinisch auch in syndromale und nicht-syndromale Formen eingeteilt werden (Arolt et al., 2001). Bei der syndromalen Form sind neben der Intelligenzminderung auch eine oder mehrere klinische Merkmale oder

Begleiterkrankungen vorhanden. Nicht-syndromale Intelligenzminderung wurde ursprünglich durch das Vorhandensein einer Intelligenzminderung als einziges klinisches Merkmal definiert. Subtilere neurologischer Veränderungen und psychiatrischer Störungen wie Verhaltensauffälligkeiten konnten bei betroffenen Patienten jedoch schwer ausgeschlossen werden, da diese aufgrund der kognitiven Beeinträchtigung weniger offensichtlich oder schwer zu diagnostizieren sind. Manche Symptome können daher erst im Zusammenhang mit einem zuvor identifizierten und bekannten Gendefekt erkannt und diagnostiziert werden. Die Unterscheidung zwischen beiden Formen ist oft schwierig und mit fließendem Übergang (Ropers and Hamel, 2005, Kaufman et al., 2010)

1.2. Ätiologie

1.2.1. Nicht-genetische Ursachen

Intelligenzminderung ist eine extrem heterogene Gruppe von Erkrankungen und kann durch genetische oder nicht-genetische Faktoren verursacht werden (Winnepenninckx et al., 2003, Rauch et al., 2006). Nicht-genetische Faktoren umfassen Umweltbelastungen, Ernährungsfaktoren, toxische Exposition während der Schwangerschaft und geburtshilfliche Komplikationen. Sozioökonomische Faktoren wie Einkommensniveau, familiäre Verhältnisse und kulturelles Umfeld tragen ebenfalls zur Intelligenzminderung bei (Delobel-Ayoub et al., 2015). Die Prävalenz von Intelligenzminderung ist in ärmeren Ländern zwei- bis dreifach höher als in westlichen Ländern (Drews et al., 1995, Stromme, 2000). Pränatale und perinatale Komplikationen wie Hypoxie, fetale Hirnschädigung aufgrund der Übertragung von Infektionskrankheiten (z.B. Röteln, Toxoplasmose und Cytomegalovirus) im Mutterleib, Traumata und ein niedriges Geburtsgewicht tragen ebenfalls zur Prävalenz von Intelligenzminderung bei (Ropers, 2010). In Industrieländern ist das fetale Alkoholsyndrom die häufigste vermeidbare Ursache von Intelligenzminderung (Ropers, 2010, Silverman, 2009). Dabei wird das zentrale Nervensystem des Embryos geschädigt, was zu Lernschwäche, Störungen der Kognition,

motorischen Störungen und Verhaltensauffälligkeiten in der Entwicklung des Kindes führt (Kelly et al., 2000, Riley and McGee, 2005, Mattson and Riley, 2011). Wie stark die jeweiligen Symptome ausgeprägt sind korreliert mit der konsumierten Alkoholmenge während der Schwangerschaft (Hepper et al., 2012).

1.2.2. Genetische Ursachen

1.2.2.1. Chromosomenaberrationen

Chromosomenaberrationen sind eine häufige Ursache der Intelligenzminderung und ca. 0,9 % aller Lebendgeburten weisen mikroskopisch sichtbare Aneuploidien oder chromosomale Aberrationen auf (Cunningham et al., 2003). In Patienten mit Intelligenzminderung wurden viele verschiedene Arten von Chromosomenaberrationen identifiziert (Rauch et al., 2006). Am häufigsten tritt hierbei die Trisomie 21, auch Down-Syndrom genannt, mit einer Prävalenzrate von 1 / 600 Lebendgeburten auf (Barca et al., 2014, Ballif et al., 2007). Des Weiteren wurden pathogene Kopienzahlvarianten, auch copy number variants (CNVs) genannt, in einer großen Anzahl von Studien mit Intelligenzminderung assoziiert (Ropers and Hamel, 2005, Zahir and Friedman, 2007). Kopienzahlvarianten sind Strukturvarianten der DNA, bei denen chromosomale Abschnitte in erhöhter (Duplikation) oder verringerter (Deletion) Kopienanzahl vorliegen. Die Anzahl der Kopien im Genom weicht also von der des Referenzgenoms ab (Schaaf and Zschocke, 2013). CNVs können zu Mikrodeletionssyndromen führen, bei denen die Haploinsuffizienz eines einzelnen Gens die Intelligenzminderung erklärt, wie beispielsweise *EHMT1* beim Kleefstra-Syndrom oder *KANSL1* beim Koolen-de-Vries-Syndrom (Kleefstra and de Leeuw, 1993, Koolen et al., 1993). Im Gegensatz dazu können CNVs auch mehrere Kb bis Mb an DNA betreffen und mehrere Gene umfassen, was zu einem Contiguous-Gene-Syndrom führt. Bei einem Contiguous-Gene-Syndrom ist mehr als ein Gen für den Phänotyp verantwortlich und die Schwere des Phänotyps hängt insbesondere auch von der Größe der CNV ab. Sie verursachen in der Regel eine Intelligenzminderung, welche mit anderen klinischen Merkmalen assoziiert ist,

wie beispielsweise beim Williams-Beuren-Syndrom oder dem Prader-Willi-Syndrom (Ravnan et al., 2006).

1.2.2.2. X-chromosomale Intelligenzminderung

Bereits 1938 wurde bei Männern eine höhere Rate an Intelligenzminderung festgestellt. Diese Beobachtung wurde durch mehrere Studien bestätigt und das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt durchschnittlich 1,3: 1 (Leonard and Wen, 2002). Es wird geschätzt, dass 0,18 % aller Männer von X-chromosomaler Intelligenzminderung betroffen sind und 0,24 % aller Frauen Überträgerinnen für eine X-chromosomale Intelligenzminderung sind (Hamel and Poppelaars, 2000).

Das häufigste Gen, das an der X-chromosomalen Intelligenzminderung beteiligt ist, ist das *FMR1*, welches zu einem Fragilen-X-Syndrom führt. Man geht davon aus, dass es bis zu 25% aller Fällen von X-chromosomaler Intelligenzminderung verursacht, gefolgt von Mutationen im *ARX*-Gen (Mandel and Biancalana, 2004, Gecz et al., 2006). Des Weiteren wird angenommen, dass das Fragile-X-Syndrom die häufigste vererbte Intelligenzminderung und insgesamt die zweithäufigste Intelligenzminderung nach dem Down-Syndrom ist. Mutationen in anderen Genen machen jeweils nur einen kleinen Prozentsatz aller Patienten aus (Martin and Bell, 1943, Mandel and Biancalana, 2004, Tzschach et al., 2015).

1.2.2.3. Autosomal-dominante Intelligenzminderung

Stammbäume mit über mehrere Generationen vererbter Intelligenzminderung bei autosomal-dominantem Erbgang treten selten auf, da sich insbesondere die schwer Betroffenen selten fortpflanzen (Ropers, 2010). Man geht unter anderem aus diesem Grund davon aus, dass die meisten Fälle von autosomal-dominanter Intelligenzminderung *de novo* auftreten.

Trio-basierte Exomsequenzierung wurde als vorteilhafter Ansatz für die Identifizierung von *de novo* autosomal dominanten pathogenen Varianten bei Intelligenzminderung und anderen neurologischen Entwicklungsstörungen implementiert.

In einer Studie mit 51 untersuchten Patienten haben Rauch und ihre Kollegen in 14 Patienten, also 31% der Kohorte, pathogene *de novo*-Varianten in bereits beschriebenen Genen für Intelligenzminderung identifiziert (Rauch et al., 2012). In einer noch größeren Studie mit einer Kohorte von 4.293 Patienten haben McRae und seine Kollegen sogar in 42% pathogene *de novo*-Varianten entdeckt (McRae et al., 2017). Man konnte zeigen, dass die meisten sporadischen Fälle der Intelligenzminderung auf *de novo*-Mutationen zurückzuführen sind (Rauch et al., 2012, McRae et al., 2017).

1.2.2.4. Autosomal-rezessive Intelligenzminderung

Die Forschung im Bereich autosomal-rezessiver Intelligenzminderung war bis vor kurzem noch nicht weit vorangeschritten. Aufgrund von seltenen konsanguinen Ehen und in der Regel kleineren Familien in westlichen Gesellschaften, wurde die Identifizierung autosomal-rezessiver Gendefekte erschwert (Najmabadi et al., 2011). In Ländern des Nahen und Mittleren Osten jedoch ist die Anzahl an konsanguinen Ehen besonders hoch. Im Iran beispielsweise sind 40% aller Ehen konsanguin was zu einem erhöhten Anteil an autosomal-rezessiven Erkrankungen in der Bevölkerung führt (Najmabadi et al., 2011). Die Einführung von DNA-Sequenzierungstechniken mit hohem Durchsatz hat zu neuen Fortschritten in der Identifizierung von autosomal-rezessiven Gendefekten geführt (Reuter et al., 2017). Es hat sich jedoch gezeigt, dass das klinische Bild der autosomal-rezessiven Intelligenzminderung extrem heterogen ist. Die Gesamtzahl der autosomal-rezessiven Gene kann in die Tausenden gehen und die große Mehrheit der Varianten in diesen Genen ist noch immer unbekannt (Musante and Ropers, 2014).

1.3. Next Generation Sequenzierung

Next Generation Sequenzierung (Nemoto et al.) auch „Hochdurchsatz-Sequenzierung“ genannt, bezeichnet eine massive, parallele Sequenzierung von DNA. NGS ist eine mittlerweile weit verbreitete und zielgerichtete Sequenzierungsmethode. Mit NGS werden Hunderte Millionen DNA-Segmente gleichzeitig in Zyklen von einem (single-read) oder beiden (paired-end) Enden

sequenziert. Bei NGS können parallel eine große Anzahl an Genen sequenziert werden, was zu einer schnelleren Verarbeitung im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung führt (Behjati and Tarpey, 2013). Das Exom macht weniger als 2% des menschlichen Genoms aus, enthält jedoch die meisten bekannten krankheitsverursachenden Varianten, wodurch die Exom-Sequenzierung eine kostengünstige Alternative zu Genom-Sequenzierung ist (Behjati and Tarpey, 2013).

1.4. Ziele

Ziel dieser Studie ist die Exomsequenzierung von 77 Betroffenen aus konsanguinen Familien zur Identifizierung neuer Kandidatengene, die zu autosomal-rezessiver Entwicklungsverzögerung und Intelligenzminderung führen.

2. Material und Methoden

Für diese Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und des Universitätsklinikums Tübingen unter dem Aktenzeichen 901/2018BO1 vor.

2.1. Untersuchungskollektiv

Tabelle 2: Untersuchungskollektiv

Patient	Verwandtschaft	Geschlecht	Intelligenz mind.	Globale Entwicklungsverzögerung	weitere Symptome
001-3	Index	F	++	++	Gingivahyperplasie
001-4	Bruder	M	++	+++	Spastik, stereotypische Bewegung der Hände, kein Augenkontakt, keine verbale Kommunikation
002-3	Onkel (paternal)	M	++		Epilepsie
002-4	Index	F	++	+++	Störungen der Dentition
003-3	Bruder	M			schaukelnde Bewegungen, stereotypische Bewegungen der Hände, Anophthalmie
003-4	Schwester	F	++		schaukelnde Bewegungen, stereotypische Bewegungen der Hände, Anophthalmie, keine verbale Kommunikation
003-5	Index	M	++		Epilepsie, Anophthalmie, schwere Malformation des Skeletes, spastische Zerebralparese
003-6	Schwester	F	++		ruckartige Kopfbewegungen, schaukelnde Bewegungen, stereotypische Bewegungen der Hände
004-3	Bruder	M	++	+++	selbstverletzendes Verhalten: Hand beißen, blind
004-5	Index	M	++		Epilepsie, Harn- und Stuhlinkontinenz, selbstverletzendes Verhalten: Hand beißen, blind, keine verbale Kommunikation
005-3	Bruder	M	++		Normale Entwicklung bis 12 Monate, dann Regression
005-4	Index	M	++		Normale Entwicklung bis 12 Monate, dann Regression
005-5	Schwester	F	++		Normale Entwicklung bis 12 Monate, dann Regression
006-3	Bruder	M	++	+++	aggressives Verhalten
006-4	Index	F	++	++	Sehbeeinträchtigung, Harninkontinenz
007-2	Index	F	++	+++	aggressives Verhalten

2. Material und Methoden

Patient	Verwandtschaft	Geschlecht	Intelligenz mind.	Globale Entwicklungsverzögerung	weitere Symptome
007-3	Bruder	M	++		
007-5	Bruder	M	++	+++	Epilepsie, aggressives Verhalten, Enurese
008-3	Index	M	++	+	aggressives Verhalten
008-4	Schwester	F	++		
008-5	Bruder	M	++	+++	aggressives Verhalten
009-3	Schwester	F	+	+++	Asymmetrische Körperentwicklung
009-4	Index	F	+	++	Epilepsie
009-5	Bruder	M	++		Asymmetrische Körperentwicklung
010-1	Index	M	++		aggressives Verhalten
010-6	Schwester	F	++		
011-3	Index	F	++	+++	ruckartige Bewegungen der Extremitäten und stereotypische Bewegungen der Hände
011-5	Schwester	F	++	+++	
011-6	Schwester	F	++	+++	Epilepsie, Strabismus
012-4	Index	M	++		Epilepsie, aggressives Verhalten
012-5	Bruder	M	++		aggressives Verhalten, Strabismus, Hörminderung
013-1	Index	F	++		Epilepsie, aggressives Verhalten, selbst verletzendes Verhalten
013-3	Schwester	F	++		Epilepsie, aggressives Verhalten
014-3	Bruder	M	+	+++	aggressives Verhalten
014-4	Index	M	++	+++	Epilepsie, Spastik der Füße
014-5	Bruder	M	++	+++	aggressives Verhalten, Enurese
015-3	Bruder	M	++		
015-4	Bruder	M	++		
015-6	Index	M	++		Epilepsie
015-8	Bruder	M	++		
016-3	Bruder	M	++		
016-6	Index	F	++		
017-3	Schwester	F	++	+++	Sehbeeinträchtigung
017-4	Index	M	++	+++	Mikrognathie, Sehbeeinträchtigung
018-4	Index	F	++		
018-5	Bruder	M	++		
019-4	Schwester	F	++	+++	
019-5	Index	F	++	+++	Ataxie
020-3	Index	M	++	++	aggressives Verhalten, Sehbeeinträchtigung
020-4	Bruder	M	++	++	aggressives Verhalten, Sehbeeinträchtigung
021-3	Index	M	++	+++	Epilepsie, aggressives Verhalten, Störungen der Dentition
021-4	Schwester	F	++	+++	
022-3	Schwester	F	++		Epilepsie
022-4	Index	M	++	+	Gangstörung

2. Material und Methoden

Patient	Verwandtschaft	Geschlecht	Intelligenz mind.	Globale Entwicklungsverzögerung	weitere Symptome
023-3	Bruder	M	++		Epilepsie, OFC: 47.5cm
023-4	Index	M	++		Epilepsie, OFC: 47cm, Mikrognathie
024-3	Bruder	M	++		Tief gelegene Augen, Sehbeeinträchtigung
024-4	Index	M	++		Epilepsie, Mikrophthalmie, tief gelegene Augen, tiefsitzende Ohren, aggressives Verhalten, selbstverletzendes Verhalten
025-2	Schwester	F	++	+++	Epilepsie, taubstumm
025-4	Index	F	++	+++	Epilepsie
025-5	Bruder	M	++	+++	Epilepsie, aggressives Verhalten
026-3	Bruder	M	++	+++	Zerebralparese, Urin- und Stuhlinkontinenz
026-4	Index	M	++	+++	Zerebralparese, Urin- und Stuhlinkontinenz
027-3	Index	M	++	+++	aggressives Verhalten, stumm
027-4	Schwester	F	++	+++	aggressives Verhalten, stumm
027-5	Schwester	F	++	+++	aggressives Verhalten, stumm
027-6	Bruder	M	++	+++	aggressives Verhalten, stumm
028-3	Schwester	F	++	+++	aggressives Verhalten, Sehbeeinträchtigung, Hirsutismus
028-4	Schwester	F	++	+++	aggressives Verhalten, Sehbeeinträchtigung, Osteoporose: multiple Hand und Fuß Frakturen
028-5	Index	M	++	+++	Epilepsie, aggressives Verhalten, Osteoporose: multiple Hand und Fuß Frakturen
028-6	Bruder	M	++	+++	Epilepsie, aggressives Verhalten
029-2	Index	M	++	+	autistisches Verhalten
029-3	Bruder	M	++	+	autistisches Verhalten
029-4	Schwester	F	++	+	autistisches Verhalten
029-5	Schwester	F	++	+	autistisches Verhalten
030-3	Tante (paternal)	F	++		Epilepsie
030-5	Index	F	++	+++	Epilepsie, Strabismus, Körpergröße:140cm
030-6	Bruder	M	+++	+++	Epilepsie, Störungen der Dentition
031-3	Schwester	F	++	+	
031-5	Schwester	F	++	+	Epilepsie
032-3	Index	M	++		Epilepsie
032-4	Bruder	M	+		
032-8	Schwester	F	++		Epilepsie
033-3	Index	M	++		
033-4	Bruder	M	++		Aggressives Verhalten, psychotisch
033-6	Schwester	F	++		
034-5	Schwester	F	++		Epilepsie
034-9	Bruder	M	++		Epilepsie, aggressives Verhalten

2. Material und Methoden

Patient	Verwandtschaft	Geschlecht	Intelligenz mind.	Globale Entwicklungsverzögerung	weitere Symptome
035-4	Index	M	++		Epilepsie, stark hypoplastische Hoden
035-5	Bruder	M	++		
035-6	Bruder	M	++		
035-7	Bruder	M	+		
036-3	Schwester	F	++		faziale Dysmorphie, Polydaktylie, Skoliose
036-5		F			faziale Dysmorphie, Halluzinationen
037-4	Tante (maternal)	F	++		
037-5	Onkel (maternal)	M	++		
037-6	Index	F	++	+	faziale Dysmorphie, prominente Stirn
037-7	Bruder	M	++	+	
038-3	Index	M	++		
038-4	Bruder	M	++		
039-3	Index	M	++	+	faziale Dysmorphie, Störungen der Dentition, Sehbeeinträchtigung
039-5	Schwester	F	++	+	faziale Dysmorphie, Störungen der Dentition, Brachymetatarsia
040-4	Index	M	++	+++	
040-5	Bruder	M	++	+	Störungen der Dentition
041-3	Index	F	++	+++	
041-4	Schwester	F	++	+++	
042-3	Index	M	+		
042-5	Bruder	M	+		
042-6	Bruder	M	+		
042-8	Schwester	F	+		
043-4	Index	M	++		
044-6	Tante	F	++	+++	
044-7	Tante	F	++	+++	Epilepsie, Bruxismus in wachem Zustand
044-9	Index	F	++		Epilepsie, motorische Regression
045-3	Index	M	++	+	Epilepsie
045-4	Bruder	M	++	+	Epilepsie
046-3	Index	F	++	+	Epilepsie
046-4	Bruder	M	++	+	Epilepsie
047-3	Index	F	++	++	Schilddrüsenerkrankung
047-4	Schwester	F	++		
047-5	Schwester	F	++	++	Epilepsie
048-3	Index	M	++		
048-4	Schwester	F	++		
048-5	Bruder	M	++		aggressives Verhalten
049-3	Schwester	F	++	+	Sehbeeinträchtigung, Strabismus, offener Mund, Bewegungsstörung, kein freies Stehen möglich
049-4	Index	M	++	+	Bewegungsstörung

2. Material und Methoden

Patient	Verwandtschaft	Geschlecht	Intelligenz mind.	Globale Entwicklungsverzögerung	weitere Symptome
050-3	Index	M	++	+	
050-4	Schwester	F	++	+	
051-3	Index	M	++	+	Epilepsie
051-4	Bruder	M	++	+	Generalisierte Spastik
052-3	Bruder	M	+		
052-4	Index	M	+		
052-5	Bruder	M	+		
052-6	Bruder	M	+		
053-4	Index	M	++	++	Epilepsie, Schwäche der Unterarmmuskulatur
053-5	Schwester	F	+		Schwäche der Unterarmmuskulatur
054-3	Schwester	F	++		Körpergröße:126cm, Z.n. Schilddrüsenoperation
054-5	Index	F	++	++	Körpergröße:119cm, Kropf
055-3	Index	F	++	+	Nystagmus, Urininkontinenz
055-5	Bruder	M	++	++	
056-3	Index	F	++	+	Schlechter Augenkontakt, Hörminderung, Urin- und Stuhlinkontinenz
056-5	Schwester	F	++	+	Schlechter Augenkontakt, Hörminderung, Urin- und Stuhlinkontinenz
057-3	Schwester	F	++	+	Epilepsie, Strabismus
057-5	Index	F	++	+	
058-3	Index	M	++		Aggressives Verhalten
058-5	Schwester	F	++		
059-4	Schwester	F	++		Epilepsie, Katarakt
059-5	Schwester	F	+++		Epilepsie, Katarakt
059-6	Schwester	F	++		Epilepsie, Katarakt
059-7	Schwester	F	+		Epilepsie, Katarakt
059-8	Schwester	F	++		Epilepsie, Katarakt
059-9	Index	M	++		Epilepsie, Katarakt
060-3	Index	M	++	++	Generalisierte Spastik
060-4	Bruder	M	++	++	selbst verletzendes Verhalten, generalisierte Spastik
061-3	Index	M	++	++	Urin- und Stuhlinkontinenz
061-5	Schwester	F	++		Zerebralparese, Dysplasie des Skeletes: Skoliose, Urin- und Stuhlinkontinenz
062-3	Schwester	F	++	++	Zerebralparese, Sehbeeinträchtigung, Nystagmus
062-4	Index	M	++	+++	Sehbeeinträchtigung
063-3	Index	F	+		Epilepsie
063-4	Zwillingschwester	F	+		Epilepsie
064-4	Index	F	++		
064-5	Zwillingschwester	F	++		

