

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Zerres)

Syndromale Ziliopathien

–

Molekulargenetische Aufklärung als methodische Herausforderung

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Theoretischen Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Nadina Carola Ortiz Brüchle

aus Wilhelmshaven

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med. Klaus Zerres
 Professor Dr. med. Jochen Riehl

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2013

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Primäre Zilien und Ziliopathien	1
1.1.1. Ziliopathie-Proteine	3
1.2. Klinik und Genetik der primären Ziliopathien	6
1.2.1. Meckel-Gruber-Syndrom (MKS)	6
1.2.2. Joubert-Syndrom (JS) und assoziierte Erkrankungen (JSRD)	9
1.2.3. Bardet-Biedl-Syndrom (BBS)	12
1.2.4. Differenzialdiagnosen	15
1.2.5. Gemeinsame molekulargenetische Grundlagen	16
2. Zielsetzung	19
3. Material und Methoden	20
3.1. Patientenkollektiv	20
3.2. Geräte, Zubehör und Chemikalien	22
3.2.1. Geräte und Zubehör	22
3.2.2. Chemikalien	23
3.3. Referenzsequenzen und Bioinformatik	24
3.3.1. Referenzsequenzen	24
3.3.2. (Bioinformatische) Validierung von Varianten	25
3.4. Molekulargenetische Methoden	27
3.4.1. DNA-Isolation	27
3.4.2. DNA-Amplifikation	28
3.4.3. RNA-Isolation und RT-PCR	28
3.4.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
3.4.5. PCR-Standardbedingungen	29
3.4.6. <i>Junction</i> -Fragment-PCR	31
3.4.7. Multiplex-Deletions-PCR	31
3.4.8. cDNA PCR und Transkript-Analysen	32
3.4.9. Sequenzierung nach Sanger	33
3.4.10. Mikrosatelliten	35
3.4.11. SNP-Array-Analysen	37

Inhaltsverzeichnis

3.4.11.1. Nachweis submikroskopischer Deletionen/Duplikationen	38
3.4.11.2. Nachweis von Homozygotie bei Blutsverwandtschaft	39
3.4.12. Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	40
3.4.13. <i>Next-Generation-Sequencing</i> und Pyrosequenzierung	41
4. Ergebnisse	49
4.1. Zusammenfassende Ergebnisse für MKS, JS/JSRD und BBS	49
4.1.1. MKS	49
4.1.1.1. Literaturdaten zu Mutationshäufigkeiten für die MKS-Gene	49
4.1.1.2. Daten des eigenen MKS-Kollektivs	54
4.1.2. JS/JSRD	55
4.1.2.1. Literaturdaten zu Mutationshäufigkeiten für die JS-Gene	55
4.1.2.2. Daten des eigenen JS-Kollektivs	57
4.1.3. BBS	58
4.1.3.1. Literaturdaten zu Mutationshäufigkeiten für die BBS-Gene	58
4.1.3.2. Daten des eigenen BBS-Kollektivs	60
4.2. SNP-Array-Analytik im eigenen Kollektiv	62
4.2.1. Homozygotie-Screening	62
4.2.2. Kopienzahlanalysen	72
4.3. Untersuchung mittels NGS- <i>Panel</i> für spezifische MKS-/JS-Gene	75
4.3.1. Etablierung und Validierung	75
4.3.2. NGS-Daten des eigenen MKS- und JS-Kollektivs	77
4.3.2.1. Unklare Varianten im MKS- und JS-NGS-Kollektiv	80
4.3.2.2. Ergänzende Untersuchung des <i>MKS1</i> - und <i>JBTS3</i> -Gens	82
4.4. Weitere molekulargenetische Analysen des eigenen Kollektivs	84
4.4.1. Untersuchungen auf homozygote Deletion des <i>JBTS4</i> -Gens	84
4.4.2. Untersuchungen auf die Spleißmutation c.2991+1655A>G des <i>MKS4</i> -/ <i>JBTS5</i> -Gens	85
4.5. Einzelkasuistiken	86
5. Diskussion	91
5.1. Detektionsraten für MKS, JS/JSRD in Abhängigkeit vom klinischen Bild	92

