

## Summary

An accurate definitive diagnosis is the bedrock of best practice medical care. Next-Generation-Sequencing (NGS) technologies have revolutionized many areas of medicine; none more so than medical genetics, where they have improved clinical diagnostics and facilitated novel gene discovery. Achieving a diagnosis can dramatically alter clinical management, treatment or prognosis. In most cases, it is invaluable in preventing expensive and potentially invasive, unnecessary further testing, and importantly, it puts an end to the stressful diagnostic odyssey many patients and families with rare genetic disorders face. During this PhD, I have harnessed the power of NGS in the clinical setting (i) to resolve the diagnostic odyssey of patients with rare genetic disorders, and (ii) to identify novel genes and novel mutations which underlie rare diseases. The overall study, divided into two distinct parts, included a total of 200 patients with undiagnosed disorders.

In the first part of the study, I performed molecular genetic testing (including whole-exome sequencing (WES)) on 100 patients with syndromic short stature, including a cohort of patients with undiagnosed skeletal dysplasias and a cohort of patients with suspected Dubowitz syndrome. Of these 100, I achieved a diagnosis for 77 (77%). Of note, I discovered two novel genes for osteogenesis imperfecta (*SEC24D* and *MESDC2*), a novel gene for Filippi syndrome (*CKAP2L*) and 8 candidate genes underlying syndromic short stature syndromes. Evidence from the literature and corresponding animal models, as well as the initial functional analyses I have undertaken have implicated these novel candidate genes in the development of rare disorders.

Secondly, I spearheaded a pilot study to test the clinical utility of the TruSight™ One Sequencing panel (Illumina), also known as the “Mendeliome”, on 100 patients with unresolved rare disorders. In the Mendeliome study, a diagnostic rate of 56% was achieved. Importantly, I identified 3 novel genes and 4 novel phenotypes associated with novel mutations in known genes.

Overall, a diagnosis was reached for 67% of patients, a result which is truly satisfying as it far exceeds the diagnostic success rate achieved in previous studies. Furthermore, in total, I identified 80 novel mutations, thus expanding the mutational spectra of 62 genes underlying rare genetic disorders. Thus, I could show that NGS technologies such as WES and the Mendeliome have immense clinical utility, and that even in isolated cases, NGS can be successfully applied to identify novel genes, novel candidate genes, and novel mutations, each of which contribute to our understanding of basic biology, expand our knowledge of existing

and novel physiological pathways, and increase our ability to elucidate the underlying pathophysiology. All these are necessary prerequisites if we are to successfully move into the arena of precision medicine and the discovery of novel therapeutic agents to treat disease.

## **Zusammenfassung**

Eine praezise und korrekte Diagnose ist das Fundament fuer eine bestmoegliche medizinische Versorgung. Die Technologien des Next-Generation-Sequencing (NGS) haben viele Bereiche der Medizin revolutioniert, vor allem die medizinische Genetik, wo sie die klinische Diagnostik verbessern und die Klaerung genetischer Krankheitsursachen erleichtern. Eine Diagnose kann erhebliche Konsequenzen fuer das klinische Management, die Behandlung und/oder die Prognose haben. In den meisten Faellen ist sie von unschaetzbarem Wert, weil sich durch sie teure und potenziell invasive, unnoetige weitere Tests vermeiden lassen und vor allem weil sie der belastenden diagnostischen Odyssee ein Ende setzt, die Patienten und Familien mit seltenen genetischen Erkrankungen haeufig durchmachen. In meiner Doktorarbeit habe ich das Potenzial des NGS fuer die klinische Praxis genutzt, um (i) die diagnostische Odyssee von Patienten mit seltenen genetischen Erkrankungen zu beenden und (ii) neue Gene und neue Mutationen zu identifizieren, die seltenen Krankheiten zugrunde liegen. Die Gesamtstudie, bestehend aus zwei Teilen, umfasste insgesamt 200 Patienten mit bislang nicht diagnostizierten seltenen Erkrankungen.

Im ersten Teil der Studie habe ich molekulargenetische Analysen (einschließlich Exomsequenzierung; *whole-exome sequencing* (WES)) bei 100 Patienten mit syndromalem Kleinwuchs durchgefuehrt, darunter eine Kohorte von Patienten mit unklaren Skelett-Dysplasien und eine Kohorte von Patienten mit Verdacht auf Dubowitz-Syndrom. Bei diesen 100 Patienten habe ich in 77 Faellen (77 %) eine Diagnose erreicht. Ich habe zwei neue Gene fuer die Osteogenesis imperfecta entdeckt (*SEC24D* und *MESDC2*), ein neues Gen fuer das Filippi-Syndrom (*CKAP2L*) und 8 Kandidatengene als Ursache fuer syndromalen Kleinwuchs. Belege aus der wissenschaftlichen Literatur und entsprechenden Tiermodellen sowie die ersten Funktionsanalysen, die ich vorgenommen habe, lassen darauf schließen, dass diese neuen Kandidatengene an der Entstehung von seltenen Erkrankungen beteiligt sind.

Im zweiten Teil habe ich eine Pilotstudie geleitet, die den klinischen Nutzen des TruSight™ One Sequencing Panels (Illumina), das auch als "Mendeliom" bezeichnet wird, bei 100 Patienten mit unklaren seltenen Erkrankungen untersuchte. In dieser Mendeliom-Studie erzielte ich eine diagnostische Aufklaerungsrate von 56% und identifizierte 3 neue

Krankheitsgene sowie 4 neue Phaentypen, die mit neuen Mutationen in bekannten Genen assoziiert sind.

Insgesamt ermittelte ich eine Diagnose bei 67 % der Patienten. Dieses Ergebnis ist sehr zufriedenstellend, da es weit ueber der diagnostischen Erfolgsquote liegt, die in frueheren Studien erzielt wurde. Darueber hinaus identifizierte ich insgesamt 80 neue Mutationen und erweiterte damit die Mutationsspektren von 62 Genen, die seltenen genetischen Stoerungen zugrunde liegen. So konnte ich zeigen, dass NGS-Technologien wie WES und das Mendeliom einen immensen klinischen Nutzen besitzen und dass sich NGS auch in Einzelfaellen erfolgreich anwenden laesst, um neue Gene, neue Kandidatengene und neue Mutationen zu entdecken. Ihre Identifizierung verbessert unser Verstaendnis von grundlegenden biologischen Prozessen, erweitert unser Wissen ueber bekannte und neue physiologische Mechanismen und liefert uns neue Moeglichkeiten, die Entstehung von Krankheiten zu entschluesseln. Diese Kenntnisse benoetigen wir auf einem erfolgreichen Weg hin zu personalisierter Medizin und zur Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung von Krankheiten.