2. Material und Methoden

Patient	Verwandtschaft	Geschlecht	Intelligenz mind.	Globale Entwicklungsverzögerung	weitere Symptome
066-5	Schwester	F	++	+++	
066-7	Index	M	++	+++	Epilepsie
066-8	Cousin	M	++	++	repetitive Bewegungen der Hände
066-9	Cousine	F	++		Muskuläre Hypotonie, tiefsitzende Ohren
067-3	Bruder	M	++	+++	
067-4	Index	F	++	+++	
067-5	Bruder	M	++		Neuroregression, Glutarazidurie Typ 1
068-3	Index	F	+		
068-4	Bruder	M	+		Gangstörung
068-6	Bruder	M	+		Gangstörung
069-3	Bruder	M	++	++	Sehbeeinträchtigung, Nyktalopie, Urininkontinenz
069-4	Bruder	M	++	++	
069-6	Index	M	++	+++	Doppelte Liedfalte, Z.n. Gaumenspalte, Sehbeeinträchtigung
070-4	Index	M	++	+++	Skoliose, generalisierte Spastik
070-5	Bruder	M	++	++	Strabismus
072-3	Index	F	+		
072-4	Bruder	M	+		
072-5	Bruder	M	+		
073-3	Index	F	+	+++	
073-4	Schwester	F	+	+++	
074-3	Index	M	+	++	Gangstörung, Ataxie, taubstumm
074-5	Schwester	F	+		taubstumm
074-6	Tante (maternal)	F	+		taubstumm
076-4	Bruder	M	+		
076-5	Index	M	+		
077-4	Zwillingsbruder	M	++	++	
077-5	Index	M	+	++	Strabismus, Tremor
078-3	Index	M	++	++	aggressives Verhalten
078-4	Schwester	F	++	++	aggressives Verhalten
079-3	Zwillingschwester	F	+		aggressives Verhalten, breites Philtrum
079-4	Index	F	++	++	
080-3	Index	F	++	++	Stottern, Asthma ähnliche Symptome
080-4	Schwester	F	++	++	Stottern

Legende: F = weiblich, M = männlich, + = mild, ++ = moderat, +++ = schwer

2.2. Material

2.2.1. Verbrauchsmaterial

8-Strip PCR Tubes 0.2ml	Star Lab	Hamburg, Deutschland
96-Well Platten	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Adhesive Seal	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
Pipettenspitzen	Star Lab	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.2.2. Chemikalien

Borsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
EDTA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	VWR	Radnor, USA
Ethidiumbromid	VWR	Radnor, USA
Glycerin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	VWR	Radnor, USA
Magnetic Beads	CleanNA	Waddinxveen, NL
O'Gene Ruler Marker	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
SeaKem Agarose	Lonza	Walkersville, USA
Tris Base	AppliChem	Darmstadt, Deutschland

2.2.3. Puffer, Lösungen

10x TBE Puffer	108g Tris Base 55g Borsäure 40ml 0,5M EDTA (pH 8,0) 1L H ₂ O
Ladepuffer	3ml Glycerin (30%) 25mg Bromphenolblau (0,25%) 7ml H ₂ O

2.2.4. Enzyme

Antarktische Phosphatase	New England BioLabs	Frankfurt, Deutschland
Exonuklease I	New England BioLabs	Frankfurt, Deutschland

2.2.5. Kits

Big Dye	ThermoFisher Scientific	Waltham, USA
FastStart	Roche	Basel, Schweiz
FastStart High Fidelity	Roche	Basel, Schweiz
LongRange	Qiagen	Hilden, Deutschland
REPLI-g Mini	Qiagen	Hilden, Deutschland

2.2.6. Geräte

3730xl DNA Analyzer	Applied Biosystems	Waltham, USA
	Hitachi	Tokio, Japan
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie	Erlangen, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	GRAM Deutschland	Gießen, Deutschland
Gelkämme	Peqlab Biotechnologie	Erlangen, Deutschland
Kühlschränke 4°C	Kirsch	Offenburg, Deutschland
Laborwaage	Kern & Sohn GmbH	Balingen Deutschland
Mikrowelle	Severin	Sundern, Deutschland
NovaSeq6000	Illumina	San Diego, USA
Photometer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Thermocycler G-Storm	AlphaMetrix Biotech	Rödermark, Deutschland
UV Transluminator	Biostep GmbH	Burkhardtsdorf, Deutschland
Vortex Mixer 7-2020	NeoLab	Heidelberg, Deutschland
Vortex Mixer VF2	NeoLab	Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge 5418	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Mini Zentrifuge	NeoLab	Heidelberg, Deutschland

2.2.7. Programme und Datenbanken

1000 Genomes	http://www.internationalgenome.org/
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
Decipher	https://decipher.sanger.ac.uk/
Ensembl	http://grch37.ensembl.org/
gnomAD	https://gnomad.broadinstitute.org/
GSvar	https://github.com/imgag/megSAP
HGMD	https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/
IGV	http://software.broadinstitute.org/software/igv/
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OMIM	http://omim.org/
Pfam	https://pfam.xfam.org/
PrimerDesign	institutsintern entwickelt
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
sysID	https://sysid.cmbi.umcn.nl/
UCSC	https://genome.ucsc.edu/

2.2.8. Primer

Tabelle 3: Primer

Gen	Exon	Primer Foreward	Primer Reverse
AGA	3	TCGTGGATGTGCTGTCA CT	GCTGGAATTTGAACTTAGATCT GG
B4GALNT 1	5	TCCCTAGGCACCTGGGA C	GGGAGACACACCCAAGGC
CC2D2A	24	GTTGGGCTGGAGGACTG G	CCTGGCCCAAATGCATACC
CENPJ	16	GTCTCCAGAAGTAGCTG CCA	GTGCTCTACGGCTGATGTGT
GBA2	14	CACAGGCCCCAGGTTAG C	ATAGCGGCCTGGAGTCGA
KIAA0556	16	TCAAGGTGGCGCAGTGA G	TCACCCCGTCGATGAGGT
L2HGDH	7	TCTAGCTGCCACCTAAAT GCT	TCCTTTATGACCACCACCTGC
LAMA1	16	ATGGTTGCACAGCTCGG T	TCACTTGTACACAGCAAATGG C
NLN	7	GCCTATAACACCAAATG	TCTGAGGCCTTCTGTCTGGT

2. Material und Methoden

		GAACCA	
PAH	7	GCCAAGTCTGCCTAGCG T	AGCTTGGCTGCCACTTGT
PC	16	GAG CTAGCCCTGGGTCCT	GCCAGGCACCTCAAGGAG
RDH	4	TCAAAGCCTGAGCGTGA GG	CAGAACCTGGAGCAGCCC
SCN1A	21	CTGGCAGCAAGTTCCTC TGA	TGGTCTGGTCACTACTGACT
SNX14	3	CAGGATCACGGCTTACT GCA	GCCATGGCTGGTAGTTTTCA
SPG20	1	AACTCCAAGTGCAGGGG C	CCCAGGATACGAAGGTGCA
SYNJ2	1	CCTCTGGAGGGGGCACAG A	CATGGACCGGGCTCCATC
TTC5	4	CGCCATTGCACTTCAGC C	AGAGCACCAAGGACACCA
UBE3A		GCTCTGTCTGTGCCCGT T	ACGTATTCAGAGCTGTTTCAGG A
VPS13B	52	CTGACAGGGGGCCAGAAC A	GAGCAGATGGGGGCACAGG

2.3. Exomsequenzierung

Die Sequenzierung der Proben wurde durch die core facility NCCT (Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Universität Tübingen) durchgeführt und die Datenanalyse wurde von der Abteilung für Bioinformatik mit der institutsintern entwickelten megSAP-Pipeline durchgeführt.

SeqPurge (v. 0.1-935) (Sturm et al., 2016) wurde für Adapter- und Qualitätsanpassung verwendet, BWA mem (v. 0.7.17) (Li, 2014) für Read Mapping, Sambalster (v. 0.1.24) (Faust and Hall, 2014) für die Entfernung von Duplikaten, ABRA2 (v. 2.18) (Mose et al., 2019) für das Realignment von Indels, Freebayes (v. 1.2.0) (Garrison and Marth, 2012) für das Variantencalling und Ensembl VEP (v. 94.5) (McLaren et al., 2016) für die Variantenannotierung. Verschiedene Tools aus dem ngs-bits-Toolset wurden für die Qualitätskontrolle, die Annotierung der internen Variantenhäufigkeiten und für das Calling von Varianten mit Kopiennummern verwendet.

Die gesamte Bioinformatikanalyse und alle in dieser Arbeit angegebenen Genomkoordinaten basieren auf dem GRCh37-Genom.

2.4. Filterungsschritte

Die aus der Exomsequenzierung und anschließender bioinformatischer Analyse gewonnenen Daten wurden in dem institutsintern entwickeltem Programm *GSvar* dargestellt. Nach öffnen einer Datei in *GSvar*, zeigt das Programm alle Varianten, die in Abweichung zum Referenzgenom identifiziert wurden an. Die generierten Daten, die im Schnitt etwa 65.000 Varianten umfassen, erfordern anschließend eine effektive Filterstrategie, um die relevantesten Kandidatenvarianten zu identifizieren und zu priorisieren, die dem Phänotyp des Patienten zugeordnet sind. Um potentiell pathogene Varianten in der großen Anzahl an ermittelten Varianten zu identifizieren, mussten bestimmte Filterungsschritte durchgeführt werden.

Zunächst wurden seltene Varianten gesucht und nach ihrer Allelfrequenz gefiltert. Varianten mit einer Frequenz von über 1% in der gesunden Bevölkerung wurden ausgeschlossen, da diese sehr wahrscheinlich nicht pathogen sind. Hierzu wurden die Daten mit denen des 1000GenomeProject und der gnomAD Datenbank verglichen. Zusätzlich wurden Varianten, die bereits mehr als fünfmal in der hauseigenen Datenbank beschrieben wurden, sogenannte *in house*-Kontrollen, herausgefiltert. Als nächstes wurden alle funktionell relevanten Varianten herausgefiltert. Hierzu zählen alle exonischen und nicht-synonymen Varianten sowie Spleiß-Varianten. Die verbleibenden Varianten wurden weiter nach Vererbungsmodell gefiltert. Hierbei wurden zunächst vor allem die homozygoten Varianten evaluiert, da die Stammbäume der Familien eine autosomal-rezessive Vererbung am wahrscheinlichsten machen. Bei unauffälligen Ergebnissen wurden auch compound-heterozygote und anschließend heterozygote und hemizygoten Varianten evaluiert. Bei der Evaluation interessanter Varianten wurde nach Auftreten in bekannten Genen, die mit dem Phänotyp zusammenhängen, mithilfe von HPO-Begriffen (Phänotypmerkmalen) gefiltert. Hierbei wurden Einträge in den Datenbanken OMIM, HGMD, und ClinVar untersucht und beurteilt. Auch die Vorhersage von Pathogenitäts-Prädiktionsprogrammen (CADD, FATHMM, PolyPhen, Sift, phyloP) wurde mit einbezogen.

2.5. Primer Design

Primer wurden mit Hilfe des hauseigenen Programmes PrimerDesign entworfen. Hierbei wurde auf verschiedene Parameter geachtet. Die Primer sollten eine Länge von etwa 20bp haben und das gewünschte PCR-Produkt eine Länge von 300-500bp mit einer Allelfrequenz an Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) von unter 1%. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 59 °C und 63 °C liegen und die Schmelztemperatur der forward und reverse Primer nicht mehr als 1°C auseinander liegen. Der G/C Gehalt sollte bei 40-60% liegen. Es sollten nicht mehr als drei gleiche Basen direkt aufeinander folgen und Poly-A oder lange GC-Bereiche sollten vermieden werden, da es sonst zu Verrutschungen des Primers kommen kann. Des Weiteren muss darauf geachtet werden, dass forward und reverse Primer nicht aneinander binden und der Primer auch nicht in sich selbst bindet. Das 3' Ende sollte, wenn möglich, mit Guanin oder Cytosin und das 5' Ende mit Adenin oder Thymin enden.

2.6. DNA Aufreinigung und Konzentration

2.7. Amplifikation genomischer DNA

Ein Teil der Patienten-DNA wurde mit dem REPLI-g Mini Kit vom Hersteller Qiagen amplifiziert. REPLI-g verwendet isotherme Genomamplifikation, die als Multiple Displacement Amplification bezeichnet wird. Hierbei werden variable Hexamere an denaturierte DNA gebunden, gefolgt von einer Strangverdrängungssynthese bei konstanter Temperatur mit dem Enzym Phi 29-Polymerase. Gemäß des Herstellerprotokolls wurde zunächst 2,5µl der zu amplifizierenden DNA mit 17µl SB1 Puffer vermischt und bei 65°C für 5min inkubiert um die DNA zu denaturieren. Danach wurde ein Mastermix aus 17µl SB2 Puffer und 1µl REPLI-g Mini DNA Polymerase hergestellt und zur denaturierten DNA gegeben. Dies wurde dann bei 30°C für 10-16h inkubiert und anschließend bei 65°C 3min inaktiviert.

2.8. PCR

2.8.1. PCR mit dem Fast Start Kit von Roche

Anhand der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können ausgewählte Nukleotidsequenzen exponentiell vervielfacht werden. Demnach führen n Zyklen zu einer 2^n -fachen Anreicherung (Saiki et al., 1988). Für die PCR werden Primer im Überschuss zu einem Reaktionsgemisch gegeben, welches die zu vermehrende DNA, freie Nucleotide, und eine hitzestabile DNA-Polymerase enthält. Das Gemisch wird auf 94°C erhitzt um die DNA zu denaturieren, das heißt die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, zu trennen. Danach wird die Temperatur gesenkt, damit die Primer mit den komplementären Bereichen der denaturierten DNA hybridisieren können. Die DNA-Polymerase synthetisiert die zum jeweiligen Strang komplementären Sequenzen beginnend am 3' Ende des Primers. Die Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung, und DNA Synthese werden 25 Mal oder, wenn nötig, öfters wiederholt (Nordheim A, 2018).

Als erster Schritt wurde immer eine PCR mit dem Fast Start Kit von Roche durchgeführt.

Ein Mastermix bestehend aus folgenden Reagenzien wurde erstellt:

Tabelle 4: Mastermix FastStart Kit Roche

Mastermix	Menge (μl)
H ₂ O	14,3
10xPCR-Puffer+MgCl ₂	2,5
dNTP-Mix	0,5
Betain (5M)	2
Q-Solution	2
Fast Start Taq	0,2
DNA	1,5
Primer (forward)	1
Primer (reverse)	1
Gesamtvolumen	25

2. Material und Methoden

Die Sequenzierreaktion lief im Thermocycler unter folgendem Programm ab:

Tabelle 5: Sequenzierreaktion FastStart Kit Roche

Zyklen	Zeit	Temperatur
1	5min	95°C
10	30s 30s 30s	94°C 65°C -1°C 72°C
30	30s 30s 30s	94°C 55°C 72°C
1	7min	72°C

2.8.2. PCR mit Qiagen Long Range Taq

Bei negativen Ergebnissen der PCR mit dem Fast Start Kit von Roche konnte eine PCR mit Qiagen Long Range Taq durchgeführt werden.

Ein Mastermix bestehend aus folgenden Reagenzien wurde erstellt:

Tabelle 6: Mastermix Qiagen Long Range

Mastermix	Menge (µl)
H ₂ O	11,05
10xPCR-Puffer+MgCl ₂	2,5
dNTP-Mix	1,25
Q-Solution	5
Long Range Taq	0,2
DNA	3
Primer (forward)	1
Primer (reverse)	1
Gesamtvolumen	25

Die Sequenzierreaktion lief im Thermocycler unter folgendem Programm ab:

Tabelle 7: Sequenzierreaktion Qiagen Long Range

Zyklen	Zeit	Temperatur
1	3min	93°C
10	15s 30s 1min	93°C 65°C -1°C 68°C
30	15s 30s 1min +20s	93°C 55°C 68°C
1	12min	68°C

2.8.3. Agarose Gelelektrophorese

Zur Verifizierung der PCR Produkte wurde Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des Agarosegels wurde ein Verhältnis von 1g Agarose pro 100ml TBE Puffer angemischt und in einer Mikrowelle zum Aufkochen gebracht. Danach wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (1µl pro 20ml Agarosegel). Nach Verfestigung des Gels wurde der Gelträger in eine Elektrophoresekammer gelegt und die Kammer mit Laufpuffer (TBE Puffer) gefüllt. Die DNA-Proben wurden mit loading buffer im Verhältnis 5:1 vermischt und in die Kammern gefüllt. In die erste und letzte Kammer wurde jeweils 1µl Marker gefüllt. Der Lauf wurde bei 90-120V und 400mA für 25-30min gestartet. Danach wurde das Gel auf einem UV-Transluminator positioniert und das Ergebnis fotografiert und dokumentiert.

2.8.4. PCR Aufreinigung

Nach abgelaufener PCR und Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte aufgereinigt um überschüssige Primer abzubauen und überschüssige dNTPs zu dephosphorilieren.

Ein Mastermix bestehend aus folgenden Reagenzien wurde erstellt:

Tabelle 8: Mastermix Sequenzieraufreinigung

Mastermix	Menge (µl)
H ₂ O	1
Antarktische Phosphatase Puffer	1,25
Exonuklease Puffer	1,25
Antarktische Phosphatase	0,5
Exonuklease I	1
Gesamtvolumen	5

Die Sequenzierreaktion lief im Thermocycler unter folgendem Programm ab:

Tabelle 9: Sequenzierreaktion Sequenzieraufreinigung

Zyklen	Zeit	Temperatur
1	30min	37°C
1	15min	80°C
1	15min	10°C

2.9. Sanger Sequenzierung

2.9.1. Sequenzierreaktion

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte die Sequenzierreaktion. Die Kettenabbruch- oder Dideoxymethode der DNA Sequenzierung wurde von Fred Sanger (1977) entwickelt. Zuerst werden doppelsträngige PCR-Produkte bei 96°C denaturiert und getrennt. Danach folgt die Polymerisation unter Verwendung einer DNA-Polymerase. Hierbei wird jeweils nur einer der beiden Primer verwendet, um überlappende Sequenzen zu vermeiden. Da Dideoxynukleotide (ddNTPs) keine 3'-Kohlenstoff Gruppe an ihrer Ribose haben, führt ihr Einbau zu einem Kettenabbruch. Durch Kettenabbruchsequenzierung erfolgt eine statistisch aufgeteilte Unterbrechung der DNA Synthese und es entstehen unterschiedlich lange DNA Fragmente (Sanger et al., 1977). Im Kapillarsequenzierer können die unterschiedlich langen DNA-Fragmente dann durch eine spezifische Fluoreszenzmarkierung, mit der sie versehen wurden, detektiert und dargestellt werden.

Ein Mastermix bestehend aus folgenden Reagenzien wurde erstellt:

Tabelle 10: Mastermix Sangersequenzierung

Mastermix	Menge (µl)
H ₂ O	4
Big Dye Puffer	1.5
Big Dye	1
Primer	0.5
PCR Produkt	3
Gesamtvolumen	10

Die Sequenzierreaktion lief im Thermocycler unter folgendem Programm ab:

Tabelle 11: Sequenzierreaktion Sangersequenzierung

Zyklen	Zeit	Temperatur
1	2min	96°C
30	10s	96°C
	5s	58°C
	3min	60°C
1	1min	60°C

2.9.2. Sequenzieraufreinigung

Nach der Sequenzierreaktion wurden die Sequenzierprodukte aufgereinigt. Hierbei wurden Puffer, unverbrauchte dNTPs, ddNTPs, Primer und die Polymerase entfernt. Zunächst wurden 10µl magnetic beads sowie 42µl 85% Ethanol zu jeder Probe gegeben und diese gut vermischt. Die PCR-Fragmente wurden an die magnetic beads gebunden. Das ganze wurde 3-5min auf eine magnetische Platte gestellt und die klare Flüssigkeit wurde verworfen. Nun wurde 100µl 85% Ethanol hinzugegeben und nach 30s wurde wieder die klare Flüssigkeit verworfen. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zum Schluss wurde 40µl H₂O zu jeder Probe gegeben um die DNA-Fragmente wieder von den magnetic beads zu lösen. Davon wurden 25µl auf eine Sequenzierplatte transferiert.

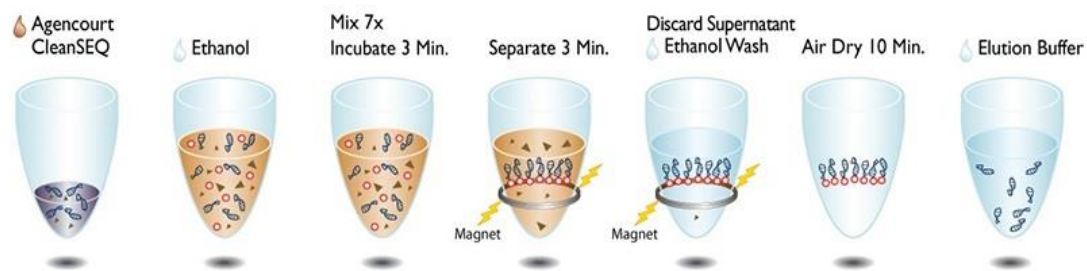


Abbildung 1: Sequenzieraufreinigung (Coulter, 2020)

2.9.3. Automatische Sequenzierung

Das Produkt der Sequenzierreaktion wurde nach abgeschlossener Sequenzieraufreinigung in den Kapillarsequenzier (ABI3730, Applied Biosystems) gegeben. Im Kapillarsequenzier wandern die unterschiedlich langen DNA Fragmente durch ein Kapillargel. Je nach Länge der Fragmente wandern sie unterschiedlich weit. Am Ende ihrer Wanderung werden die Fragmente von geeigneten Laserstrahlen angeregt. Die Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen durch Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und können so von einem Computer erkannt werden. Dieser übersetzt sie sogleich in Nukleotidsequenzen. (Nordheim A, 2018).

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 77 iranische Familien mit mindestens zwei entwicklungsverzögerten Kindern genetisch untersucht mit dem Ziel eine autosomal-rezessive Ursache der Erkrankung zu finden. Pro Familie wurde ein Indexpatient mittels WES sequenziert. In 22 der 77 Familien (28,6%) waren die Eltern konsanguin und in allen 77 Familien waren mindestens zwei der Kinder erkrankt (Abb. 2).

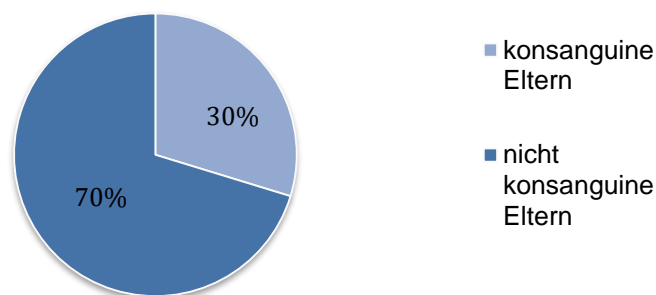


Abbildung 2: Anteil konsanguiner Familien in dieser Studie

In 7 Familien (9,1%) wurden bereits bekannte Varianten in Genen für Entwicklungsverzögerung identifiziert. In 11 Familien (14,3%) wurden neue, bisher nicht beschriebene, Varianten in bekannten Genen identifiziert. In 2 Familien (2,6%) konnten Varianten in bisher unbekanntem oder kaum beschriebenen Genen identifiziert werden. In 57 Familien (74%) wurden keine pathogenen oder wahrscheinlich pathogenen Varianten identifiziert und diese Fälle bleiben zum jetzigen Standpunkt ungelöst (Abb. 3).