Inhaltsverzeichnis

5.1.1. Mutationsverteilung in den Genen <i>MKS1</i> , <i>MKS3/JBTS6</i> , <i>MKS4/JBTS5</i> , <i>MKS6/JBTS9</i> und <i>JBTS3</i>	94
5.1.2. Bedeutung ergänzender Analysen für MKS und JS/JSRD	96
5.2. Detektionsraten für das BBS in Abhängigkeit vom klinischen Bild und Mutationsverteilung	98
5.2.1. Pränatale Manifestation des BBS	100
5.3. Bedeutung neuer Sequenziertechnologien für die molekulare Diagnostik des MKS, JS/JSRD und BBS	101
5.4. Oligogenie und seltene Varianten bei MKS, JS/JSRD und BBS	103
5.5. Bedeutung der SNP-Array-Analytik für die molekulargenetische Aufklärung von MKS, JS/JSRD und BBS	105
5.5.1. Homozygotie-Screening in blutsverwandten Familien	106
5.5.2. SNP-Array-gestützte Kopienzahlanalysen	111
5.6. Genotyp-Phänotyp-Korrelation und Neudefinition/Modifikation des klinischen Phänotyps	115
5.7. Algorithmus zur molekulargenetischen Aufklärung der Ziliopathien MKS, JS/JSRD und BBS	119
6. Zusammenfassung	123
7. Literatur, alphabetisch	124
8. Anhang	137

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<i>Aqua destillatum</i>
ADPKD	Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
ALMS	Alström-Syndrom
ARPKD	Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
bp	Basenpaare
CNV	Kopienzahlvariante
COACH-Syndrom	Syndrom mit zerebellärer Vermishypoplasie, Oligophrenie, Ataxie, Kolobomen und hepatischer Fibrose
CORS	Zerebro-Okulo-Renales-Syndrom
DGV	Database of Genomic Variants
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DWM	Dandy-Walker-Malformation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPC	Fibrocystin/Polyductin
IFT	Intraflagellar-Transport
JS	Joubert-Syndrom
JSRD	Joubert-Syndrom assoziierte Erkrankung
kb	Kilobasen
LCA	Lebersche Kongenitale Amaurose
LMS	Laurence-Moon-Syndrom
LOD-Score	<i>Logarithm-Of-The-Odds-Score</i>
MAF	<i>Minor-Allele-Frequency</i>
MAPD	<i>Median-Absolute-Pairwise-Difference-Metric</i>
Mb	Megabasen
min	Minute
MKS	Meckel-Gruber-Syndrom
MLPA	<i>Multiplex-Ligation-Dependent-Probe-Amplification</i>
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	<i>Molar-Tooth-Sign</i>
ng	Nanogramm

Abkürzungsverzeichnis

ng/μl	Nanogramm/Mikroliter
NGS	<i>Next-Generation-Sequencing</i>
NPH	Nephronophthise
NTC	Leerwertkontrolle
OFD	Oro-Fazio-Digitales-Syndrom
ORF	Offener Leserahmen
PCM	Perizentrioläre Matrix
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Q-PCR	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
Q-Wert	Qualitätswert
Ref-Seq	<i>Reference-Sequence</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROH	<i>Runs-Of-Homozygosity</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SFF-Datei	<i>Standard-Flowgram</i> -Dateiformat
SLS	Senior-Løken-Syndrom
SNP	<i>Single-Nucleotide-Polymorphism</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
UCSC-Browser	Genom Browser der University of California, Santa Cruz
U/μl	Einheiten pro Mikroliter
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter
μM	Mikrometer