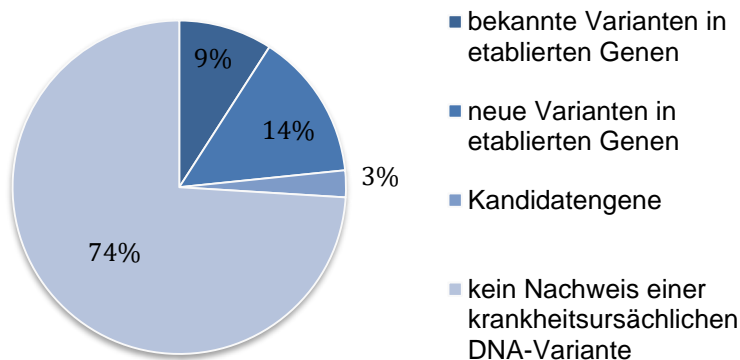


Abbildung 3: Anteile an identifizierten DNA-Varianten

3. Ergebnisse

Tabelle 12: Identifizierte Varianten

Patient	Gen	Erkrankung	Vererbung	Variante	Zygotität
001-3	<i>SYNJ2</i>			c.1217_1220delA TCT p.His406fs	homozygot
006-4	<i>KIAA0556</i>	Joubert-Syndrom Typ 26	AR	c.2764del p.Asp922Thrfs*75	homozygot
009-4	<i>CENPJ</i>	Mikrozephalie Typ 6	AR	c.3893G>A p.Arg1298Gln	homozygot
013-1	<i>CENPJ</i>	Mikrozephalie Typ 6	AR	c.3893G>A p.Arg1298Gln	homozygot
014-4	<i>SPG20</i>	Troyer Syndrom	AR	c.685C>T p.Gln229*	homozygot
019-5	<i>PAH</i>	Phenylketonurie	AR	p.Tyr268Cys	heterozygot
	<i>PAH</i>			p. Arg261Gln	heterozygot
028-5	<i>LAMA1</i>	Poretti-Boltshauser- Syndrom	AR	c.2216G>A p.Cys739Tyr	homozygot
045-3	<i>B4GALNT1</i>	Spastische Paraplegie Typ 26	AR	c.661C>T p.Gln221*	homozygot
050-3	<i>PAH</i>	Phenylketonurie	AR	c.767G>A p.Arg256Gln	homozygot
055-3	<i>CC2D2A</i>	Joubert-Syndrom Typ 9	AR	c.2999A>T p.Glu1000Val	homozygot
056-3	<i>SNX14</i>	Spinozerebelläre Ataxie Typ 14	AR	c.331C>T p.Arg111*	homozygot
059-9	<i>RDH</i>	Netzhautdystrophie, juveniler Katarakten und Kleinwuchs- Syndrom	AR	c.413C>T p.Thr138Ile	homozygot
061-3	<i>TTC5</i>			c.407_408del p.Lys136Serfs*16	homozygot
063-3	<i>SCN1A</i>	Dravet-Syndrom	AD	c.4205_4208del p.Arg1402Metfs*9	heterozygot
066-7	<i>UBE3A</i>	Angelman-Syndrom	AD	c.2355-2A>G	heterozygot
068-3	<i>GBA2</i>	Spastische Paraplegie Typ 46	AR	c.2080_2092del p.Ala694*	homozygot
069-6	<i>VPS13B</i>	Cohen-Syndrom	AR	c.9252dupT p.Thr3085yrfs*5	homozygot
070-4	<i>PC</i>	Pyruvatcarboxylase- Mangel	AR	c.2548T>G p.Cys850Gly	homozygot
077-5	<i>L2HGDH</i>	L 2 Hydroxy Glutarazidurie	AR	c.905C>T p.Pro302Leu	homozygot
079-4	<i>AGA</i>	Aspartyl- glucosaminurie	AR	c.302C>T p.Ala101Val	homozygot

3.1. Bekannte Varianten in etablierten Genen

3.1.1. Familien ID-019 und ID-050

Die Familie ID-019 hat vier Kinder von denen zwei der Töchter erkrankt sind (Abb. 4). Die Eltern sind blutsverwandt. Die Patientin ID-019-4 sowie die Patientin ID-019-5 sind von einer Intelligenzminderung und schweren globalen

Entwicklungsverzögerung betroffen. Freies Laufen wurde erst im Alter von zehn Jahren erlernt und die Schwestern leiden unter einer Sprachentwicklungsverzögerung.

Durch Literaturrecherche und unter Berücksichtigung des klinischen Bildes der Patientin wurden die jeweils heterozygoten Missense-Varianten c.782G>A p.Arg261Gln und c.803A>G p.Tyr268Cys im Exon 7 des *PAH*-Gens (ENST00000553106) als krankheitsursächlich vermutet. Beide Varianten sind in der Literatur bereits als krankheitsursächlich für eine autosomal-rezessiv erbliche Phenylketonurie vorbeschrieben (z.B. PMID: 2014036, 26481238). Aufgrund der genomischen Nähe der beiden Varianten konnte eine biallelische Lokalisation bereits anhand der Exomdaten festgestellt werden. Die c.782G>A p.Arg261Gln Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung 61-mal in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet jedoch nur in heterozygoter Form und die c.803A> G p.Tyr268Cys Variante wurde nicht in 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet. Beide Varianten befanden sich in einer hochkonservierten Region und wurden von den in-silico Prädiktionsprogrammen Sift, und PolyPhen als pathogen beurteilt.

Die Sanger Sequenzierung der Familienmitglieder zeigte, dass beide Elternteile jeweils für eine der beiden Varianten heterozygot sind. Der Vater ist heterozygoter Träger der c.782G>A Variante und die Mutter ist heterozygote Trägerin der c.803A>G Variante. Somit konnte eine biallelische Lokalisation der Varianten auch mittels Sanger Sequenzierung bestätigt werden. Die Indexpatientin sowie ihre ebenfalls erkrankte Schwester sind Trägerinnen beider Varianten in compound-heterozygoter Form. Die gesunde Tochter der Familie ist homozygot für das Wildtyp-Allel.

3. Ergebnisse

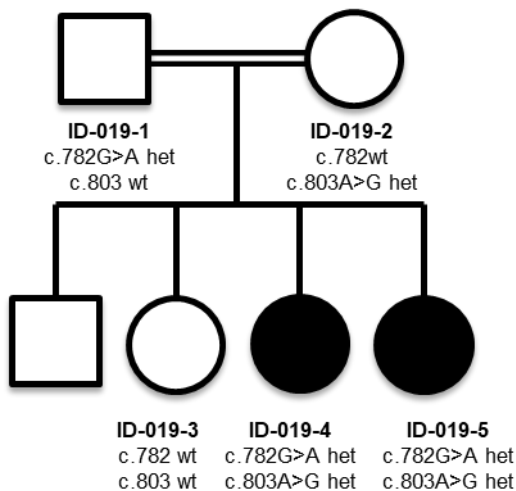


Abbildung 4: Stammbaum Familie ID-019

Die Familie ID-050 hat sechs Kinder von denen zwei erkrankt sind (Abb. 5). Die Patienten ID-050-3 und ID-050-4 sind ebenso wie die beiden erkrankten Töchter der Familie ID-019 von einer Intelligenzminderung sowie globalen Entwicklungsverzögerung betroffen.

Das Exom des Patienten ID-050-3 wurde angereichert und sequenziert. Nach Filterung der Daten sowie ausführlicher Literaturrecherche und unter Berücksichtigung des klinischen Bildes des Patienten wurden die homozygote Missense-Variante c.782G>A p.Arg261Gln im Exon 7 des *PAH*-Gens als krankheitsursächlich vermutet. Diese Variante wurde bereits in compound-heterozygoter Form in der Familie ID-019 identifiziert.

Die Variante konnten mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Die Variante wurde heterozygot bei beiden Elternteilen und homozygoter beim Indexpatienten sowie seiner ebenfalls betroffenen Schwester nachgewiesen.

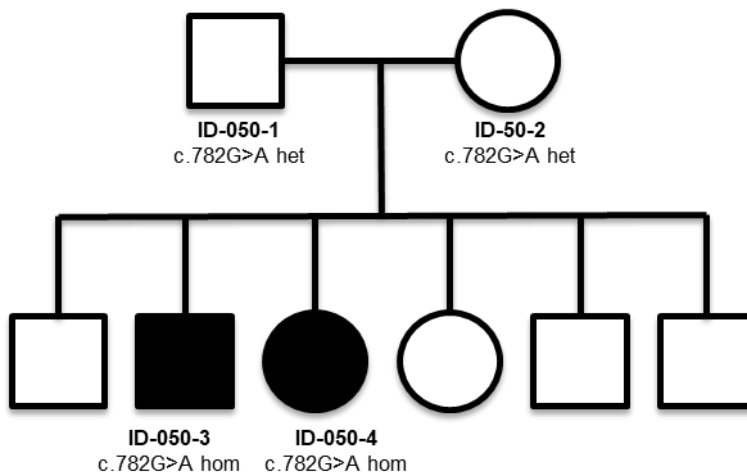


Abbildung 5: Stammbaum Familie ID-050

3.1.2. Familie ID-045

Die Familie ID-045 hat sechs Kinder von denen eine Tochter und zwei Söhne erkrankt sind. Die Eltern sind blutsverwandt (Abb. 6). Über die betroffene Tochter sind keine Informationen bekannt. Die Patienten ID-045-3 und ID-045-4 sind von einer Intelligenzminderung betroffen. Sie leiden unter Gehschwierigkeiten mit einer spastischen Gangstörung. Die Sprachentwicklung ist jedoch regelrecht. Beide Patienten hatten außerdem Krampfanfälle in ihrer Krankheitsgeschichte.

Das Exom des Patienten ID-045-3 wurde angereichert und sequenziert. Nach Filterung der Daten sowie Literaturrecherche wurde die homozygote Stopp-Variante c.661C>T, p.Gln221* im *B4GALNT1*-Gen (ENST00000553106) als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante war zum Zeitpunkt der Datenauswertung in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank nicht gelistet. Sie wurde in der Literatur als krankheitsursächlich für eine autosomal-rezessiv erbliche Spastische Paraplegie Typ 26 beschrieben (z.B. PMID: 23746551).

Die Variante wurde mittels Sanger Sequenzierung in heterozygoter Form bei der Mutter sowie der gesunden Schwester und in homozygoter Form beim Indexpatienten nachgewiesen.

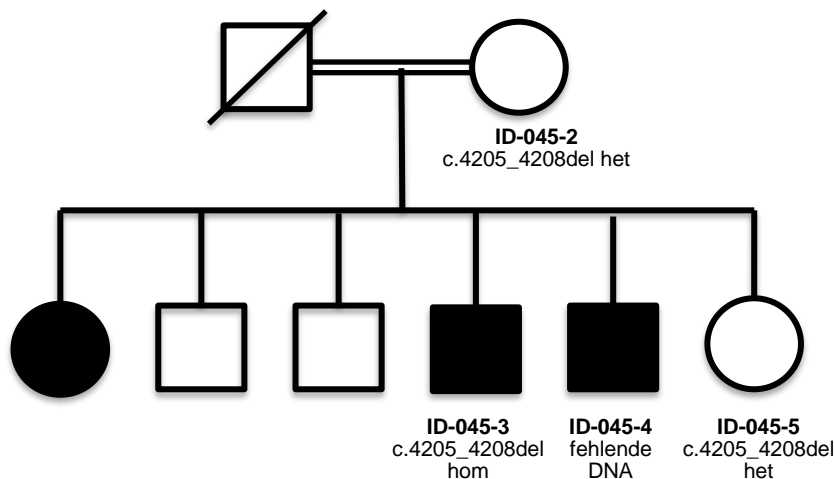


Abbildung 6: Stammbaum Familie ID-045

3.1.3. Familie ID-063

Die Familie ID-063 hatte sieben Kinder von denen ein Sohn und eine Tochter verstorben sind (Abb. 7). Von den übrigen fünf Kindern sind zwei Zwillingsschwestern erkrankt. Die Eltern sind blutsverwandt. Die Zwillingsschwestern ID-063-3 und ID-063-4 zeigen eine milde Intelligenzminderung, schlechte verbale Fähigkeiten und Epilepsie.

Das Exom der Patientin ID-063-3 wurde angereichert und sequenziert. Die Filterung der Daten sowie anschließende Literaturrecherche mit Berücksichtigung des klinischen Bildes der Patientin identifizierte die heterozygote Frameshift-Variante c.4205_4208del, p.Arg1402Metfs*9 im *SCN1A*-Gen (ENST00000553106). Diese Variante ist in der Literatur bereits als ursächlich für ein autosomal-dominant erbliches Dravet-Syndrom, einer Form der frühinfantilen epileptischen Enzephalopathie, beschrieben (z.B. PMID: 21396429). Die Variante war zum Zeitpunkt der Datenauswertung in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank nicht gelistet. Sie wurde vom in-silico Prädiktionsprogramm phyloP als pathogen beurteilt.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Die Mutter sowie die untersuchte gesunde Tochter der Familie sind homozygot für das Wildtyp-Allel. Beide Zwillingsschwestern sind heterozygot für die identifizierte Variante.

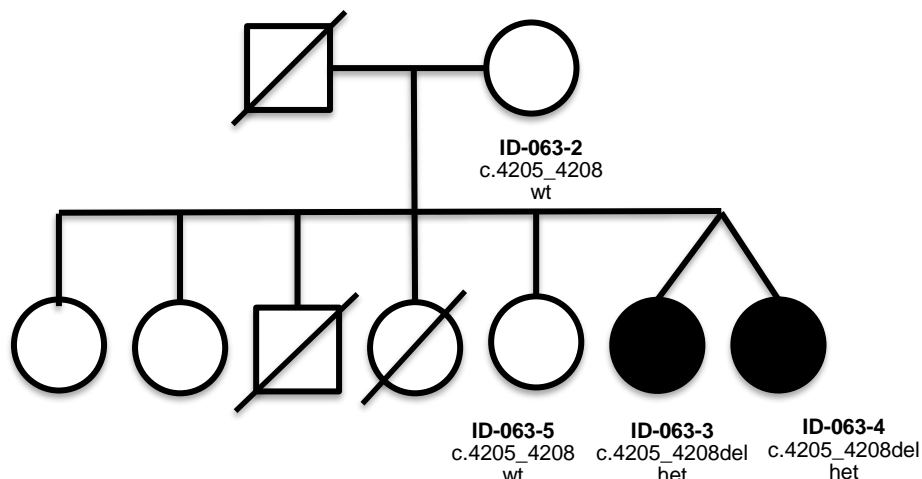


Abbildung 7: Stammbaum Familie ID-063

3.1.4. Familie ID-066

Die Familie ID-066 besteht aus fünf Cousins und Cousinen, welche über ihre Mütter verwandt sind (Abb. 8). Der Patient ID-066-6 ist das einzige gesunde Kind. Die Patientin ID-066-5 ist von einer Intelligenzminderung und schweren globalen Entwicklungsverzögerung betroffen. Sie erlernte das freie Laufen im Alter von fünf Jahren und leidet unter einer Sprachentwicklungsverzögerung. Ihr Bruder, ID-066-7, zeigt ebenfalls Intelligenzminderung, schwere globale Entwicklungsverzögerung, sowie eine Sprachentwicklungsverzögerung. Er erlernte das freie Laufen im Alter von drei Jahren und hatte außerdem Krampfanfälle in der Krankheitsgeschichte. Der Patient ID-066-8 zeigt Intelligenzminderung und globale Entwicklungsverzögerung mit Sprachentwicklungsstörung. Außerdem zeigt er repetitive, nicht kontrollierbare Bewegungen der Hände im Sinne von Stereotypen. Die Patientin ID-066-9 ist hypoton und hat dysmorphe Gesichtszüge mit einem tiefen Ohransatz. Das Exom des Patienten ID-066-7 wurde angereichert und sequenziert. Durch Literaturrecherche und unter Berücksichtigung des klinischen Bildes der Patientin wurde die heterozygote Spleiß-Variante c.2355-2A>G im *UBE3A*-Gen (ENST00000438097) als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante war zum Zeitpunkt der Datenauswertung in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank nicht gelistet. Sie wurde vom in-silico Prädiktionsprogramm phyloP als hoch konserviert beurteilt. Die Variante wurde in der Literatur bereits mehrfach als

3. Ergebnisse

ursächlich für ein Angelman-Syndrom beschrieben (z.B. PMID: 16100729, 25525159). Das *UBE3A*-Gen unterliegt paternalem Imprinting mit einer bevorzugten maternal-spezifischen Expression im Gehirn und insbesondere in Neuronen. Nur maternal vererbte Varianten oder *de novo* entstandenen Varianten auf dem maternal Allel sind krankheitsursächlich (Dindot et al., 2008). Da alle betroffenen Kinder über ihre Mütter verwandt sind, ist eine maternale Vererbung der Variante sehr wahrscheinlich. Allerdings stand keine DNA der Mütter zur Analyse zur Verfügung. Die Variante konnte beim Indexpatienten mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Der betroffene Cousin mütterlicherseits ist ebenfalls heterozygot für die Variante und der gesunde Bruder des Index ist homozygot für das Wildtyp-Allel.

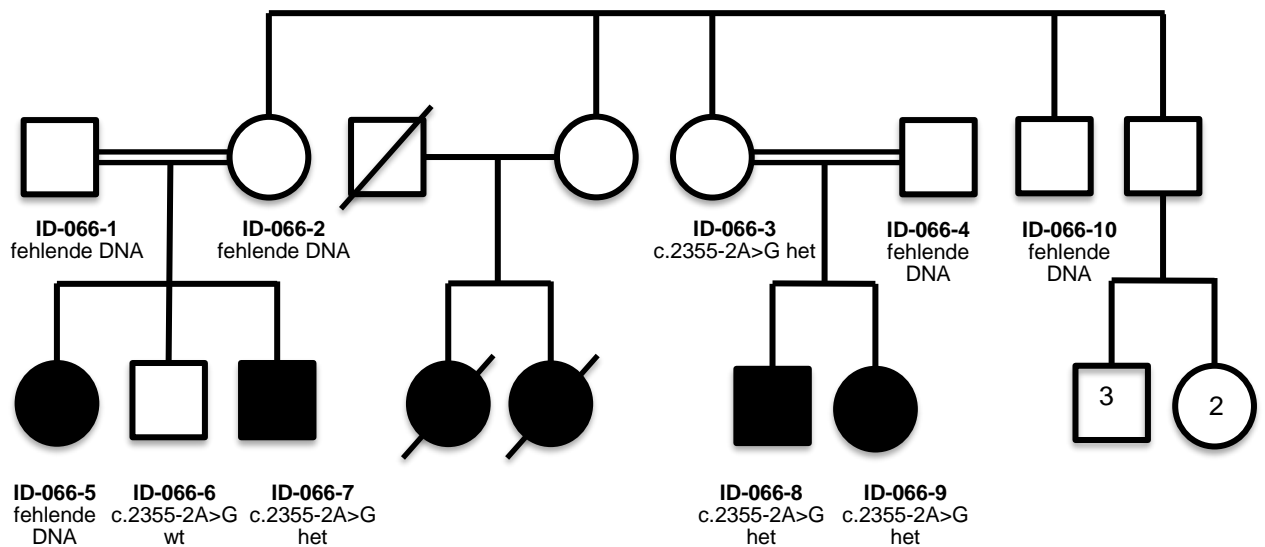


Abbildung 8: Stammbaum Familie ID-066

3.1.5. Familie ID-077

Die Familie ID-077 hat drei Kinder von denen zwei Zwillingssöhne erkrankt sind (Abb. 9). Die Eltern sind blutsverwandt. Die Patienten ID-077-4 und ID-077-5 zeigen beide Intelligenzminderung sowie globale Entwicklungsverzögerung. Freies Laufen wurde im Alter von achtzehn Monaten erlernt. Beide Patienten leiden unter Epilepsie. Der Patient ID-077-5 zeigt außerdem noch einen milden Strabismus sowie einen Ruhetremor.

Das Exom des Patienten ID-077-5 wurde angereichert und sequenziert. Nach Filterung der Daten sowie ausführlicher Literaturrecherche und unter Berücksichtigung des klinischen Bildes des Patienten wurde die homozygote Missense-Variante c.905C>T, p.Pro302Leu im *L2HGDH*-Gen (ENST00000421284) als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante wurde in der Literatur als ursächlich für eine L-2-Hydroxy-Glutarazidurie beschrieben (z.B. PMID: 15385440). Sie wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung 3-mal in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet jedoch nur in heterozygoter Form. Die Variante führt zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure und wurden von den in-silico Prädiktionsprogrammen Sift und PolyPhen als pathogen beurteilt.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Die Variante wurde heterozygot bei beiden Elternteilen und homozygoter beim Indexpatienten sowie seinem ebenfalls betroffenen zweieiigen Zwillingsbruder nachgewiesen. Der gesunde Bruder ist homozygot für das Wildtyp-Allel.

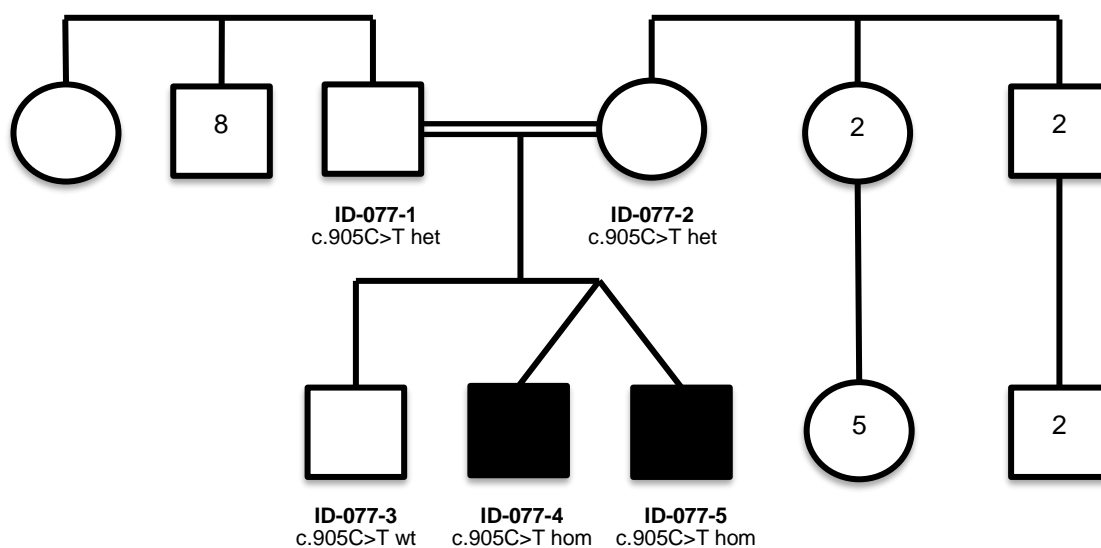


Abbildung 9: Stammbaum Familie ID-077

3.1.6. Familie ID-079

Die Familie ID-079 hat zwei erkrankte Zwillingstöchter außerdem sind noch drei Brüder der Mutter erkrankt (Abb. 10). Die Patientin ID-079-3 zeigt eine milde Intelligenzminderung sowie eine leichte Sprachentwicklungsstörung. Sie zeigt

3. Ergebnisse

außerdem Verhaltensauffälligkeiten mit nonverbal und verbal aggressivem Verhalten. Dazu kommen noch Krampfanfälle in der Krankengeschichte. Die Patientin ID-079-4 zeigt Intelligenzminderung, globale Entwicklungsverzögerung, eine Skoliose und ein verbreitertes Philtrum. Weitere Phänotypangaben zu den Brüdern der Mütter sind nicht bekannt.

Die Auswertung der Exomdaten der Patientin ID-079-4 ergab die homozygote Missense-Variante c.302C>T, p.Ala101Val im AGA-Gen (ENST00000264595) als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante wurde in der Literatur bereits mehrfach als ursächlich für eine Aspartylglukosaminurie beschrieben (z.B. PMID: 1722323, 18992224). Sie wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung einmal in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet. Die Variante führt zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure und wurden von den computerbasierten Prädiktionsprogrammen Sift und PolyPhen als pathogen beurteilt.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalysen waren aufgrund fehlender DNA nicht möglich.

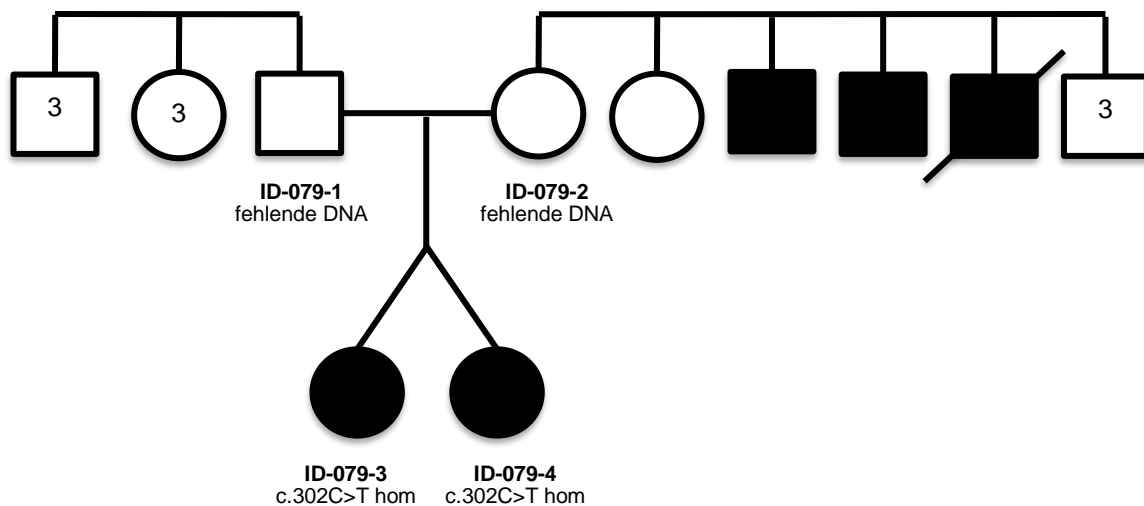


Abbildung 10: Stammbaum Familie ID-079

3.2. Neue Varianten in etablierten Genen

3.2.1. Familie ID-006

Die Familie ID-006 hat zwei gesunde Kinder und zwei erkrankte Kinder. Die Eltern sind blutsverwandt (Abb. 11). Der Patient ID-006-3 zeigt Intelligenzminderung sowie schwere globale Entwicklungsverzögerung, er begann erst mit drei Jahren zu laufen. Er zeigt außerdem ein aggressives Verhalten. Die Patientin ID-006-4 zeigt Intelligenzminderung und globale Entwicklungsverzögerung, sie begann mit zwei Jahren zu laufen und hat eine Sprachentwicklungsstörung. Des Weiteren zeigt sie eine Harninkontinenz und eine Sehbeeinträchtigung.

Bei der Patientin ID-006-4 wurde eine homozygote Frameshift-Variante c.2764del, p.Asp922Thrfs*75 im *KIAA0556*-Gen (ENST00000262502) identifiziert. Die Variante war zum Zeitpunkt der Datenauswertung in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank nicht gelistet. Varianten im *KIAA0556*-Gen wurden mit einem Joubert-Syndrom Typ 26 in Verbindung gebracht.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalyse zeigte die Variante in heterozygoter Form bei der Mutter sowie der ältesten gesunden Tochter und in homozygoter Form bei den beiden betroffenen Kindern.

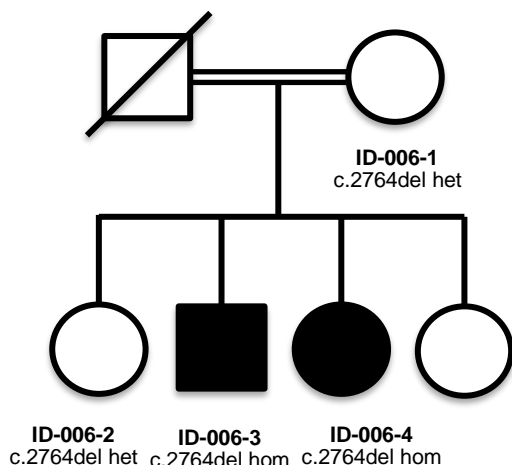


Abbildung 11: Stammbaum Familie ID-006

3.2.2. Familien ID-009 und ID-013

Die Familie ID-009 hat vier Kinder von denen zwei Töchter und ein Sohn erkrankt sind (Abb. 12). Die Patientin ID-009-3 zeigt Intelligenzminderung sowie schwere globale Entwicklungsverzögerung. Freies Laufen wurde im Alter von vier Jahren erlernt. Des Weiteren zeigt sie eine asymmetrische Körperentwicklung. Die Patientin ID-009-4 zeigt ebenfalls milde Intelligenzminderung sowie schwere globale Entwicklungsverzögerung. Freies Laufen wurde im Alter von zwei Jahren erlernt. Sie hat außerdem Krampfanfälle in der Krankheitsgeschichte und eine Sprachentwicklungsstörung mit verwaschener Aussprache. Der Patient ID-009-5 zeigt Intelligenzminderung und ebenfalls eine asymmetrische Körperentwicklung.

Bei der Patientin ID-009-4 wurde eine homozygote Missense-Variante c.3893G>A p.Arg1298Gln im *CENPJ*-Gen (ENST00000381884) identifiziert. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung nicht in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet. Sie führt zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure und wurden von den in-silico Prädiktionsprogrammen Sift und PolyPhen als pathogen beurteilt. Die Variante liegt in der T-complex protein 10 C-terminus Domäne, in der bisher auch eine weitere pathogene Missense-Variante beschrieben wurde (PMID: 15793586). Varianten im *CENPJ*-Gen wurden mit einer Mikrozephalie Typ 6 assoziiert. Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalyse zeigte die Variante in heterozygoter Form bei beiden Eltern und in homozygoter Form bei allen drei betroffenen Kindern.

3. Ergebnisse

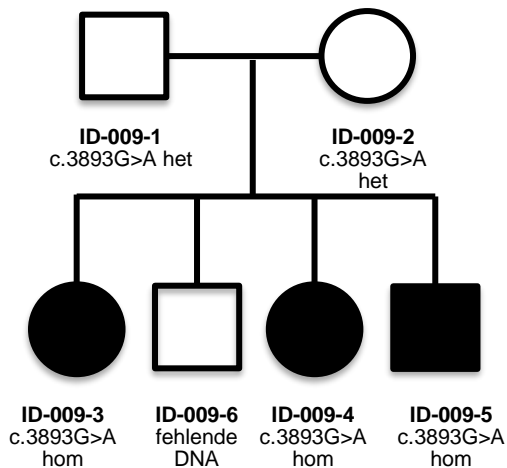


Abbildung 12: Stammbaum Familie ID-009

Die Familie ID-013 hat acht Kinder von denen die ältesten beiden Töchter erkrankt sind (Abb. 13). Die Eltern sind blutsverwandt. Die Patientin ID-013-1 und auch Patientin ID-013-3, weisen sowohl eine Intelligenzminderung, als auch eine Sprachentwicklungsstörung auf. Außerdem zeigen sie Verhaltensauffälligkeiten mit selbstverletzendem und aggressivem Verhalten. Sie haben beide Krampfanfälle in der Krankheitsgeschichte. Eine neurologische Bildgebung wurde bei den Patienten nicht durchgeführt.

Bei der Patientin ID-013-3 wurde dieselbe homozygote Missense-Variante c.3893G>A p.Arg1298Gln im *CENPJ*-Gen (ENST00000381884) wie auch bei Familie ID-013 identifiziert.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalyse zeigte die Variante in heterozygoter Form bei den zwei gesunden Kindern und in homozygoter Form bei beiden betroffenen Kindern.

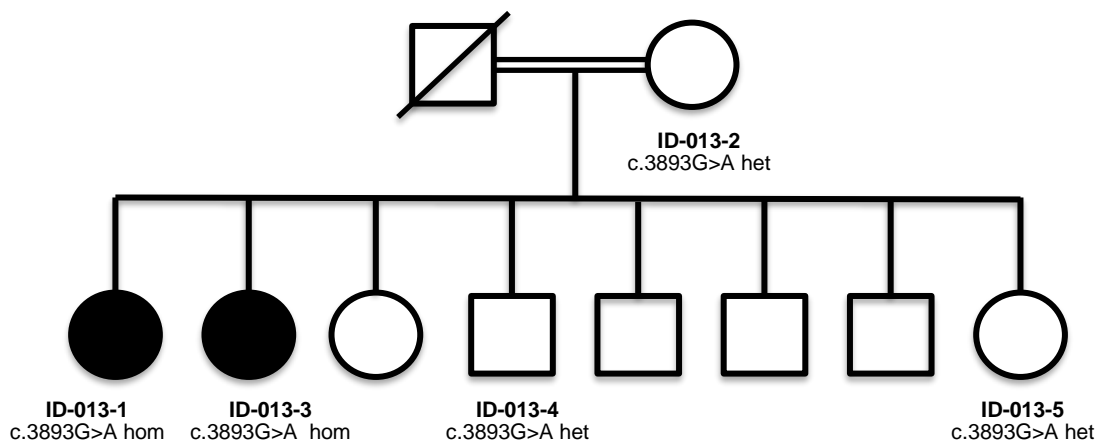


Abbildung 13: Stammbaum Familie ID-013

3.2.3. Familie ID-014

Die Familie ID-014 hat acht Kinder von denen drei Söhne erkrankt sind (Abb. 14). Der Patient ID-014-5 zeigt Intelligenzminderung sowie schwere globale Entwicklungsverzögerung. Freies Laufen wurde im Alter von vier Jahren erlernt und er hat eine Sprachentwicklungsstörung mit Störung der expressiven Sprache. Außerdem zeigt der Patient aggressives Verhalten und nächtliche Enuresis. Der Patient ID-014-3 hat eine Intelligenzminderung und eine schwere globale Entwicklungsverzögerung, hat jedoch gute verbale Fähigkeiten. Er zeigt ebenfalls aggressives Verhalten. Der Patient ID-014-4 zeigt Intelligenzminderung und eine schwere globale Entwicklungsverzögerung mit freiem Laufen im Alter von drei Jahren und Sprachentwicklungsverzögerung. Er hat außerdem Krampfanfälle in der Krankheitsgeschichte und eine Spastik der unteren Extremität.

Anhand der Exomdaten des Patienten ID-014-4 wurde die homozygote Stopp-Variante c.685C>T, p.Gln229* im *SPG20*-Gen (ENST00000355182) identifiziert. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung einmal in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet. Sie wurde vom *in-silico* Prädiktionsprogramm phyloP als hoch konserviert beurteilt. Bisher wurden fünf Missense-Varianten und kleine Deletionen im *SPG20*-Gen als krankheitsursächlich für ein Troyer-Syndrom, eine Form der autosomal-rezessiven Spastischen Paraplegie, beschrieben.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalyse zeigte die Variante in heterozygoter Form bei der Mutter und in homozygoter Form bei allen drei betroffenen Söhnen.

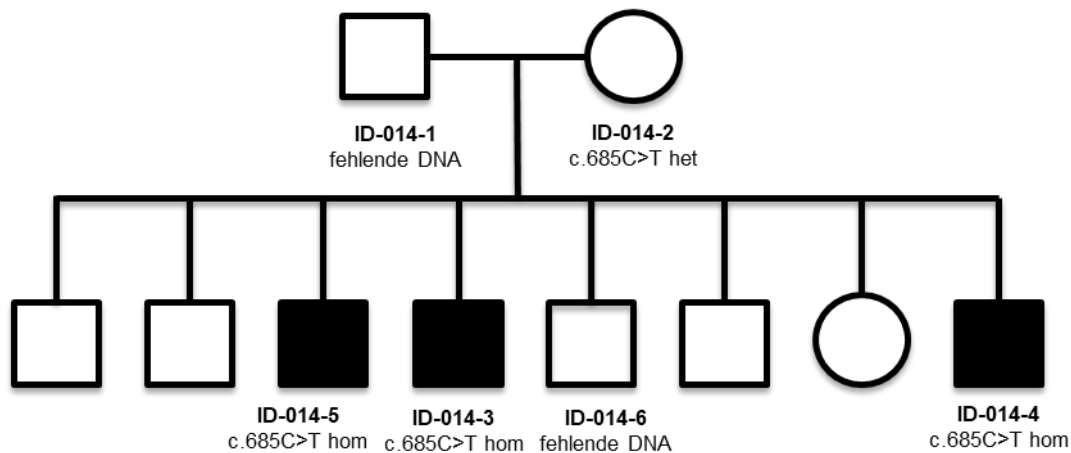


Abbildung 14: Stammbaum Familie ID-014

3.2.4. Familie ID-028

Die Familie ID-028 hat vier Kinder, die alle erkrankt sind (Abb. 15). Alle vier Patienten zeigen Intelligenzminderung und schwere globale Entwicklungsverzögerung. Sie erlernten das freie Laufen im Alter von fünf Jahren und haben eine Sprachentwicklungsverzögerung mit Störung der expressiven Sprache. Sie haben außerdem Krampfanfälle in der Krankheitsgeschichte, eine Sehbeeinträchtigung, und zeigen aggressives Verhalten. Die Patientin ID-028-3 leidet außerdem unter Hirsutismus und einem generalisierten Tremor. Die Patienten ID-028-4 und ID-028-5 hatten zusätzlich zu den oben beschriebenen Merkmalen noch multiple Frakturen in den Hand- und Fußknochen. Es wird vermutet, dass diese auf Grund von Osteoporose entstanden seien, eine sichere Diagnose wurde jedoch nicht gestellt. Der Patient ID-028-5 hat außerdem noch eine angeborene Ptosis.

Anhand der Exomdaten des Patienten ID-028-5 wurde die homozygote Missense-Variante c.2216G>A p.Cys739Tyr im *LAMA1*-Gen (ENST00000389658) als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung nicht in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet. Die Variante führt zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure und wurden von den in-silico Prädiktionsprogrammen Sift und PolyPhen als pathogen beurteilt. Varianten im

3. Ergebnisse

LAMA1-Gen wurden mit einem Poretti-Boltshauser-Syndrom in Verbindung gebracht.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Die Variante zeigte sich in heterozygoter Form bei beiden Eltern und in homozygoter Form bei allen vier betroffenen Kindern.

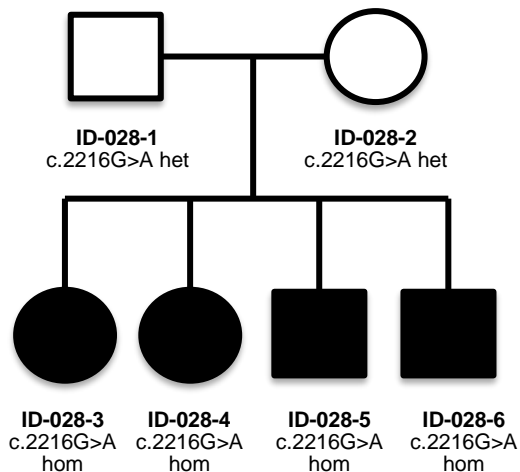


Abbildung 15: Stammbaum Familie ID-028

3.2.5. Familie ID-055

Die Familie ID-055 hat drei Kinder von denen zwei erkrankt sind. Die Eltern sind blutsverwandt (Abb. 16). Beide Patienten zeigen Intelligenzminderung und globale Entwicklungsverzögerung. Die Patientin ID-055-3 hat außerdem noch einen Nystagmus und leidet unter Harninkontinenz.

Durch Literaturrecherche und unter Berücksichtigung des klinischen Bildes des Patienten ID-055-3 wurde die homozygote Missense-Variante c.2999A>T p.Glu1000Val im *CC2D2A*-Gen als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung 5-mal in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet jedoch nur in heterozygoter Form. Die Variante führt zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure und wurden von dem in-silico Prädiktionsprogramm Sift als pathogen beurteilt. Varianten im *CC2D2A*-Gen (ENST00000503292) wurden mit einem Joubert-Syndrom Typ 9 in Verbindung gebracht.

3. Ergebnisse

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Die Variante zeigte sich in heterozygoter Form bei beiden Eltern sowie dem gesunden Sohn und zeigte sich in homozygoter Form bei beiden betroffenen Kindern.

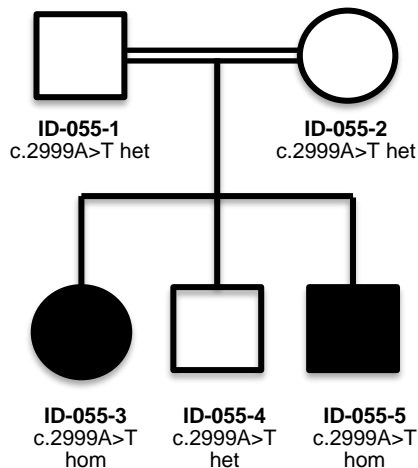


Abbildung 16: Stammbaum Familie ID-055

3.2.6. Familie ID-056

Die Familie ID-056 hatte sechs Kinder von denen ein Zwillingsspaar verstorben ist (Abb. 17). Von den übrigen vier Kindern sind zwei Töchter erkrankt, Patientin ID-056-3 und Patientin ID-056-5. Beide Töchter waren Frühgeburten und sind in der 31. bzw. 29. SSW geboren worden. Beide Patientinnen zeigen Intelligenzminderung, globale Entwicklungsverzögerung in der Krankheitsgeschichte, eine kongenitale Hüftluxation, Hörverlust, sowie Harn- und Stuhlinkontinenz. Sie sprechen beide kaum und halten keinen Augenkontakt.

Bei der Patientin ID-056-3 wurde die homozygote Stopp-Variante c.331C>T, p.Arg111* im *SNX14*-Gen (ENST00000503292) identifiziert. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung 6-mal in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet, jedoch nur in heterozygoter Form. Sie wurde vom *in-silico* Prädiktionsprogramm phyloP als hoch konserviert beurteilt. Varianten im *SNX14*-Gen wurden mit einer autosomal-rezessiven Spinozerebellärer Ataxie Typ 14 in Verbindung gebracht.

3. Ergebnisse

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalyse zeigte die Variante in heterozygoter Form bei beiden Eltern sowie dem gesunden Sohn und in homozygoter Form bei beiden betroffenen Kindern.

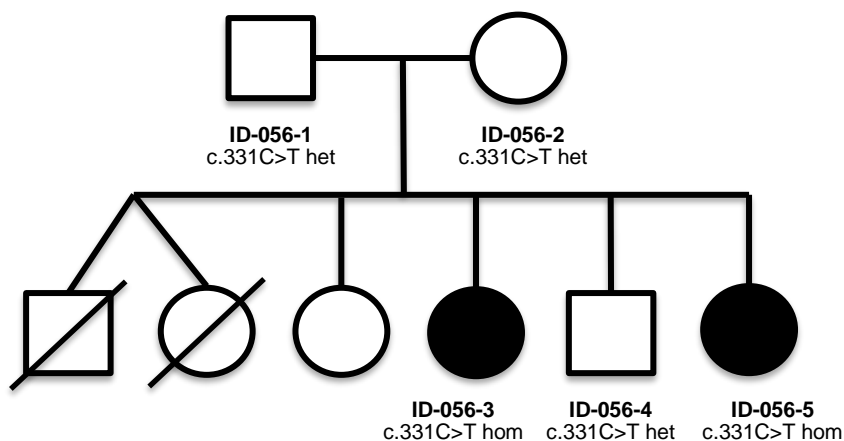


Abbildung 17: Stammbaum Familie ID-056

3.2.7. Familie ID-059

Die Familie ID-059 hat zehn Kinder von denen sechs betroffen sind. Die Eltern sind blutsverwandt (Abb. 18). Die Patienten ID-059-4, ID-059-6, ID-059-8, ID-059-9 zeigen Intelligenzminderung, Katarakt, sowie Krampfanfälle in der Krankengeschichte. Die Patientin ID-059-5 zeigt dieselbe Symptomatik, jedoch ist die Intelligenzminderung bei ihr schwer ausgeprägt. Die Patientin ID-059-7 zeigt ebenfalls dieselbe Symptomatik, allerdings mit nur leichter Intelligenzminderung.

Anhand der Exomdaten des Patienten ID-059-9 wurde die homozygote Missense-Variante c.413C>T p.Thr138Ile im *RDH11*-Gen identifiziert. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung 3-mal in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet jedoch nur in heterozygoter Form. Die Variante führt zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure und wurden von den in-silico Prädiktionsprogrammen Sift, und PolyPhen als pathogen beurteilt. Varianten im *RDH11*-Gen (ENST00000381346) wurden mit Netzhautdystrophie, juvenilen Katarakten und Kleinwuchs-Syndrom in Verbindung gebracht.