1. Einleitung

1.1. Primäre Zilien und Ziliopathien

Unter primären Zilien versteht man solitär vorkommende Zellausstülpungen der apikalen Zellmembran, die sich während der Arretierung der Zellteilung auf zahlreichen Körperzellen ausbilden können. Der Terminus "primäre Zilie" wurde erstmals im Jahre 1968 durch S. Sorokin eingeführt (Sorokin, 1968). Er beobachtete die rudimentären Organellen an fetalen Rattenlungenzellen mittels Elektronenmikroskopie und unterschied diese bereits von den beweglichen Zilien. Während primäre Zilien bei Vertebraten annähernd ubiquitär auf allen Körperzellen vorkommen, tragen sie bei Wirbellosen nur spezifische Zellen (Gerdes et al, 2009). Eine Sammlung der Zelltypen mit primären Zilien wurde unter <http://www.bowserlab.org/primarycilia/cilialist.html> zusammengetragen. Primäre Zilien treten vor allem an der apikalen Membran von polarisierten Zellen auf. Dennoch befinden sie sich auch auf anderen Zellen wie beispielsweise mesenchymalen Knorpelzellen (Poole et al, 1985). Sie weisen einen charakteristischen Aufbau auf (Abbildung 1.1).

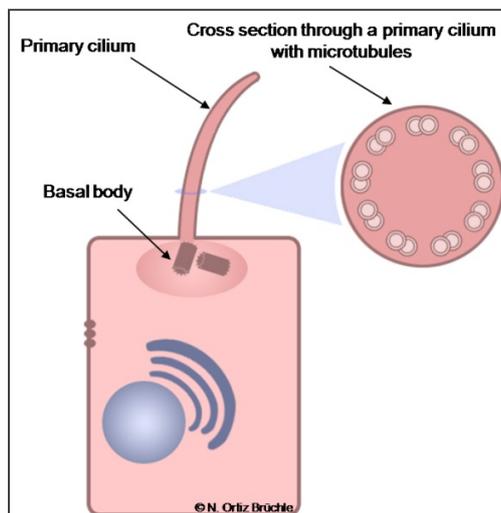


Abbildung 1.1: Querschnitt durch eine Körperzelle mit primärer Zilie und durch den Zilienschiff mit der typischen Mikrotubulstruktur (9+0).

Ihr Gerüst besteht i. d. R. aus neun ringförmig angeordneten Mikrotubulidubletten (9+0). Dieses Zilienaxonem entsteht aus dem sogenannten Basalkörper, einer Struktur, die sich aus der Mutterzentriole am Fuße der Zilie

1. Einleitung

entwickelt. Im Gegensatz zu den motilen Zilien weisen primäre Zilien neben anderen Unterschieden kein zentrales Mikrotubulipaar sowie keine innere Dyneinarme auf (9+2) (Rosenbaum & Witman, 2002). S. K. Dutcher postulierte 1995, dass etwa 150-250 Zilien-, bzw. Basalkörperproteine existieren. Mittlerweile geht man jedoch von ca. 1000 Proteinen aus, die am Stoffwechsel der primären Zilien beteiligt sein könnten (<http://www.ciliaproteome.org/>) (Dutcher, 1995). Auch die Zilienmembran weist eine besondere Proteinzusammensetzung auf, die von der Zellmembran abweicht.

Um das Jahr 2000 wurde beschrieben, dass primäre Zilien bei der Entstehung erblicher polyzystischer Nierenveränderungen eine entscheidende Rolle spielen könnten, da in verschiedenen Mausmodellen mit Nierenzysten die Genprodukte der für den Phänotyp ursächlichen Gene in primären Zilien nachgewiesen werden konnten (Pazour et al, 2000), (Taulman et al, 2001), (Yoder et al, 2002), (Hou et al, 2002). In der Folge konnten unter anderem die ADPKD- (autosomal-dominant erbliche polyzystische Nierenerkrankung) und ARPKD- (autosomal-rezessiv erbliche polyzystische Nierenerkrankung) Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 sowie Fibrocystin/Polyductin in den primären Zilien lokalisiert werden (Yoder et al, 2002), (Ward et al, 2003), (Zhang et al, 2004). Seither wurde die Untersuchung der Funktion der primären Zilien intensiv vorangetrieben. Dies geschah vor allem vor dem Hintergrund einer möglichen Klärung der Pathogenese von humanen erblichen Erkrankungen bei denen die entsprechenden Proteine der von Veränderungen betroffenen Gene in den primären Zilien oder deren assoziierten Strukturen lokalisiert sind. Diese Erkrankungen werden daher unter dem zunehmend gebräuchlicheren Begriff (primäre) Ziliopathien zusammengefasst. Je nach Erkrankung steht eine syndromale oder eine organspezifische Manifestation im Vordergrund. Aufgrund der funktionellen Überschneidungen der Ziliopathie-Proteine finden sich auch phänotypisch partielle Überlappungen zwischen den einzelnen Syndromen wie beispielsweise zwischen dem Joubert-Syndrom (JS) bzw. den Joubert-Syndrom-assoziierten Erkrankungen (JSRD) dem Meckel-Gruber-Syndrom (MKS) und dem Bardet-Biedl-Syndrom (BBS). Weitere Ziliopathien, die hier nicht oder nur differenzialdiagnostisch thematisiert werden sollen, sind beispielsweise die rezessiven und dominanten Zystennieren (ARPKD, ADPKD),