3. Ergebnisse

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Die Variante zeigte sich in heterozygoter Form bei beiden Eltern sowie der gesunden Tochter und in homozygoter Form bei allen fünf betroffenen Töchtern.

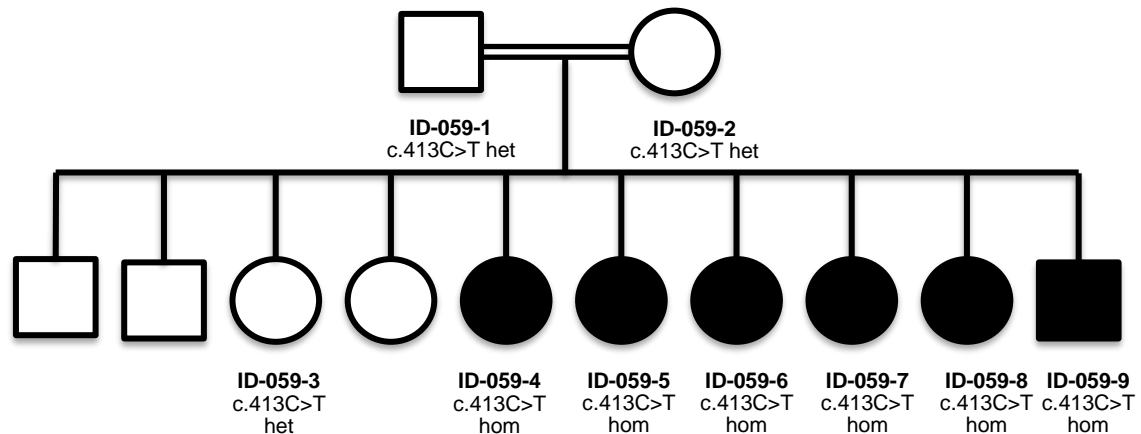


Abbildung 18: Stammbaum Familie ID-059

3.2.8. Familie ID-068

Die Familie ID-068 hat acht Kinder von denen drei erkrankt sind (Abb. 19). Eine Cousine väterlicherseits ist ebenfalls erkrankt. Leider stehen keine weiteren Informationen bezüglich des Phänotyps der Cousine zur Verfügung. Die Patientin ID-068-3 zeigt eine milde Intelligenzminderung mit leichter Einschränkung der verbalen Fähigkeiten. Der Patient ID-068-4 und der Patient ID-068-6 zeigen eine milde Intelligenzminderung sowie eine Gangstörung.

Bei der Patientin ID-068-3 wurde die homozygote Frameshift-Variante c.2080_2092del p.Ala694* im *GBA2*-Gen (ENST00000378094) als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung einmal in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet. Sie wurde vom *in-silico* Prädiktionsprogramm phyloP als hoch konserviert beurteilt. Varianten im *GBA2*-Gen wurden mit einer autosomal-rezessiven Spastischen Paraplegie Typ 46 in Verbindung gebracht.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalyse zeigte die Variante in heterozygoter Form bei der Mutter und in homozygoter Form bei allen drei betroffenen Kindern.

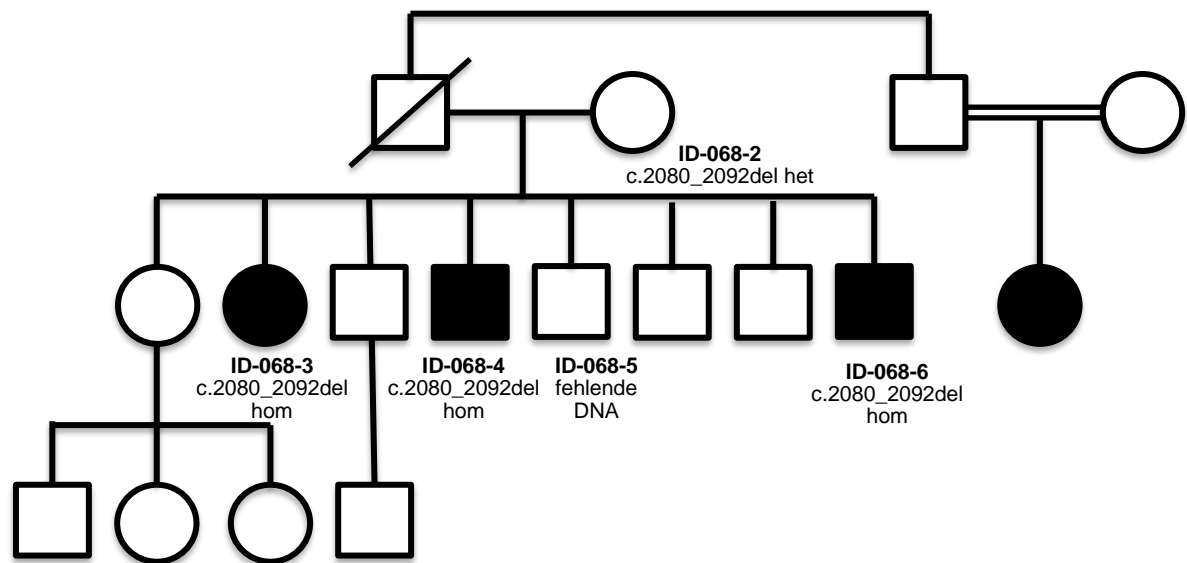


Abbildung 19: Stammbaum Familie ID-068

3.2.9. Familie ID-069

Die Familie ID-069 hat sechs Kinder von denen drei erkrankt sind (Abb. 20). Zwei Cousinen mütterlicherseits sind ebenfalls erkrankt und ein Großneffe des Vaters. Der Patient ID-069-3 zeigt Intelligenzminderung sowie globale Entwicklungsverzögerung mit schlechten verbalen Fähigkeiten. Er hat außerdem noch eine Sehbeeinträchtigung mit Nyktalopie und eine Harninkontinenz. Der Patient ID-069-4 zeigt Intelligenzminderung und globale Entwicklungsverzögerung. Der Patient ID-069-6 zeigt Intelligenzminderung und eine schwere globale Entwicklungsverzögerung. Das freie Laufen wurde im Alter von drei Jahren erlernt. Er hat eine Sehbeeinträchtigung und dysmorphische Gesichtszüge mit doppelter Lidfalte und Zustand nach Gaumenspalte, welche chirurgisch korrigiert wurden. Weitere Phänotyp Angaben zur den erkrankten Cousinen sowie des Großneffen des Vaters stehen leider nicht zur Verfügung.

Durch Literaturrecherche und unter Berücksichtigung des klinischen Bildes des Patienten ID-069-6 wurde die homozygote Frameshift-Variante c.9252dupT p.Thr3085yrfs*5 im *VPS13B*-Gen (ENST00000357162) als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung nicht in den

3. Ergebnisse

silico Prädiktionsprogrammen Sift und PolyPhen als pathogen beurteilt. Varianten im *PC*-Gen wurden mit einem Pyruvatcarboxylase-Mangel in Verbindung gebracht.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalyse zeigte die Variante in heterozygoter Form bei beiden Eltern und in homozygoter Form bei beiden betroffenen Söhnen. Der gesunde Sohn zeigte Wildtyp Allele.

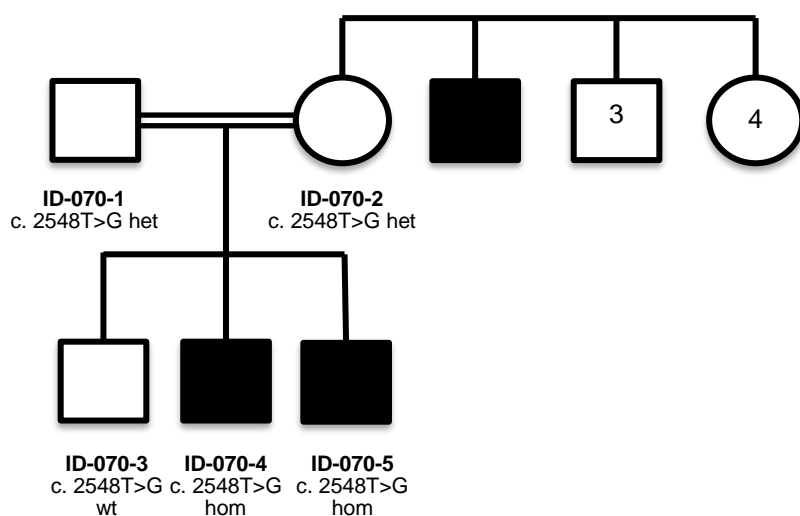


Abbildung 21: Stammbaum Familie ID-070

3.3. Kandidatengene

3.3.1. Familie ID-001

Die Familie ID-001 hat zwei erkrankte und zwei gesunde Kinder (Abb. 22). Die Patientin ID-001-3 zeigt Intelligenzminderung, globale Entwicklungsverzögerung sowie Gingivahyperplasie. Der Patient ID-001-4 zeigt Intelligenzminderung und schwere globale Entwicklungsverzögerung; freies Laufen wurde erst im Alter von sechs Jahren begonnen. Des Weiteren spricht er kaum und eine verbale Kommunikation ist nicht möglich. Er hält keinen Augenkontakt. Er leidet unter einer leichten Spastik sowie stereotypischen Bewegungen der Hände.

Das Exom des Patienten ID-001-3 wurde angereichert und sequenziert. Dabei wurden 62.421 Varianten identifiziert wovon 813 Varianten nicht oder mit einer

3. Ergebnisse

Frequenz von weniger als 0,1% in den öffentlichen Datenbanken 1000 Genomes und gnomAD vorlagen und höchstens 5 Allele in der hauseigenen Datenbank annotiert waren. Bereits in-house als pathogen oder wahrscheinlich pathogen markierte Varianten wurden hierbei nicht herausgefiltert. Von diesen Varianten waren 285 funktionell relevant. Unter Berücksichtigung eines rezessiven Erbgangs konnten die Varianten weiter gefiltert werden und es blieben 30 Varianten (Anhang 1). Durch Literaturrecherche und unter Berücksichtigung des klinischen Bildes des Patienten wurde die homozygote Frameshift-Variante c.1217_1220del p.His406fs*8 im *SYNJ2*-Gen (ENST00000355585) als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung 2-mal in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet, jedoch nur in heterozygoter Form. Sie wurde vom in-silico Prädiktionsprogramm PhyloP als hoch konserviert beurteilt.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalyse zeigte die Variante in heterozygoter Form bei der Mutter sowie der gesunden Tochter und in homozygoter Form bei beiden betroffenen Kindern.

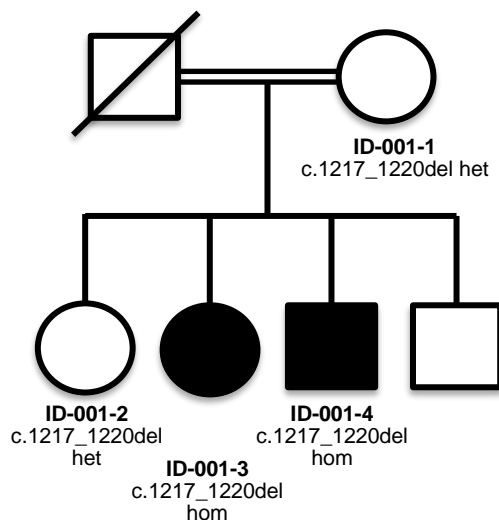


Abbildung 22: Stammbaum Familie ID-001

3.3.2. Familie ID-061

Die Familie ID-061 hat acht Kinder von denen drei erkrankt sind sowie einen erkrankten Enkelsohn (Abb. 23). Die Eltern sind blutsverwandt. Der Patient ID-

061-3 präsentiert mit Intelligenzminderung sowie schwerer globaler Entwicklungsverzögerung, das Sitzen oder Krabbeln wurde nie erreicht. Er gibt durchgehend vage Geräusche von sich, zeigt jedoch kein Sprachvermögen. Der Patient hat außerdem eine Harn- und Stuhlinkontinenz. Seine Schwester, die Patientin ID-061-5, zeigt ebenfalls eine Intelligenzminderung begleitet von einer Zerebralparese. Sie hat außerdem eine Dysplasie des Skelettes mit Skoliose und hat ebenfalls eine Harn- und Stuhlinkontinenz. Zum erkrankten Enkelsohn gibt es keine genaueren Phänotypangaben und auch über den Vater des Enkels stehen keine Informationen zur Verfügung.

Das Exom des Patienten ID-061-3 wurde angereichert und sequenziert. Dabei wurden 61.339 Varianten identifiziert wovon 729 Varianten nicht oder mit einer Frequenz von weniger als 0,1% in den öffentlichen Datenbanken 1000 Genomes und gnomAD vorlagen und höchstens 5 Allele in der hauseigenen Datenbank annotiert waren. Bereits in-house als pathogen oder wahrscheinlich pathogen markierte Varianten wurden hierbei nicht herausgefiltert. Von diesen Varianten waren 237 funktionell relevant. Unter Berücksichtigung eines rezessiven Erbgangs konnten die Varianten weiter gefiltert werden und es blieben 22 Varianten (Anhang 2). Durch Literaturrecherche und unter Berücksichtigung des klinischen Bildes des Patienten wurde die homozygote Frameshift-Variante c.407_408del p.Lys136Serfs*16 im *TTC5*-Gen (ENST00000258821) als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante wurde zum Zeitpunkt der Datenauswertung nicht in den 276.000 Allelen der gnomAD Datenbank beobachtet. Sie wurde vom in-silico Prädiktionsprogramm PhyloP als hoch konserviert beurteilt.

Die Variante konnte mittels Sanger Sequenzierung validiert werden. Segregationsanalyse zeigte die Variante in heterozygoter Form bei beiden Eltern und in homozygoter Form beim betroffenen Sohn und der betroffenen Tochter.

3. Ergebnisse

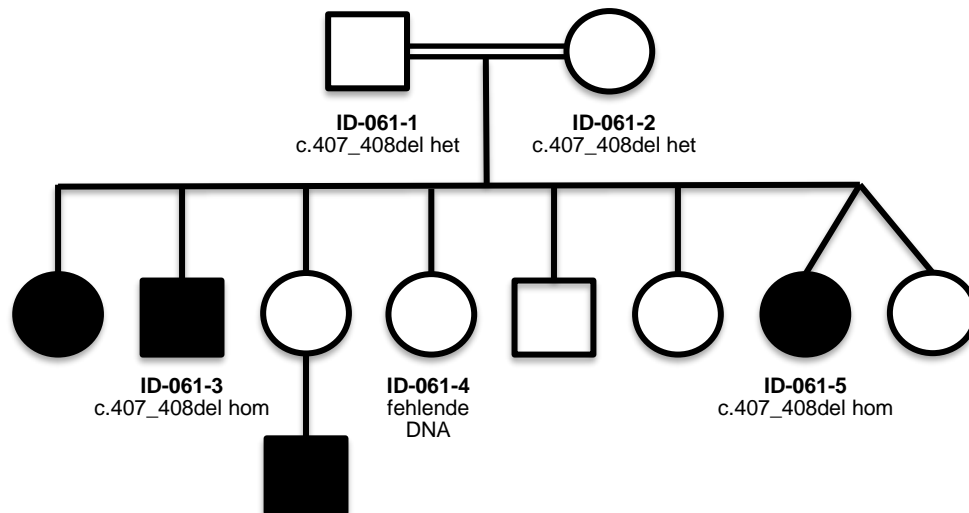


Abbildung 23: Stammbaum Familie ID-061

3.4. Ungelöste Fälle

In 57 Familien (74%) wurden keine pathogenen oder wahrscheinlich pathogenen Varianten identifiziert und diese Fälle bleiben zum jetzigen Standpunkt ungelöst. Von diesen 57 Familien waren 15 konsanguin und 42 nicht-konsanguin. In 19 der 57 Familien zeigten die betroffenen Kinder neurologische Symptome zusätzlich zu einer Entwicklungsverzögerung. Diese beinhalteten Epilepsie, Stereotypien, Ataxie, Spastik und Hypotonie. In einer Familie ging die Entwicklungsverzögerung auch mit einer Mikrozephalie einher, die Anzahl an Familien mit mikrozephalen Kindern könnte jedoch auch höher sein. Die Anamnesen und Stammbäume der Familien waren oft unvollständig, Geburtsdaten fehlen bei der Mehrheit der Patienten und ein Erkrankungsbeginn wurde nie angegeben. Wiederholtes Nachfragen von Seitens des Instituts für medizinische Genetik und angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen brachte keine genaueren Angaben.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden 77 iranische Familien mit Intelligenzminderung und Entwicklungsverzögerung untersucht. In 7 Familien wurden in der Literatur bereits vorbeschriebene Varianten in den Genen *PAH*, *B4GALNT1*, *SCN1A*, *UBE3A*, *L2HGDH*, sowie *AGA* identifiziert. In 11 weiteren Familien wurden bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Varianten in den bereits etablierten Genen *KIAA0556*, *CENPJ*, *SPG20*, *LAMA1*, *CC2D2A*, *SNX14*, *RDH11*, *GBA2*, *VPS13B* und *PC* identifiziert. Außerdem wurden Varianten in 2 neuen bisher gar nicht oder erst einmal beschriebenen Genen *SYNJ2* und *TTC5* entdeckt. Zusammengerechnet wurde bei 20 aus 77 Familien, also 26% aller Familien, eine molekulargenetische Diagnose gestellt. Dies ist vergleichbar mit einer Lösungsquote von 27% in einer Studie mit 118 Patienten aus Familien mit konsanguinen Ehen (Dixon-Salazar et al., 2012). In einer weiteren Studie mit 38 Patienten mit Intelligenzminderung und Mikrozephalie wurde eine Lösungsquote von 29% erreicht und in einer Studie mit konsanguinen Familien aus Katar wurde eine diagnostische Ausbeute von 25% erreicht (Rump et al., 2016, Fahiminiya et al., 2014). In einer weiteren Studie mit Patienten, die an einem breiten Spektrum von hauptsächlich neurologischen Erkrankungen leiden, wurde mittels Whole Genome Sequenzierung eine Lösungsquote von 25% erreicht (Yang et al., 2013).

Verschiedene Faktoren könnten verbessert werden, um eine höhere Lösungsquote zu erreichen. Beispielsweise könnte ein höherer Anteil an konsanguinen Familien hierzu beitragen, da autosomal-rezessiv Erkrankungen deutlich häufiger in konsanguinen Familien zu erwarten sind. Auch eine detailliertere Beschreibung des Phänotyps der betroffenen Patienten mit genauen HPO Angaben würde bei der Identifizierung von krankheitsursächlichen Varianten helfen. Bei der Auswahl an Patienten für die Studie wäre auch eine detailliertere Anamnese und Krankengeschichte mit Angaben zur Schwangerschaft und Geburt ein wichtiger Faktor, da prä- und perinatale Faktoren wie Hypoxie, Exposition zu toxischen Substanzen und Infektionskrankheiten auch Ursachen der Intelligenzminderung sein können und

vorab ausgeschlossen werden sollten (Ropers, 2010). Auch weitere klinische Angaben wie CT- und MRT-Bildgebungen des Schädels wären bei der Interpretation der identifizierten Varianten behilflich.

Das Hauptaugenmerk dieser Studie lag in der Entdeckung autosomal-rezessiver Ursachen der Intelligenzminderung, da in allen Familien mindestens zwei der Kinder erkrankt sind. Doch auch dominante *de novo* Varianten, polygenetische Vererbung, oder epigenetische Veränderungen sind ebenfalls mögliche Ursachen der Intelligenzminderung. In einer Kohorte bestehend aus Familien mit mehreren betroffenen Kindern sind sie jedoch selten zu erwarten (Hu et al., 2019). In dieser Studie wurde in nur einer Familie eine kausale heterozygote Variante identifiziert. Hierbei handelt es sich um eine Frameshift-Variante im *SCN1A*-Gen. Bei den betroffenen Kindern der Familie handelt es sich um Zwillingmädchen. Da jedoch nur bei einem der beiden Mädchen eine Exomsequenzierung durchgeführt wurde, kann keine Aussage über eine mögliche Eineiigkeit der Zwillinge gemacht werden. Auch ein parentales Keimbahnmosaik wäre eine mögliche Erklärung für die identifizierte heterozygote Variante.

Jede der gefundenen Varianten segregierte jeweils nur in einer Familie mit Ausnahme einer Variante im *CENPJ*-Gen sowie einer Variante im *PAH*-Gen, welche sich in der Familie ID-050 in homozygoter Form fand und in der Familie ID-019 in compound-heterozygoter Form zusammen mit einer weiteren Missense-Variante fand. Dies unterstützt die bereits in anderen Studien gesammelten Ergebnisse zur phänotypischen und genetischen Heterogenität sowie intrafamiliärer ätiologischer Heterogenität der autosomal-rezessiven Intelligenzminderung (Santos-Cortez et al., 2018, Regie Lyn P. Santos - Cortez and Muhammad Arif Nadeem Saqib, 2018). Die Phenylketonurie wird in entwickelten Ländern wie Deutschland bereits im Neugeborenen-Screening diagnostiziert und frühzeitig behandelt. Die Diagnose der Phenylketonurie mittels NGS zu stellen, ist somit in Deutschland eine Seltenheit. Schwere Verläufe wie die der beschriebenen Familien ID-019 und ID-050 sind in Deutschland heutzutage kaum zu finden. Demnach gibt es auch wenige Daten zu den Vorteilen eines Therapiebeginns im Erwachsenenalter.

Studien zeigen jedoch, dass eine phenylalaninarme Diät auch im Erwachsenenalter die Konzentrationsfähigkeit und Stimmung der Patienten positiv beeinflusst (ten Hoedt et al., 2011). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass hohe Phenylalaninkonzentrationen im Serum auch im Erwachsenenalter zu verminderter zerebraler Proteinsynthese führt (Hoeksma et al., 2009). In einer Studie mit 88 an Phenylketonurie leidenden Erwachsenen konnte in 46% der Patientin eine positive Besserung der Stimmung, Konzentrationsfähigkeit und neurologischen Symptome nach Beginn einer phenylalaninarmen Diät gezeigt werden (Yannicelli and Ryan, 1995).

4.1. Neue Varianten

In den Genen *KIAA0556*, *CENPJ*, *SPG20*, *LAMA1*, *CC2D2A*, *SNX14*, *RDH11*, *GBA2*, *VPS13B* und *PC* wurden neue bisher nicht beschriebene Varianten identifiziert.

KIAA0556 kodiert für ein Mikrotubulus-assoziiertes Ziliarbasisprotein (Sanders et al., 2015). Varianten im *KIAA0556*-Gen wurden mit einem Joubert-Syndrom Typ 26 in Verbindung gebracht. Bisher sind in der Literatur vier pathogene Varianten im *KIAA0556*-Gen beschrieben, zwei Stopp-Varianten und zwei Frameshift-Varianten. Die beschriebenen Patienten leiden unter einer globalen Entwicklungsverzögerung begleitet von Hypotonie und weiteren variablen phänotypischen Merkmalen (Sanders et al., 2015). In der Familie ID-006 wurde die homozygote Frameshift-Variante c.2764del, p.Asp922Thrfs*75 identifiziert. Die Geschwister ID-006-3 und ID-006-4 leiden ebenfalls unter einer globalen Entwicklungsverzögerung. Die Patientin ID-006-4 leidet außerdem noch unter einer Sehbeeinträchtigung unklarer Ursache. Da das Joubert-Syndrom oft mit einer Retinadystrophie einhergeht, ist diese als Ursache der Sehbeeinträchtigung der Patientin sehr wahrscheinlich. Ein MRT des Schädels zur Darstellung der für das Joubert-Syndrom typischen „molar-tooth“ Konfiguration, bei der die oberen Kleinhirnstiele elongiert und zum Hirnstamm rechtwinklig eingestellt sind, wurde nicht durchgeführt. Die Therapie des Joubert-Syndrom besteht aus pädagogischen Förderprogramme sowie Physio-, Ergo- und Sprachtherapie.

CENPJ kodiert ein zentrosomales Protein mit einer Rolle bei der Regulierung der Mikrotubuli-Anordnung (Hung et al., 2004). Diese wird in der Literatur mit dem Auftreten einer Mikrozephalie und Intelligenzminderung beschrieben (Gul et al., 2006). In den Familien ID-009 und ID-013 wurde die homozygote Missense-Variante c.3893G>A p.Arg1298Gln identifiziert. Die Patientinnen ID-009-4, ID-013-1 und ID-013-3 leiden unter Krampfanfällen, welche bisher nicht im Zusammenhang mit Varianten im *CENPJ*-Gen beschrieben sind. Die Patienten ID-009-3 und 009-5 weisen außerdem eine asymmetrische Körperentwicklung auf. Diese ist durch die identifizierte Variante nicht zu erklären und es ist möglich, dass dem eine weitere pathogene Veränderung zugrunde liegt. Bei Patienten mit zusätzlichen Symptomen außerhalb des üblichen phänotypischen Spektrums der ursprünglich diagnostizierten genetischen Erkrankung, sollte das Vorhandensein einer möglichen unabhängigen Ursache in Betracht gezogen werden (Kumar et al., 2014). Vor allem in konsanguinen Familien sollte die Möglichkeit zweier autosomal-rezessiver Erkrankungen in Erwägung gezogen werden (Lal et al., 2016). Ungewöhnliche klinische Zusatzmerkmale einer bestimmten Krankheit, wie die in Familie ID-009 beschriebene asymmetrische Körperentwicklung, könnten darauf zurück zu führen sein, dass bei den Patienten zwei verschiedene monogenetische Erkrankungen vorliegen.

SPG20 kodiert das Protein Spartin, wessen Funktion noch nicht ganz erforscht ist. Spartin soll am endosomalen Transport, an der Mikrotubulardynamik oder an beiden Funktionen beteiligt sein (Bakowska et al., 2007). Bisher wurden fünf Missense-Varianten und kleine Deletionen im *SPG20*-Gen als krankheitsursächlich für ein Troyer-Syndrom, eine Form der autosomal-rezessiven Spastischen Paraplegie, beschrieben. Die beschriebenen Patienten zeigen einen Kleinwuchs, globale Entwicklungsverzögerung, eine spastische Gangstörung sowie Dysmetrie und Dysarthrie (Bakowska et al., 2008). Bei der Familie ID-014 wurde die homozygote Stopp-Variante c.685C>T, p.Gln229* identifiziert. Die betroffenen Söhne der Familie ID-014 leiden ebenfalls unter einer globalen Entwicklungsverzögerung sowie einer Spastik. Auch die bei zwei der Brüder beobachtete Sprachstörung sowie aggressives Verhalten passt ins

phänotypische Spektrum der Erkrankung. Die beim Patienten ID-014-4 beschriebenen Krampfanfälle wurden jedoch bisher nicht mit einem Troyer-Syndrom in Verbindung gebracht und könnten eine andere Ursache haben. Antispastische Medikamente, Physio- und Sprachtherapie können helfen die Symptome des Troyer-Syndroms zu lindern. Betroffene Patienten haben meist eine hohe Lebenserwartung, die der gesunden Bevölkerung entspricht. Die Patientin werden jedoch meist ab dem 50. bis 60. Lebensjahr rollstuhlpflichtig.

LAMA1 kodiert für eine der Alpha 1-Untereinheiten von Laminin, einem Hauptbestandteil der Basalmembran (Nissinen et al., 1991). Varianten im *LAMA1*-Gen wurden mit einem Poretti-Boltshauser-Syndrom in Verbindung gebracht, welches durch zerebelläre Dysplasie, zerebelläre Vermis-Hypoplasie, zerebellären Zysten, Myopie, Netzhautdystrophie und Okkulomotorikstörungen gekennzeichnet ist (Poretti et al., 2014, Aldinger et al., 2014). Die beschriebenen Patienten zeigen eine globale Entwicklungsverzögerung mit Intelligenzminderung und Sprachentwicklungsverzögerung. Sie sind hypoton und leiden oft unter einer Ataxie. Zusätzlich zeigen alle beschriebenen Patienten eine Form der Retinadysplasie (Poretti et al., 2014, Aldinger et al., 2014). In der Familie ID-028 wurde die homozygote Missense-Variante c.2216G>A p.Cys739Tyr identifiziert. Die Geschwister der Familie ID-028 leiden ebenfalls unter einer globalen Entwicklungsverzögerung mit Intelligenzminderung und Sprachentwicklungsverzögerung. Eine Bildgebung des Schädels wurde nicht durchgeführt. Sie leiden alle unter einer Sehbeeinträchtigung, genaue ophthalmologische Untersuchungsergebnisse lagen zum Zeitpunkt der Studie jedoch nicht vor. Dennoch sprechen die phänotypischen Angaben der betroffenen Geschwister für eine klinische Relevanz der identifizierten Variante. Da bislang wenige Patienten mit pathogenen Varianten im *LAMA1*-Gen beschrieben wurden und die ersten Berichte aus dem Jahr 2014 stammen, gibt es momentan keine Angaben zur Prognose der Erkrankung. Auch der Schweregrad der Erkrankung variiert stark zwischen Patienten.

CC2D2A kodiert eine Komponente eines Proteinkomplexes im Basalkörper, welcher für die normale Zilienfunktion benötigt wird (Chih et al., 2011). Varianten in diesem Gen wurden mit einem Joubert-Syndrom Typ 9 in

Verbindung gebracht. Das Joubert-Syndrom Typ 9 ist durch Retinitis pigmentosa, Nystagmus, Intelligenzminderung und Krampfanfälle gekennzeichnet (Noor et al., 2008). Bei der Familie wurde die homozygote Missense-Variante c.2999A>T p.Glu1000Val identifiziert. Die Geschwister der Familie ID-055 leiden unter einer Intelligenzminderung und Entwicklungsverzögerung. Die Patientin ID-055-3 zeigt außerdem noch unter einen Nystagmus, welcher zum phänotypischen Spektrum des Joubert-Syndroms Typ 9 passt. Auch in dieser Familie konnte die für das Joubert-Syndrom typische „molar tooth“ Konfiguration nicht nachgewiesen werden, da keine MRT Aufnahmen vorlagen.

SNX14 kodiert für das Enzym Sorting Nexin 14, welches an der Sortierung von Endosomen beteiligt ist (Teasdale et al., 2001). Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 14 ist durch eine schwere psychomotorische Entwicklungsverzögerung mit schlechter oder fehlender Sprache, Ataxie und Kleinhirnatrophie gekennzeichnet (Sousa et al., 2014). Bei der Familie ID-056 3 wurde die homozygote Stopp-Variante c.331C>T, p.Arg111* im *SNX14*-Gen identifiziert. Die betroffenen Schwestern der Familie ID-056 leiden wie beschriebene Patienten unter einer Intelligenzminderung und globaler Entwicklungsverzögerung. Sie sprechen beide kaum und halten keinen Augenkontakt. Die Schwestern leiden unter einem Hörverlust und auch eine Innenohrschwerhörigkeit wurde in etwa ein Drittel der Patienten in der Literatur beschrieben (Thomas et al., 2014). Es existiert bislang keine spezifische Therapie für die spinozerebelläre Ataxie und die meisten Patienten werden im Laufe ihres Lebens rollstuhlpflichtig.

RDH11 kodiert für die Retinol-Dehydrogenase 11, welche eine oxidoreduktive Funktion im Sehzyklus hat (Haeseleer et al., 2002). Bisher wurden in der Literatur zwei Stopp-Varianten im *RDH11*-Gen in compound-heterozygoter Form mit einem Netzhautdystrophie, juvenilen Katarakten und Kleinwuchs-Syndrom in Verbindung gebracht (Xie et al., 2014). Die von Xie *et al.* beschriebene Familie leidet unter einer Netzhautdystrophie, Kleinwuchs, juvenilem Katarakt und einer globalen Entwicklungsverzögerung. Zusätzlich wurde in einem weiteren Paper eine Insertion von einer Base in einem

Patienten mit Intelligenzminderung identifiziert (Hu et al., 2019). In der Familie ID-059 wurde die homozygote Missense-Variante c.413C>T p.Thr138Ile identifiziert. Die betroffenen Geschwister der Familie ID-059 leiden alle unter einer Intelligenzminderung, Krampfanfällen sowie einem Katarakt. Über die Körpergröße der Geschwister gibt es keine Angaben.

GBA2 kodiert für eine mikrosomale Beta-Glukosidase, einem Enzym des Sphingolipid-Metabolismus, das in Strukturkomponenten der Plasmamembran eine Rolle spielt und als Grundlage für viele Mediatoren der Zellsignalisierung dient (Martin et al., 2013). Die Spastische Paraplegie Typ 46 ist durch eine langsam fortschreitende spastische Paraplegie und Kleinhirnsymptomatik im Kindesalter gekennzeichnet (Boukhris et al., 2008). Einige Patienten haben außerdem noch kognitive Beeinträchtigungen (Martin et al., 2013). Bei der Familie ID-068 wurde die homozygote Frameshift-Variante c.2080_2092del p.Ala694* identifiziert. Die Patientin ID-068-3 leidet unter einer milden Intelligenzminderung mit leichter Einschränkung der verbalen Fähigkeiten. Ihre Brüder ID-068-4 und ID-068-6 zeigen eine milde Intelligenzminderung sowie eine Gangstörung, welche in das phänotypische Bild einer spastischen Paraplegie passt. Wie auch beim Troyer-Syndrom besteht die Therapie aus antispastischen Medikamenten, Physio- und Sprachtherapie.

VPS13B spielt eine Rolle bei der Vesikel-vermittelten Proteinsortierung und dem intrazellulären Proteintransport (Kolehmainen et al., 2003). Das Cohen-Syndrom ist eine Multisystemerkrankung, die durch zahlreiche klinische Merkmale gekennzeichnet ist, darunter Gesichtsdysmorphien, Mikrozephalie, Fettleibigkeit, Intelligenzminderung und progressive Retinopathie (Chandler et al., 2003) sowie Nyktalopie. In der Familie ID-069 wurde die homozygote Frameshift-Variante c.9252dupT p.Thr3085yrfs*5 identifiziert. Die phänotypischen Merkmale der Erkrankung der Familie ID-069 stimmen mit denen beschriebener Patienten überein. Die Therapie des Cohen-Syndroms zielt auf die Behandlung individueller Symptome und der Verbesserung der Lebensqualität ab.

PC kodiert ein Pyruvatkarboxylase, einem Enzym, das die Umwandlung von Pyruvat zu Oxaloacetat katalysiert. Dieser Prozess ist essentiell für die

Glukoneogenese, Lipogenese und Neurotransmittersynthese (Jitrapakdee et al., 2006). Der Pyruvatcarboxylase-Mangel ist eine seltene Stoffwechselstörung, die durch eine globale Entwicklungsverzögerung und wiederkehrende Krampfanfälle ab der Neugeborenen Periode gekennzeichnet ist (Carbone et al., 1998). Bei der Familie ID-070 wurde die homozygote Missense-Variante c.2548T>G p.Cys850Gly identifiziert. Auch die betroffenen Brüder der Familie ID-070 leiden unter einer schweren globalen Entwicklungsverzögerung und Intelligenzminderung. Über mögliche Krampfanfälle der Brüder sind jedoch keine Informationen bekannt. Die Prognose des Pyruvatcarboxylase-Mangels ist ungünstig. Eine Therapie gibt es zum jetzigen Zeitpunkt nicht und ein Großteil der betroffenen Patienten verstirbt im Kindesalter.

4.2. Kandidatengene

Bei der Suche nach neuen Kandidatengen wurden zwei Varianten in potenziellen Kandidatengen *TTC5* und *SYNJ2* identifiziert.

TTC5-Gen: In der Familie ID-061 wurde eine homozygote Frameshift-Variante im *TTC5*-Gen identifiziert. *TTC5* kodiert für ein Adapterprotein, das fast ausschließlich aus einer Tandemserie von Tetratricopeptid-Repeat-Motiven (TPR) besteht (Lamb et al., 1995). Proteine, die TPR-Motive enthalten, wirken in verschiedenen physiologischen Prozessen, einschließlich des Zellzyklus, der Transkription und der Stressantwort, wo sie üblicherweise als integrale Komponenten von Multiproteinkomplexen auftreten (Xiong et al., 2013). *TTC5* stellt eine stressabhängige Komponente des p300-CBP-Koaktivator-Komplexes dar und reguliert und vermittelt dessen Zusammenbau. Es erleichtert die Interaktion zwischen JMY und p300 und erhöht die p53-abhängige Transkription (Demonacos et al., 2001). Als Reaktion auf Stress erleichtert *TTC5* außerdem die p53-Aktivität, indem es die Herunterregulierung von p53 durch E3-Ubiquitin-Protein-Ligase MDM2 verhindert (Demonacos et al., 2001). Varianten in den Genen *p300* und *CBP*, die für die zwei Koaktivator-Komponenten des Komplexes kodieren, sind mit einem Rubinstein-Taybi-Syndrom assoziiert worden (Roelfsema et al., 2005). Das Rubinstein-Taybi-

Syndrom ist ein komplexes Syndrom gekennzeichnet durch Intelligenzminderung, postnatale Wachstumsverzögerung, Mikrozephalie und fazialen Dysmorphien (Rubinstein and Taybi, 1963). Im *TTC5*-Gen wurden bisher erst zwei Varianten in einer Publikation von Hu *et al.* 2018 als möglicherweise pathogen beschrieben. Bei Patient III:1 aus der Familie G033 wurde die Frameshift-Variante c.599del p.Pro200Leufs*29 identifiziert. Der Patient erlernte das Krabbeln im Alter von 3½ Jahren, erlernte jedoch nie das freie Sitzen oder Laufen. Der Patient zeigt eine schwere Hypotonie seit der frühen Kindheit und leidet unter einer spastischen Bewegungsstörung. Er spricht weniger als 10 gezielte 2-Silben Wörter und leidet unter einer schweren Intelligenzminderung. Bei den Patienten III:2 und III:3 aus Familie M9200013 wurde die Spleiß-Variante c.51+1G>A identifiziert. Der Patient III:2 erlernte nie das freie Sitzen, Stehen oder Laufen. Sein Sprachvermögen beschränkt sich auf unverständliche Laute. Der Patient leidet ebenfalls unter einer schweren Intelligenzminderung. Die Patientin III:3 erlernte auch nie das freie Sitzen, Stehen oder Laufen und spricht nur wenige 1-Silben Wörter. Ihr MRT zeigte eine Agenesie des Corpus Callosum, leichte Ventrikulomegalie, bifrontoparietale Atrophie und leichte Leukodystrophie (Hu *et al.*, 2019). Die phänotypischen Merkmale der drei beschriebenen Patienten stimmen stark mit denen der Familie ID-061 überein. Der Patient ID-061-3 erlernte nie das Krabbeln, freie Sitzen, Stehen oder Laufen. Sein Sprachvermögen beschränkt sich ebenfalls auf unverständliche Laute und er leidet auch unter einer schweren Intelligenzminderung. Seine Schwester, ID-061-5, zeigt Symptome ähnlich einer spastischen Zerebralparese. Sie ist auch intelligenzgemindert und leidet außerdem noch unter einer Skoliose. Mit der Identifizierung der beschriebenen Frameshift-Variante in der Familie ID-061 wurde nun bereits eine dritte Familie mit trunkierender *TTC5*-Variante identifiziert. Dieser Fakt, zusammen mit den stark überlappenden phänotypischen Ausprägungen der Erkrankungen der drei Familien, spricht stark für den pathogenen Effekt trunkierender *TTC5*-Varianten. Die phänotypischen Merkmale der drei Patienten überlappen auch teilweise mit denen des Rubinstein-Taybi-Syndroms in Hinblick auf eine Intelligenzminderung, stark eingeschränkte expressive

Sprachentwicklung, sowie motorische Entwicklungsverzögerung und muskuläre Hypotonie. Auch die bei der Patientin III:3 aus Familie M9200013 beschriebene Agenesie des Corpus Callosum wurde in Patienten mit Rubinstein-Taybi-Syndrom beschrieben. Weitere Übereinstimmungen in Hinblick auf verschiedene Dysmorphien sind ebenfalls möglich aber aufgrund fehlender Phänotyp-Angaben bei der Familie ID-061 konnten keine weiteren Parallelen identifiziert werden.

SYNJ2-Gen: In der Familie ID-001 wurde eine homozygote Frameshift-Variante im *SYNJ2*-Gen identifiziert. Varianten im *SYNJ2*-Gen wurden bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Das *SYNJ2*-Gen kodiert für Synaptojanin 2, einem Mitglied der Synaptojaninfamilie, welche Phosphoinositid 5-Phosphatasen umfasst, die eine Schlüsselrolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose der synaptischen Vesikel an der Synapse spielen und an der Aktin-Dynamik beteiligt sind (Planchart, 2013). Synaptojanine unterteilen sich in zwei Isoformen, Synaptojanin 1 und Synaptojanin 2 (Nemoto et al., 2001). Alle Synaptojanine setzen sich aus drei Domänen zusammen: eine Sac1-ähnliche aminoterminal (N-terminale) Polyphosphoinositid-Phosphatase-Domäne, eine zentrale PtdIns-5-Phosphatase-Domäne und eine carboxyterminale (C-terminale) prolinreiche Domäne (Rosivatz et al., 2006). Bei Synaptojanin 1 knock-out Maus-Modellen wurde eine Anhäufung an Clathrin-beschichteten Vesikeln in den Synapsen entdeckt, was einen Defekt in der Clathrin-Vesikel-Entschichtung vermuten lässt. Diese Mäuse zeigten neurologische Defizite und starben kurz nach der Geburt (Cremona et al., 1999). Ähnliche Effekte wurden bei Genveränderten *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* Versuchen beobachtet (Harris et al., 2000, Verstreken et al., 2003). Biallelische *SYNJ1* Mutationen führen beim Menschen zu einer early-onset Parkinson-Erkrankung sowie epileptischen Enzephalopathie (Hardies et al., 2016, Quadri et al., 2013, Krebs et al., 2013). Die Rolle von *SYNJ2* bei der Clathrin vermittelten Endozytose sowie die hohe Expressierung des Proteins im Gehirn spricht stark für die pathogene Wirkung biallelischer trunkierender Varianten im *SYNJ2*-Gen. Die betroffenen Geschwister der Familie ID-001 leiden nicht nur unter einer Entwicklungsverzögerung sondern unter weiteren neurologischen Defiziten wie

einer ausgeprägten Spastik sowie Hand Stereotypien und auch diese phänotypischen Merkmale könnten durch die Rolle des *SYNJ2*-Genproduktes am synaptischen Spalt zu erklären sein. Auch die Folgen biallelischer *SYNJ1* Mutationen lassen zu der Schlussfolgerung kommen, dass auch biallelische *SYNJ2* Varianten pathologische Konsequenzen haben könnten. Eine Suche nach weiteren *SYNJ2* biallelischen trunkierenden Varianten in unserer in-house Datenbank ergab keine Treffer und weitere Patienten mit biallelischen trunkierenden *SYNJ2*-Varianten wurden bisher nicht identifiziert. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der identifizierten Variante und dem Krankheitsbild der Patienten kann also zum momentanen Zeitpunkt nicht sicher festgestellt werden.

4.3. Ungelöste Fälle und Ausblick

Der nächste mögliche Schritt zur Entdeckung von weiteren Kandidatengen und somit zur Gewinnung einer höheren Lösungsquote wäre der Einsatz der Whole Genome Sequenzierung (WGS). Im Vergleich zur Whole Exome Sequenzierung (WES) werden bei der WGS nicht nur die kodierenden Regionen und exonflankierenden Spleißstellen, sondern das gesamte Genom abgedeckt (Hu et al., 2019). Im Prinzip sollte das WGS uns ermöglichen alle Arten von Mutationen überall im Genom nachweisen zu können. Problematisch wird es in der Praxis dadurch, dass wir bisher nicht zuverlässig funktionsrelevante Sequenzvarianten im nichtkodierenden Teil des Genoms identifizieren können, einschließlich tiefer intronischer oder sogar exonischer Mutationen, die das Spleißen beeinflussen (Soukariéh et al., 2016). Bisher scheint die WGS jedoch vor allem dann zu einer höheren Lösungsquote zu führen, wenn die davor verwendeten Techniken zur WES veraltet waren (Bowling et al., 2017). Des Weiteren ist WGS ein besseres Mittel zur Erkennung kleinerer Kopienzahlvarianten (CNVs) und Strukturvarianten (Belkadi et al., 2015).

Auch eine systematische Reanalyse der erhobenen Sequenzdaten nach mehreren Monaten könnte zu einer Erhöhung der Lösungsquote führen. Bei der momentan rasanten Entwicklung in der Entdeckung neuer

krankheitsverursachender Gene und Varianten, sollte eine systemische Reanalyse der NGS Daten zum allgemeinen Standard werden. Studien zeigen, dass dabei bis zu 8% neuer pathogenen oder wahrscheinlich pathogenen Varianten identifiziert werden können (Bowling et al., 2017). Hierbei ist das Potenzial bei der Reanalyse von WGS Daten in den nächsten Jahren am größten, da wie bereits geschildert, viele nicht-kodierenden Varianten sowie Strukturvarianten erst mittels WGS identifiziert werden können (Belkadi et al., 2015).