1. Einleitung

die Nephronophthise (NPH), das Senior-Løken-Syndrom (SLS) und medullär-zystische Nierenerkrankung (ADMCKD), das Von Hippel-Lindau-Syndrom (VHL) und die Tuberoöse Sklerose (TSC), das Alström-Syndrom (ALMS), das Kurzrippen-Polydaktylie-Syndrom (SRPS), die Kranio-Ektodermale Dysplasie (Sensenbrenner-Syndrom), das Ellis-van-Creveld-Syndrom (EVC), die Asphyxierende Thoraxdysplasie (Jeune-Syndrom, ATD) sowie das Oro-Fazio-Digitales-Syndrom (OFD). Es folgt ein kurzer Überblick über das aktuelle Verständnis zur Funktion der primären Zilien und der Ziliopathie-Proteine.

1.1.1. Ziliopathie-Proteine

Die Benennung der Ziliopathie-Gene und Genprodukte erfolgt i. d. R. nach der primären Zuordnung zum klinischen Bild in chronologischer Reihenfolge der Entdeckung (*BBS*-Gene/-Proteine, *JBTS*-Gene/-Proteine, *MKS*-Gene/-Proteine *NPHP*-Gene/-Proteine). Durch die phänotypischen Überlappungen ist die Zuordnung jedoch komplex. So wird beispielsweise das *CEP290*-Gen sowohl als *MKS4*-Gen als auch als *JBTS5*, *NPHP6* oder *BBS14* bezeichnet (Tabelle 1.6). Groß angelegte Proteomanalysen machen das Ausmaß der Vernetzung der verschiedenen bekannten Ziliopathie-Proteine zunehmend deutlich (Abbildung 1.2).

Dabei gibt es funktionell erste Vorstellungen von dem Zusammenspiel der einzelnen Proteine und ihrer jeweiligen Funktionen. Einige BBS-Proteine bilden beispielsweise das für die Zilienausbildung essentielle BBSome aus, ein Proteinkomplex ohne Membranabgrenzung, der sowohl im Zytoplasma am Zentrosom als auch an der Zilienmembran nachgewiesen wurde. Es spielt eine Rolle bei der Proteinsortierung in die Zilie und aus dieser heraus. Die NPH-JS-MKS-Proteine hingegen formen keinen distinkten Proteinkomplex. Phänotypische Überlappungen zwischen den Syndromen ergeben sich somit vermutlich primär aus den gemeinsam involvierten Signalwegen (van Reeuwijk et al, 2011).