Eine weitere diagnostische Möglichkeit ist die Sequenzierung des Transkriptoms. Die Gesamtheit aller Transkripte eines Zelltyps zu einem bestimmten Zeitpunkt, also die gesamte in der Zelle hergestellten und noch nicht abgebauten RNA wird als Transkriptom bezeichnet. Das Transkriptom bestimmt den Entwicklungs- und Funktionszustand der verschiedenen Zell- und Gewebetypen im Körper. Man geht davon aus, dass viele Entwicklungsstörungen auch durch quantitative Veränderungen nicht codierender RNA ausgelöst werden, ohne dass dies im Genotyp ablesbar ist (Woopen, 2013). Auch Proteom-Analysen könnten in der Zukunft zur Entdeckung möglicher Ursachen der Entwicklungsverzögerung führen. Das Proteom stellt die Gesamtheit aller Proteine eines Zelltyps zu einem bestimmten Zeitpunkt dar, also alle in der Zelle hergestellten und zu dem Moment noch nicht abgebauten Proteine (Schaaf and Zschocke, 2013).

Des Weiteren sollten die in dieser Arbeit identifizierten Kandidatengene *TTC5* und *SYNJ2* weiter verfolgt werden. Funktionelle Studien, wie beispielsweise knock-out Modelle, könnten den pathogenen Effekt trunkierender Mutationen in den beiden Kandidatengenen unterstreichen. Auch die Entdeckung weiterer biallelischer Varianten in betroffenen Patienten würde die Rolle trunkierender Varianten in den Kandidatengenen als Ursache der autosomal-rezessiven Entwicklungsverzögerung ferner belegen.

5. Zusammenfassung

Neurologische Entwicklungsstörungen treten schon in der Kindheit auf und sind ein lebenslanger Zustand, der die Patienten, ihre Familien und die Gesellschaft durch öffentliche Dienstleistungen vor viele Herausforderungen stellt. In den letzten Jahren ermöglichten neue Technologien große Fortschritte bei der Entdeckung neuer genomischer Anomalien, die zu Entwicklungsverzögerung und Intelligenzminderung führen, darunter vor allem die Next Generation Sequenzierung (Nemoto et al.). Doch obwohl Fortschritte in der Genotypisierung und Sequenzierungstechnologie die Entdeckungsrate von Genen für Intelligenzminderung beschleunigt haben, bleiben immer noch viele Gene unentdeckt. Autosomal-rezessive Varianten spielen hierbei eine wichtige Rolle, da rezessive Varianten in heterozygoter Form in der Bevölkerung unentdeckt bleiben können.

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung neuer Kandidatengene der autosomal-rezessiven Entwicklungsverzögerung und Intelligenzminderung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 77 iranische Familien mit von Entwicklungsverzögerung und Intelligenzminderung betroffenen Kindern untersucht. Bei jeweils einem betroffenen Kind pro Familie wurde eine Exomsequenzierung mittels NGS durchgeführt. In jedem sequenzierten Exom wurde nach möglicherweise krankheitsverursachenden Punktmutationen und CNVs gesucht. Die identifizierten Varianten wurden nach bestimmten Kriterien priorisiert und die Validierung der Varianten sowie die Segregation innerhalb der Familien wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

Auf diese Weise konnten in 7 Familien in der Literatur bereits vorbeschriebene Varianten in den Genen *PAH*, *B4GALNT1*, *SCN1A*, *UBE3A*, *L3HGDH*, sowie *AGA* identifiziert werden. In 11 weiteren Familien wurden bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Varianten in den bereits etablierten Genen *KIAA0556*, *CENPJ*, *SPG20*, *LAMA1*, *CC2D2A*, *SNX14*, *RDH11*, *GBA2*, *VPS13B* und *PC* identifiziert. Außerdem wurden Varianten in den zwei Kandidatengenen *TTC5* und *SYNJ2* entdeckt. *TTC5* stellt eine stressabhängige Komponente des p300-CBP-Koaktivator-Komplexes dar und reguliert und vermittelt dessen

Zusammenbau. Varianten in den Genen *p300* und *CBP*, die für die zwei Koaktivator- Komponenten des Komplexes kodieren, sind mit einem Rubinstein-Taybi-Syndrom assoziiert worden. Im *TTC5*-Gen wurden bisher erst zwei Varianten in einer Publikation von Hu et al. 2018 als möglicherweise pathogen beschrieben. Mit der Identifizierung der beschriebenen Frameshift-Variante in der Familie ID-061 wurde nun bereits eine dritte Familie mit trunkierender *TTC5*-Variante identifiziert. Dieser Fakt, zusammen mit den stark überlappenden phänotypischen Ausprägungen der Erkrankungen der drei Familien, spricht stark für den pathogenen Effekt trunkierender *TTC5*-Varianten. *SYNJ2* kodiert für Synaptojanin 2, einem Mitglied der Synaptojaninfamilie, welche Phosphoinosit 5-Phosphatasen umfasst, die eine Schlüsselrolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose der synaptischen Vesikel an der Synapse spielen. Synaptojanine unterteilen sich in zwei Isoformen, Synaptojanin 1 und Synaptojanin 2. Synaptojanin 1 knock-out Maus-Modelle zeigten neurologische Defizite und starben kurz nach der Geburt. Die Rolle von *SYNJ2* bei der Clathrin vermittelten Endozytose sowie die hohe Exprimierung des Proteins im Gehirn spricht stark für die pathogene Wirkung biallelischer trunkierender Varianten im *SYNJ2*-Gen.

Insgesamt konnte in 20 Familien die genetische Ursache ihrer Erkrankung geklärt und dabei zwei neue Gene für Entwicklungsverzögerung und Intelligenzminderung identifiziert werden. Die Ergebnisse sind mit denen der aktuellen Literatur vergleichbar. Weiterführende funktionelle Studien sind notwendig zur Charakterisierung der beiden Kandidatengene und auch die Identifizierung weiterer betroffener Familien mit Mutationen in den beschriebenen Kandidatengenen würde deren Rolle als Ursache der Erkrankung bestärken.

6. Literaturverzeichnis

- ALDINGER, K. A., MOSCA, S. J., TETREAU, M., DEMPSEY, J. C., ISHAK, G. E., HARTLEY, T., PHELPS, I. G., LAMONT, R. E., O'DAY, D. R., BASEL, D., GRIPP, K. W., BAKER, L., STEPHAN, M. J., BERNIER, F. P., BOYCOTT, K. M., MAJEWSKI, J., PARBOOSINGH, J. S., INNES, A. M. & DOHERTY, D. 2014. Mutations in LAMA1 cause cerebellar dysplasia and cysts with and without retinal dystrophy. *American Journal of Medical Genetics*, 95, 227-34.
- AROLT, V., REIMER, C. & DILLING, H. 2001. *Basiswissen Psychiatrie und Psychotherapie*, Springer.
- BAKOWSKA, J. C., JUPILLE, H., FATHEDDIN, P., PUERTOLLANO, R. & BLACKSTONE, C. 2007. Troyer syndrome protein spartin is mono-ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 1683-92.
- BAKOWSKA, J. C., WANG, H., XIN, B., SUMNER, C. J. & BLACKSTONE, C. 2008. Lack of spartin protein in Troyer syndrome: a loss-of-function disease mechanism? *Archives of Neurology*, 65, 520-4.
- BALLIF, B. C., HORNOR, S. A., JENKINS, E., MADAN-KHETARPAL, S., SURTI, U., JACKSON, K. E., ASAMOAH, A., BROCK, P. L., GOWANS, G. C., CONWAY, R. L., GRAHAM, J. M., JR., MEDNE, L., ZACKAI, E. H., SHAIKH, T. H., GEOGHEGAN, J., SELZER, R. R., EIS, P. S., BEJJANI, B. A. & SHAFFER, L. G. 2007. Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Nature Genetics*, 39, 1071-3.
- BARCA, D., TARTA-ARSENE, O., DICA, A., ILIESCU, C., BUDISTEANU, M., MOTOESCU, C., BUTOIANU, N. & CRAIU, D. 2014. Intellectual disability and epilepsy in down syndrome. *Maedica*, 9, 344-350.
- BEHJATI, S. & TARPEY, P. S. 2013. What is next generation sequencing? *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*, 98, 236-238.
- BELKADI, A., BOLZE, A., ITAN, Y., COBAT, A., VINCENT, Q. B., ANTIPENKO, A., SHANG, L., BOISSON, B., CASANOVA, J. L. & ABEL, L. 2015. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 5473-8.
- BLANZ, B., DE ZWAAN, M., DITTMANN, V., FALKAI, P., FILZ, C., FOLKERTS, H., FREYBERGER, H. J., HALLER, R., HAUTZINGER, M., HERPERTZ, S., HORNYAK, M., KASPER, S., KLIER, C., KRAUS, E.-K., KÜHN, K.-U., MAURER, I., MÖLLER, H.-J., MUSALEK, M., NEDOPIL, N., PACK, H., PADBERG, F., REYMANN, G., RIEMANN, D., RUDAS, S., SAS, H., SCHERK, H., SCHMIDL, F., SCHÜSSLE, G., SCHWÄRZLER, F., STIEGLITZ, R.-D., STRÄTER, B., UGUR, T., VOLZ, H.-P. & WEIG, W. 2009. *Psychiatrie und Psychotherapie compact*.
- BOUKHRIS, A., STEVANIN, G., FEKI, I., DENIS, E., ELLEUCH, N., MILADI, M. I., TRUCHETTO, J., DENORA, P., BELAL, S., MHIRI, C. & BRICE, A. 2008. Hereditary spastic paraplegia with mental impairment and thin

- corpus callosum in Tunisia: SPG11, SPG15, and further genetic heterogeneity. *Archives of Neurology*, 65, 393-402.
- BOWLING, K. M., THOMPSON, M. L., AMARAL, M. D., FINNILA, C. R., HIATT, S. M., ENGEL, K. L., COCHRAN, J. N., BROTHERS, K. B., EAST, K. M., GRAY, D. E., KELLEY, W. V., LAMB, N. E., LOSE, E. J., RICH, C. A., SIMMONS, S., WHITTLE, J. S., WEAVER, B. T., NESMITH, A. S., MYERS, R. M., BARSH, G. S., BEBIN, E. M. & COOPER, G. M. 2017. Genomic diagnosis for children with intellectual disability and/or developmental delay. *Genome Medicine*, 9, 43.
- CARBONE, M. A., MACKAY, N., LING, M., COLE, D. E., DOUGLAS, C., RIGAT, B., FEIGENBAUM, A., CLARKE, J. T., HAWORTH, J. C., GREENBERG, C. R., SEARGEANT, L. & ROBINSON, B. H. 1998. Amerindian pyruvate carboxylase deficiency is associated with two distinct missense mutations. *American Journal of Medical Genetics*, 62, 1312-9.
- CHANDLER, K. E., KIDD, A., AL-GAZALI, L., KOLEHMAINEN, J., LEHESJOKI, A. E., BLACK, G. C. & CLAYTON-SMITH, J. 2003. Diagnostic criteria, clinical characteristics, and natural history of Cohen syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 40, 233-41.
- CHIH, B., LIU, P., CHINN, Y., CHALOUNI, C., KOMUVES, L. G., HASS, P. E., SANDOVAL, W. & PETERSON, A. S. 2011. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nature Cell Biology*, 14, 61-72.
- COULTER, B. 2020. Life Science Produkte und Applikationen von Beckman Coulter.
- CREMONA, O., DI PAOLO, G., WENK, M. R., LUTHI, A., KIM, W. T., TAKEI, K., DANIELL, L., NEMOTO, Y., SHEARS, S. B., FLAVELL, R. A., MCCORMICK, D. A. & DE CAMILLI, P. 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, 99, 179-88.
- CUNNINGHAM, F. G., GANT, N. F., LEVENO, K. J. & LARRY, C. 2003. Williams Obstetrics, 21st Edition. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 48, 369-369.
- DELOBEL-AYOUB, M., EHLINGER, V., KLAPOUSZCZAK, D., MAFFRE, T., RAYNAUD, J. P., DELPIERRE, C. & ARNAUD, C. 2015. Socioeconomic Disparities and Prevalence of Autism Spectrum Disorders and Intellectual Disability. *PLoS One*, 10, e0141964.
- DEMONACOS, C., KRSTIC-DEMONACOS, M. & LA THANGUE, N. B. 2001. A TPR motif cofactor contributes to p300 activity in the p53 response. *Molecular Cell*, 8, 71-84.
- DINDOT, S. V., ANTALFFY, B. A., BHATTACHARJEE, M. B. & BEAUDET, A. L. 2008. The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Human Molecular Genetics*, 17, 111-8.
- DIXON-SALAZAR, T. J., SILHAVY, J. L., UDPA, N., SCHROTH, J., BIELAS, S., SCHAFFER, A. E., OLVERA, J., BAFNA, V., ZAKI, M. S., ABDEL-SALAM, G. H., MANSOUR, L. A., SELIM, L., ABDEL-HADI, S., MARZOUKI, N., BEN-OMRAN, T., AL-SAANA, N. A., SONMEZ, F. M.,

- CELEP, F., AZAM, M., HILL, K. J., COLLAZO, A., FENSTERMAKER, A. G., NOVARINO, G., AKIZU, N., GARIMELLA, K. V., SOUGNEZ, C., RUSS, C., GABRIEL, S. B. & GLEESON, J. G. 2012. Exome sequencing can improve diagnosis and alter patient management. *Science Translational Medicine*, 4, 138ra78.
- DREWS, C. D., YEARGIN-ALLSOPP, M., DECOUFLE, P. & MURPHY, C. C. 1995. Variation in the influence of selected sociodemographic risk factors for mental retardation. *American Journal of Public Health*, 85, 329-34.
- FAHIMINIYA, S., ALMURIEKHI, M., NAWAZ, Z., STAFFA, A., LEPAGE, P., ALI, R., HASHIM, L., SCHWARTZENTRUBER, J., ABU KHADIJA, K., ZAINEDDIN, S., GAMAL, H., MAJEWSKI, J. & BEN-OMRAN, T. 2014. Whole exome sequencing unravels disease-causing genes in consanguineous families in Qatar. *Clinical Genetics*, 86, 134-41.
- FAUST, G. G. & HALL, I. M. 2014. SAMBLASTER: fast duplicate marking and structural variant read extraction. *Bioinformatics*, 30, 2503-5.
- GARRISON, E. & MARTH, G. 2012. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *arXiv* [Online]. Available: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2012arXiv1207.3907G> [Accessed July 01, 2012].
- GECZ, J., CLOOSTERMAN, D. & PARTINGTON, M. 2006. ARX: a gene for all seasons. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16, 308-16.
- GUL, A., HASSAN, M. J., HUSSAIN, S., RAZA, S. I., CHISHTI, M. S. & AHMAD, W. 2006. A novel deletion mutation in CENPJ gene in a Pakistani family with autosomal recessive primary microcephaly. *Journal of Human Genetics*, 51, 760-4.
- HAESELEER, F., JANG, G. F., IMANISHI, Y., DRIESSEN, C., MATSUMURA, M., NELSON, P. S. & PALCZEWSKI, K. 2002. Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 45537-45546.
- HAMAMY, H. 2012. Consanguineous marriages : Preconception consultation in primary health care settings. *Journal of Community Genetics*, 3, 185-92.
- HAMEL, B. C. & POPPELAARS, F. A. 2000. Sex-linked mental retardation. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 144, 1713-6.
- HARDIES, K., CAI, Y., JARDEL, C., JANSEN, A. C., CAO, M., MAY, P., DJEMIE, T., HACHON LE CAMUS, C., KEYMOLEN, K., DECONINCK, T., BHAMBHANI, V., LONG, C., SAJAN, S. A., HELBIG, K. L., SULTAN, A., BALLING, R., HELBIG, I., DE JONGHE, P., DEPIENNE, C., DE CAMILLI, P. & WECKHUYSEN, S. 2016. Loss of SYNJ1 dual phosphatase activity leads to early onset refractory seizures and progressive neurological decline. *Brain*, 139, 2420-30.
- HARRIPAUL, R., VASLI, N., MIKHAILOV, A., RAFIQ, M. A., MITTAL, K., WINDPASSINGER, C., SHEIKH, T. I., NOOR, A., MAHMOOD, H., DOWNEY, S., JOHNSON, M., VLEUTEN, K., BELL, L., ILYAS, M., KHAN, F. S., KHAN, V., MORADI, M., AYAZ, M., NAEEM, F., HEIDARI, A., AHMED, I., GHADAMI, S., AGHA, Z., ZEINALI, S., QAMAR, R., MOZHDEHIPANAH, H., JOHN, P., MIR, A., ANSAR, M., FRENCH, L., AYUB, M. & VINCENT, J. B. 2018. Mapping autosomal recessive intellectual disability: combined microarray and exome sequencing

- identifies 26 novel candidate genes in 192 consanguineous families. *Molecular Psychiatry*, 23, 973-984.
- HARRIS, T. W., HARTWIEG, E., HORVITZ, H. R. & JORGENSEN, E. M. 2000. Mutations in synaptojanin disrupt synaptic vesicle recycling. *Journal of Cell Biology*, 150, 589-600.
- HEPPER, P. G., DORNAN, J. C. & LYNCH, C. 2012. Fetal brain function in response to maternal alcohol consumption: early evidence of damage. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 36, 2168-75.
- HOEKSMAN, M., REIJNGOUD, D. J., PRUIM, J., DE VALK, H. W., PAANS, A. M. & VAN SPRONSEN, F. J. 2009. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 96, 177-82.
- HU, H., KAHRIZI, K., MUSANTE, L., FATTAHI, Z., HERWIG, R., HOSSEINI, M., OPPITZ, C., ABEDINI, S. S., SUCKOW, V., LARTI, F., BEHESHTIAN, M., LIPKOWITZ, B., AKHTARKHAVARI, T., MEHVARI, S., OTTO, S., MOHSENI, M., ARZHANGI, S., JAMALI, P., MOJAHEDI, F., TAGHDIRI, M., PAPARI, E., SOLTANI BANAVANDI, M. J., AKBARI, S., TONEKABONI, S. H., DEGHANI, H., EBRAHIMPOUR, M. R., BADER, I., DAVARNIA, B., COHEN, M., KHODAEI, H., ALBRECHT, B., AZIMI, S., ZIRN, B., BASTAMI, M., WIECZOREK, D., BAHRAMI, G., KELEMAN, K., VAHID, L. N., TZSCHACH, A., GARTNER, J., GILLESSEN-KAESBACH, G., VARAGHCHI, J. R., TIMMERMANN, B., POURFATEMI, F., JANKHAH, A., CHEN, W., NIKUEI, P., KALSCHUEER, V. M., OLADNABI, M., WIENKER, T. F., ROPERS, H. H. & NAJMABADI, H. 2019. Genetics of intellectual disability in consanguineous families. *Molecular Psychiatry*, 24, 1027-1039.
- HUNG, L. Y., CHEN, H. L., CHANG, C. W., LI, B. R. & TANG, T. K. 2004. Identification of a novel microtubule-destabilizing motif in CPAP that binds to tubulin heterodimers and inhibits microtubule assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 2697-706.
- JITRAPAKDEE, S., VIDAL-PUIG, A. & WALLACE, J. C. 2006. Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 843-54.
- KAUFMAN, L., AYUB, M. & VINCENT, J. B. 2010. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 2, 182-209.
- KELLY, S. J., DAY, N. & STREISSGUTH, A. P. 2000. Effects of prenatal alcohol exposure on social behavior in humans and other species. *Neurotoxicology and Teratology*, 22, 143-9.
- KLEEFSTRA, T. & DE LEEUW, N. 1993. Kleefstra Syndrome. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.
- KOLEHMAINEN, J., BLACK, G. C., SAARINEN, A., CHANDLER, K., CLAYTON-SMITH, J., TRASKELIN, A. L., PERVEEN, R., KIVITIEKALLIO, S., NORIO, R., WARBURG, M., FRYNS, J. P., DE LA CHAPELLE, A. & LEHESJOKI, A. E. 2003. Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein

- with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *American Journal of Human Genetics*, 72, 1359-69.
- KOOLEN, D. A., MORGAN, A. & DE VRIES, B. B. A. 1993. Koolen-de Vries Syndrome. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.
- KREBS, C. E., KARKHEIRAN, S., POWELL, J. C., CAO, M., MAKAROV, V., DARVISH, H., DI PAOLO, G., WALKER, R. H., SHAHIDI, G. A., BUXBAUM, J. D., DE CAMILLI, P., YUE, Z. & PAISAN-RUIZ, C. 2013. The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Human Mutation*, 34, 1200-7.
- KUMAR, K. R., SUE, C. M., MÜNCHAU, A. & KLEIN, C. 2014. Neurogenetics. *Oxford University Press*.
- LAL, D., NEUBAUER, B. A., TOLIAT, M. R., ALTMÜLLER, J., THIELE, H., NÜRNBERG, P., KAMRATH, C., SCHÄNZER, A., SANDER, T., HAHN, A. & NOTHNAGEL, M. 2016. Increased Probability of Co-Occurrence of Two Rare Diseases in Consanguineous Families and Resolution of a Complex Phenotype by Next Generation Sequencing. *PLoS One*, 11, e0146040.
- LAMB, J. R., TUGENDREICH, S. & HIETER, P. 1995. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends in Biochemical Sciences*, 20, 257-9.
- LEONARD, H. & WEN, X. 2002. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8, 117-34.
- LI, H. 2014. Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples. *Bioinformatics*, 30, 2843-51.
- MANDEL, J. L. & BIANCALANA, V. 2004. Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Hormone & IGF Research*, 14 Suppl A, S158-65.
- MARTIN, E., SCHULE, R., SMETS, K., RASTETTER, A., BOUKHRIS, A., LOUREIRO, J. L., GONZALEZ, M. A., MUNDWILLER, E., DECONINCK, T., WESSNER, M., JORNEA, L., OTEYZA, A. C., DURR, A., MARTIN, J. J., SCHOLS, L., MHIRI, C., LAMARI, F., ZUCHNER, S., DE JONGHE, P., KABASHI, E., BRICE, A. & STEVANIN, G. 2013. Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia. *American Journal of Human Genetics*, 92, 238-44.
- MARTIN, J. P. & BELL, J. 1943. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 6, 154-7.
- MATTSON, S. N. & RILEY, E. P. 2011. The quest for a neurobehavioral profile of heavy prenatal alcohol exposure. *Alcohol Research and Health*, 34, 51-5.
- MCLAREN, W., GIL, L., HUNT, S. E., RIAT, H. S., RITCHIE, G. R., THORMANN, A., FLICEK, P. & CUNNINGHAM, F. 2016. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17, 122.

- MCRAE, J. F., CLAYTON, S., FITZGERALD, T. W., KAPLANIS, J., PRIGMORE, E., RAJAN, D., SIFRIM, A., AITKEN, S., AKAWI, N., ALVI, M., AMBRIDGE, K., BARRETT, D. M., BAYZETINOVA, T., JONES, P., BARRETT, J. C. & HURLES, M. E. 2017. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature*, 542, 433-438.
- MODELL, B. & DARR, A. 2002. Science and society: genetic counselling and customary consanguineous marriage. *Nature Reviews Genetics*, 3, 225-9.
- MOSE, L. E., PEROU, C. M. & PARKER, J. S. 2019. Improved indel detection in DNA and RNA via realignment with ABRA2. *Bioinformatics*, 35, 2966-2973.
- MUSANTE, L. & ROPERS, H. H. 2014. Genetics of recessive cognitive disorders. *Trends in Genetics*, 30, 32-9.
- NAJMABADI, H., HU, H., GARSHASBI, M., ZEMOJTEL, T., ABEDINI, S. S., CHEN, W., HOSSEINI, M., BEHJATI, F., HAAS, S., JAMALI, P., ZECHA, A., MOHSENI, M., PÜTTMANN, L., VAHID, L. N., JENSEN, C., ABBASI MOHEB, L., BIENEK, M., LARTI, F., MUELLER, I., WEISSMANN, R., DARVISH, H., WROGEMANN, K., HADAVI, V., LIPKOWITZ, B., ESMAEELI-NIEH, S., WIECZOREK, D., KARIMINEJAD, R., FIROUZABADI, S. G., COHEN, M., FATTAHI, Z., ROST, I., MOJAHEDI, F., HERTZBERG, C., DEGHAN, A., RAJAB, A., BANAVANDI, M. J. S., HOFFER, J., FALAH, M., MUSANTE, L., KALSCHEUER, V., ULLMANN, R., KUSS, A. W., TZSCHACH, A., KAHRIZI, K. & ROPERS, H. H. 2011. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*.
- NEMOTO, Y., WENK, M. R., WATANABE, M., DANIELL, L., MURAKAMI, T., RINGSTAD, N., YAMADA, H., TAKEI, K. & DE CAMILLI, P. 2001. Identification and characterization of a synaptojanin 2 splice isoform predominantly expressed in nerve terminals. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 41133-42.
- NISSINEN, M., VUOLTEENAHO, R., BOOT-HANDFORD, R., KALLUNKI, P. & TRYGGVASON, K. 1991. Primary structure of the human laminin A chain. Limited expression in human tissues. *Biochemical Journal*, 276 (Pt 2), 369-79.
- NOOR, A., WINDPASSINGER, C., PATEL, M., STACHOWIAK, B., MIKHAILOV, A., AZAM, M., IRFAN, M., SIDDIQUI, Z. K., NAEEM, F., PATERSON, A. D., LUTFULLAH, M., VINCENT, J. B. & AYUB, M. 2008. CC2D2A, encoding a coiled-coil and C2 domain protein, causes autosomal-recessive mental retardation with retinitis pigmentosa. *American Journal of Human Genetics*, 82, 1011-1018.
- NORDHEIM A, K. R. 2018. *Molekulare Genetik*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- PLANCHART, A. 2013. Analysis of an intronic promoter within Synj2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440, 640-5.
- PORETTI, A., HAUSLER, M., VON MOERS, A., BAUMGARTNER, B., ZERRES, K., KLEIN, A., AIELLO, C., MORO, F., ZANNI, G., SANTORELLI, F. M., HUISMAN, T. A., WEIS, J., VALENTE, E. M., BERTINI, E. & BOLTSHAUSER, E. 2014. Ataxia, intellectual disability,

- and ocular apraxia with cerebellar cysts: a new disease? *Cerebellum*, 13, 79-88.
- QUADRI, M., FANG, M., PICILLO, M., OLGATI, S., BREEDVELD, G. J., GRAAFLAND, J., WU, B., XU, F., ERRO, R., AMBONI, M., PAPPATA, S., QUARANTELLI, M., ANNESI, G., QUATTRONE, A., CHIEN, H. F., BARBOSA, E. R., OOSTRA, B. A., BARONE, P., WANG, J. & BONIFATI, V. 2013. Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Human Mutation*, 34, 1208-15.
- RAUCH, A., HOYER, J., GUTH, S., ZWEIER, C., KRAUS, C., BECKER, C., ZENKER, M., HUFFMEIER, U., THIEL, C., RUSCHENDORF, F., NURNBERG, P., REIS, A. & TRAUTMANN, U. 2006. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *American Journal of Medical Genetics*, 140, 2063-74.
- RAUCH, A., WIECZOREK, D., GRAF, E., WIELAND, T., ENDELE, S., SCHWARZMAYR, T., ALBRECHT, B., BARTHOLDI, D., BEYGO, J., DI DONATO, N., DU E, A., CREMER, K., HEMPEL, M., HORN, D., HOYER, J., JOSET, P., RÖPKE, A., MOOG, U., RIESS, A., THIEL, C. T., TZSCHACH, A., WIESENER, A., WOHLLEBER, E., ZWEIER, C., EKICI, A. B., ZINK, A. M., RUMP, A., MEISINGER, C., GRALLERT, H., STICHT, H., SCHENCK, A., ENGELS, H., RAPPOLD, G., SCHRÖCK, E., WIEACKER, P., RIESS, O., MEITINGER, T., REIS, A. & STROM, T. M. 2012. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *The Lancet*.
- RAVNAN, J. B., TEPPERBERG, J. H., PAPPENHAUSEN, P., LAMB, A. N., HEDRICK, J., EASH, D., LEDBETTER, D. H. & MARTIN, C. L. 2006. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *Journal of Medical Genetics*, 43, 478-89.
- REGIE LYN P. SANTOS - CORTEZ, V. K., FALAK SHER KHAN, ZAIB - UN - NISA MUGHAL, IMEN CHAKCHOUK, KWANGHYUK LEE, MEMOONA RASHEED, RIFAT HAMZA, ANUSHREE ACHARYA, EHSAN ULLAH, & MUHAMMAD ARIF NADEEM SAQIB, I. A., GHAZANFAR ALI, MUHAMMAD JAWAD HASSAN, SAADULLAH KHAN, ZAHID AZEEM, IRFAN ULLAH, MICHAEL J. BAMSHAD, DEBORAH A. NICKERSON, ISABELLE SCHRAUWEN, WASIM AHMAD, MUHAMMAD ANSAR, SUZANNE M. LEAL 2018. Novel candidate genes and variants underlying autosomal recessive neurodevelopmental disorders with intellectual disability. *Human Genetics*.
- REUTER, M. S., TAWAMIE, H., BUCHERT, R., HOSNY GEBRIL, O., FROUKH, T., THIEL, C., UEBE, S., EKICI, A. B., KRUMBIEGEL, M., ZWEIER, C., HOYER, J., EBERLEIN, K., BAUER, J., SCHELLER, U., STROM, T. M., HOFFJAN, S., ABDELRAOUF, E. R., MEGUID, N. A., ABBOUD, A., AL KHATEEB, M. A., FAKHER, M., HAMDAN, S., ISMAEL, A., MUHAMMAD, S., ABDALLAH, E., STICHT, H., WIECZOREK, D., REIS, A. & ABOU JAMRA, R. 2017. Diagnostic Yield

- and Novel Candidate Genes by Exome Sequencing in 152 Consanguineous Families With Neurodevelopmental Disorders. *JAMA Psychiatry*, 74, 293-299.
- RILEY, E. P. & MCGEE, C. L. 2005. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Experimental biology and medicine*, 230, 357-65.
- ROELEVELD, N., ZIELHUIS, G. A. & GABREELS, F. 1997. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 39, 125-32.
- ROELFSEMA, J. H., WHITE, S. J., ARIYUREK, Y., BARTHOLDI, D., NIEDRIST, D., PAPADIA, F., BACINO, C. A., DEN DUNNEN, J. T., VAN OMMEN, G. J., BREUNING, M. H., HENNEKAM, R. C. & PETERS, D. J. 2005. Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *American Journal of Human Genetics*, 76, 572-80.
- ROPER, H. H. 2010. Genetics of early onset cognitive impairment. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 11, 161-87.
- ROPER, H. H. & HAMEL, B. C. 2005. X-linked mental retardation. *Nature Reviews Genetics*, 6, 46-57.
- ROSIVATZ, E., MATTHEWS, J. G., MCDONALD, N. Q., MULET, X., HO, K. K., LOSSI, N., SCHMID, A. C., MIRABELLI, M., POMERANZ, K. M., ERNEUX, C., LAM, E. W., VILAR, R. & WOSCHOLSKI, R. 2006. A small molecule inhibitor for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN). *ACS Chemical Biology*, 1, 780-90.
- RUBINSTEIN, J. H. & TAYBI, H. 1963. Broad thumbs and toes and facial abnormalities. A possible mental retardation syndrome. *Am J Dis Child*, 105, 588-608.
- RUMP, P., JAZAYERI, O., VAN DIJK-BOS, K. K., JOHANSSON, L. F., VAN ESSEN, A. J., VERHEIJ, J. B., VEENSTRA-KNOL, H. E., REDEKER, E. J., MANNENS, M. M., SWERTZ, M. A., ALIZADEH, B. Z., VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M., SINKE, R. J. & SIKKEMA-RADDATZ, B. 2016. Whole-exome sequencing is a powerful approach for establishing the etiological diagnosis in patients with intellectual disability and microcephaly. *BMC Medical Genomics*, 9, 7.
- SAADAT, M., ANSARI-LARI, M. & FARHUD, D. D. 2004. Consanguineous marriage in Iran. *Annals of Human Biology*, 31, 263-9.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- SANDERS, A. A., DE VRIEZE, E., ALAZAMI, A. M., ALZHRANI, F., MALARKEY, E. B., SORUSCH, N., TEBBE, L., KUHNS, S., VAN DAM, T. J., ALHASHEM, A., TABARKI, B., LU, Q., LAMBACHER, N. J., KENNEDY, J. E., BOWIE, R. V., HETTERSCHIJT, L., VAN BEERSUM, S., VAN REEUWIJK, J., BOLDT, K., KREMER, H., KESTERSON, R. A., MONIES, D., ABOUELHODA, M., ROEPMAN, R., HUYNEN, M. H., UEFFING, M., RUSSELL, R. B., WOLFRUM, U., YODER, B. K., VAN WIJK, E., ALKURAYA, F. S. & BLACQUE, O. E. 2015. KIAA0556 is a

- novel ciliary basal body component mutated in Joubert syndrome. *Genome Biology*, 16, 293.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- SANTOS-CORTEZ, R. L. P., KHAN, V., KHAN, F. S., MUGHAL, Z.-U.-N., CHAKCHOUK, I., LEE, K., RASHEED, M., HAMZA, R., ACHARYA, A., ULLAH, E., SAQIB, M. A. N., ABBE, I., ALI, G., HASSAN, M. J., KHAN, S., AZEEM, Z., ULLAH, I., BAMSHAD, M. J., NICKERSON, D. A., SCHRAUWEN, I., AHMAD, W., ANSAR, M. & LEAL, S. M. 2018. Novel candidate genes and variants underlying autosomal recessive neurodevelopmental disorders with intellectual disability. *Journal of Human Genetics*, 137, 735-752.
- SCHAAF, C. P. & ZSCHOCKE, J. 2013. *Basiswissen Humangenetik*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- SCHALOCK, R. L., BORTHWICK-DUFFY, S. A., BRADLEY, V. J., BUNTINX, W. H. E., COULTER, D. L., CRAIG, E. M., GOMEZ, S. C., LACHAPPELLE, Y., LUCKASSON, R., REEVE, A., SHOGREN, K. A., SNELL, M. E., SPREAT, S., TASSE, M. J., THOMPSON, J. R., VERDUGO-ALONSO, M. A., WEHMEYER, M. L. & YEAGER, M. H. 2010. Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports.
- SILVERMAN, W. 2009. Prevention of intellectual and developmental disabilities. *Journal of Intellectual & Developmental Disability*, 47, 320-2.
- SOUKARIEH, O., GAILDRAT, P., HAMIEH, M., DROUET, A., BAERT-DESURMONT, S., FREBOURG, T., TOSI, M. & MARTINS, A. 2016. Exonic Splicing Mutations Are More Prevalent than Currently Estimated and Can Be Predicted by Using In Silico Tools. *PLoS Genetics*, 12, e1005756.
- SOUSA, S. B., RAMOS, F., GARCIA, P., PAIS, R. P., PAIVA, C., BEALES, P. L., MOORE, G. E., SARAIVA, J. M. & HENNEKAM, R. C. 2014. Intellectual disability, coarse face, relative macrocephaly, and cerebellar hypotrophy in two sisters. *American Journal of Medical Genetics*, 164a, 10-4.
- STROMME, P. 2000. Aetiology in severe and mild mental retardation: a population-based study of Norwegian children. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 42, 76-86.
- STURM, M., SCHROEDER, C. & BAUER, P. 2016. SeqPurge: highly-sensitive adapter trimming for paired-end NGS data. *BMC Bioinformatics*, 17, 208.
- TASSE, M. J., SCHALOCK, R. L., THISSEN, D., BALBONI, G., BERSANI, H. H., JR., BORTHWICK-DUFFY, S. A., SPREAT, S., WIDAMAN, K. F., ZHANG, D. & NAVAS, P. 2016. Development and Standardization of the Diagnostic Adaptive Behavior Scale: Application of Item Response Theory to the Assessment of Adaptive Behavior. *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities*, 121, 79-94.
- TEASDALE, R. D., LOCI, D., HOUGHTON, F., KARLSSON, L. & GLEESON, P. A. 2001. A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochemical Journal*, 358, 7-16.

- TEN HOEDT, A. E., DE SONNEVILLE, L. M., FRANCOIS, B., TER HORST, N. M., JANSSEN, M. C., RUBIO-GOZALBO, M. E., WIJBURG, F. A., HOLLAK, C. E. & BOSCH, A. M. 2011. High phenylalanine levels directly affect mood and sustained attention in adults with phenylketonuria: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34, 165-71.
- THOMAS, A. C., WILLIAMS, H., SETO-SALVIA, N., BACCHELLI, C., JENKINS, D., O'SULLIVAN, M., MENGRELIS, K., ISHIDA, M., OCAKA, L., CHANUDET, E., JAMES, C., LESCAI, F., ANDERSON, G., MORROGH, D., RYTEN, M., DUNCAN, A. J., PAI, Y. J., SARAIVA, J. M., RAMOS, F., FAREN, B., SAUNDERS, D., VERNAY, B., GISSEN, P., STRAATMAAN-IWANOWSKA, A., BAAS, F., WOOD, N. W., HERSHESON, J., HOULDEN, H., HURST, J., SCOTT, R., BITNER-GLINDZICZ, M., MOORE, G. E., SOUSA, S. B. & STANIER, P. 2014. Mutations in SNX14 cause a distinctive autosomal-recessive cerebellar ataxia and intellectual disability syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 95, 611-21.
- TZSCHACH, A., GRASSHOFF, U., BECK-WOEDL, S., DUFKE, C., BAUER, C., KEHRER, M., EVERS, C., MOOG, U., OEHL-JASCHKOWITZ, B., DI DONATO, N., MAIWALD, R., JUNG, C., KUECHLER, A., SCHULZ, S., MEINECKE, P., SPRANGER, S., KOHLHASE, J., SEIDEL, J., REIF, S., RIEGER, M., RIESS, A., STURM, M., BICKMANN, J., SCHROEDER, C., DUFKE, A., RIESS, O. & BAUER, P. 2015. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. *European Journal of Human Genetics*, 23, 1513-8.
- VERSTREKEN, P., KOH, T. W., SCHULZE, K. L., ZHAI, R. G., HIESINGER, P. R., ZHOU, Y., MEHTA, S. Q., CAO, Y., ROOS, J. & BELLEN, H. J. 2003. Synaptojanin is recruited by endophilin to promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron*, 40, 733-48.
- VISSERS, L. E., GILISSEN, C. & VELTMAN, J. A. 2016. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nature Reviews Genetics*, 17, 9-18.
- WINNEPENINCKX, B., ROOMS, L. & KOOY, R. F. 2003. Mental Retardation: A Review of the Genetic Causes. *The British Journal of Development Disabilities*, 49, 29-44.
- WOOPEN, C. 2013. Die Zukunft der genetischen Diagnostik – von der Forschung in die klinische Anwendung. *Deutscher Ethikrat*.
- XIE, Y. A., LEE, W., CAI, C., GAMBIN, T., NOUPUU, K., SUJIRAKUL, T., AYUSO, C., JHANGIANI, S., MUZNY, D., BOERWINKLE, E., GIBBS, R., GREENSTEIN, V. C., LUPSKI, J. R., TSANG, S. H. & ALLIKMETS, R. 2014. New syndrome with retinitis pigmentosa is caused by nonsense mutations in retinol dehydrogenase RDH11. *Human Molecular Genetics*, 23, 5774-80.
- XIONG, Y., WANG, L., DENG, W., WANG, J. & SHI, T. 2013. Human TTC5, a novel tetratricopeptide repeat domain containing gene, activates p53 and inhibits AP-1 pathway. *Molecular Biology Reports*, 40, 6183-8.
- YANG, Y., MUZNY, D. M., REID, J. G., BAINBRIDGE, M. N., WILLIS, A., WARD, P. A., BRAXTON, A., BEUTEN, J., XIA, F., NIU, Z., HARDISON,

- M., PERSON, R., BEKHEIRNIA, M. R., LEDUC, M. S., KIRBY, A., PHAM, P., SCULL, J., WANG, M., DING, Y., PLON, S. E., LUPSKI, J. R., BEAUDET, A. L., GIBBS, R. A. & ENG, C. M. 2013. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *New England Journal of Medicine*, 369, 1502-11.
- YANNICELLI, S. & RYAN, A. 1995. Improvements in behaviour and physical manifestations in previously untreated adults with phenylketonuria using a phenylalanine-restricted diet: a national survey. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 18, 131-134.
- ZAHIR, F. & FRIEDMAN, J. M. 2007. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. *Clinical Genetics*, 72, 271-87.

7. 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 in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Olaf Rieß und Ph.D. Hamid Ghaedi.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglied Rebecca Buchert-Lo) von mir eigenständig durchgeführt. (Die Exomsequenzierung wurde durch die core facility NCCT des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik durchgeführt).

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 07.12.2020

Anhang

Chromosom	Start	Ende	Referenz	Beobachtet	Genotyp	Gen	Variante	1000g	gnomAD	in-house homozygot	in-house heterozygot
chr1	18808144	18808144	G	C	het	KLHDC7A	missense			0	1
chr1	18808175	18808175	G	C	het	KLHDC7A	missense			0	1
chr1	53099272	53099272	T	A	het	FAM159A	missense		0.0001	0	2
chr1	53099273	53099273	C	G	het	FAM159A	missense		0.0001	0	2
chr1	165386400	165386400	A	G	hom	RXRG	missense			1	0
chr1	167960538	167960538	C	T	hom	DCAF6	stop_gained			1	0
chr1	169100545	169100545	G	A	hom	ATP1B1	missense		0.0001	1	0
chr1	169438042	169438044	TTA	-	hom	SLC19A2	inframe_deletion		0.0001	1	1
chr3	41759319	41759319	T	G	het	ULK4	missense			0	1
chr3	41759320	41759320	C	A	het	ULK4	missense			0	1
chr3	45557671	45557671	C	A	het	LARS2	missense		0.0002	0	1
chr3	45588882	45588882	C	A	het	LARS2	missense		0.0001	0	1
chr6	154763360	154763360	T	C	hom	CNKSR3	missense			1	0
chr6	158485640	158485643	ATCT	-	hom	SYNJ2	frameshift		0.0001	1	0
chr7	4249705	4249705	C	T	hom	SDK1	missense		0.0001	1	0
chr7	99821630	99821630	C	T	hom	GATS	missense	0.0002	0.0002	1	3
chr8	42977982	42977982	A	G	hom	POMK	missense			1	0
chr8	14222364	14222364	C	T	het	SLC45A4	missense	0.0002	0.0001	0	1
chr8	142227246	142227246	C	T	het	SLC45A4	missense			0	1
chr9	33534463	33534463	G	A	het	ANKRD18B	missense			0	1
chr9	33568722	33568722	G	A	het	ANKRD18B	missense	0.0002	0.0001	0	1
chr12	26628276	26628276	C	T	het	ITPR2	missense		0.0001	0	2
chr12	26755382	26755382	C	T	het	ITPR2	missense	0.0002	0.0001	0	3
chr14	51237179	51237179	T	C	hom	NIN	missense			1	0
chr15	38746370	38746370	G	A	hom	FAM98B	missense	0.0004	0.0010	1	17
chr17	11687629	11687629	G	A	hom	DNAH9	missense	0.0006	0.0006	1	14
chr17	77073900	77073900	C	T	het	ENGASE	missense	0.0002	0.0001	0	1
chr17	77075585	77075585	C	T	het	ENGASE	missense		0.0001	0	1
chr22	21073072	21073072	T	C	het	PI4KA	missense		0.0001	0	1
chr22	21075586	21075586	G	A	het	PI4KA	missense		0.0001	0	1

Referenz	Beobachtet	Genotyp	Gen	Variante	1000g	gnomAD	in-house	
							homozygot	heterozygot
A	G	hom	ZNF197	missense			1	0
A	C	hom	INIP	start_lost	0.0002	0.0004	1	4
C	T	hom	COL27A1	missense		0.0001	1	0
C	T	hom	SHANK2	missense		0.0001	1	2
T	C	hom	MAP6	missense			1	0
G	-	het	KRT4	frameshift		0.0001	0	1
G	T	het	KRT4	missense		0.0001	0	1
G	A	hom	UTP20	missense		0.0001	1	4
G	A	hom	BTBD11	missense			1	1
G	T	het	ZIC5	missense			0	1
C	T	het	ZIC5	missense			0	1
TT	-	hom	TTC5	frameshift			1	0
A	G	hom	TRAV10	missense			1	0
G	A	hom	SEMA6B	missense		0.0001	1	0
C	G	hom	RPL13A	missense		0.0001	2	0
C	T	hom	PRR12	missense	0.0004	0.0004	2	2
G	A	hom	ZNF701	missense	0.0004	0.0003	3	1
T	C	hom	ARSH	missense			1	0
C	T	hom	SH3KBP1	missense			1	0
GGGGCCGGGCC	-	hom	PPP1R3F	frameshift			1	0
A	G	hom	MT-ND1	missense			2	0
G	A	hom	MT-ND5	missense			3	2

Anhang 2