1. Einleitung

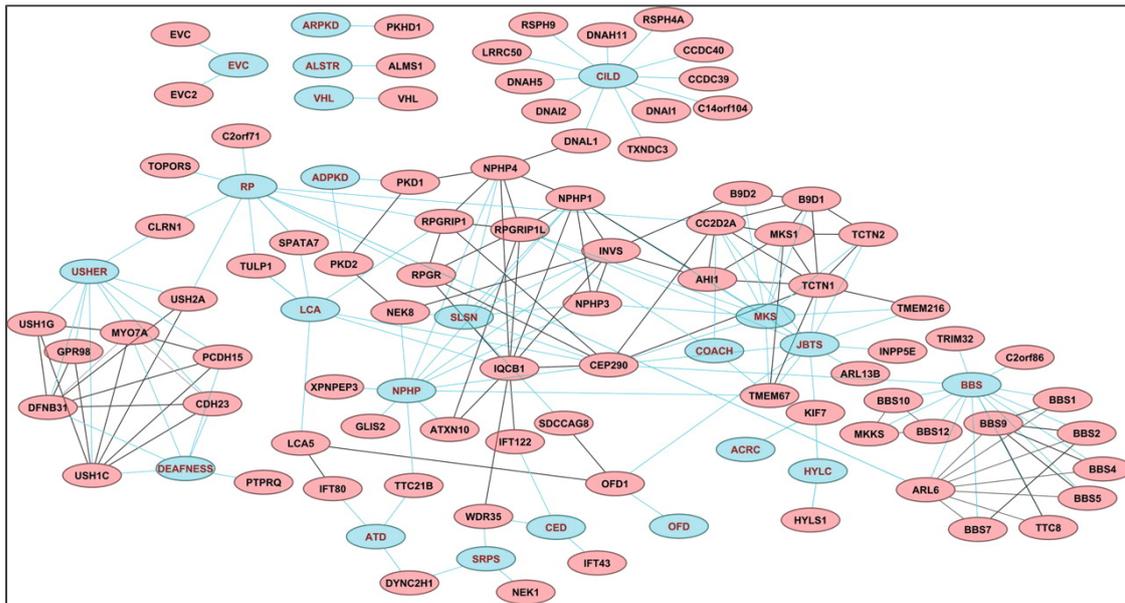


Abbildung 1.2: Proteinnetzwerk der Ziliopathie-Proteine: Blaue Verbindungen stellen die Assoziation zu der jeweiligen Ziliopathie und graue Verbindungen bekannte Proteininteraktionen dar (van Reeuwijk et al, 2011). (USHER= Usher-Syndrom, DEAFNESS= Taubheit, RP= Retinitis pigmentosa, LCA= Lebersche kongenitale Amaurose, EVC= Ellis-van-Creveld-Syndrom, ARPKD= Rezessive Zystennieren, ALST= Alström-Syndrom, VHL= Von Hippel-Lindau-Syndrom, ADPKD= Dominante Zystennieren, SLSN= Senior-Løken-Syndrom, NPHP= Nephronophthise, ATD= Asphyxierende Thoraxdysplasie (Jeune-Syndrom), SRPS= Kurzrippen-Polydaktylie-Syndrom, CED= Kranio-Ektodermale Dysplasie (Sensenbrenner-Syndrom), OFD= Oro-Fazio-Digitale-Syndrome, MKS= Meckel-Gruber-Syndrom, JBTS= Joubert-Syndrom und assoziierte Erkrankungen, COACH= COACH-Syndrom, ACRC= Akrokallosal-Syndrom (Typ Schinzel), HYLCS= Hydrolethalus-Syndrom, BBS= Bardet-Biedl-Syndrom)

Entsprechend ihrer funktionellen Vernetzung zeigen die primären Ziliopathien phänotypische Überlappungen und ähnliche Organbeteiligungen. Die Arbeitsgruppe um J. L. Badano veranschaulichte dies, indem sie 2006 allein auf der Basis der klinischen Symptome prognostizierte, dass es sich sowohl beim Ellis-van-Creveld-Syndrom als auch beim Jeune-Syndrom um primäre Ziliopathien handeln müsse. Für beide Syndrome konnte dies später funktionell belegt werden (Badano et al, 2006). Abbildung 1.3 zeigt wesentliche bei primären Ziliopathien betroffene Organsysteme und die hierbei jeweils potentiell involvierten Signalwege.

Wenngleich bei den verschiedenen Ziliopathien oftmals die gleichen Organsysteme betroffen sind, können der Manifestationszeitpunkt von Veränderungen und die Art der Veränderungen selbst stark divergieren. Zum

1. Einleitung

Teil können dysplastische, zum Teil degenerative Prozesse im Vordergrund stehen.

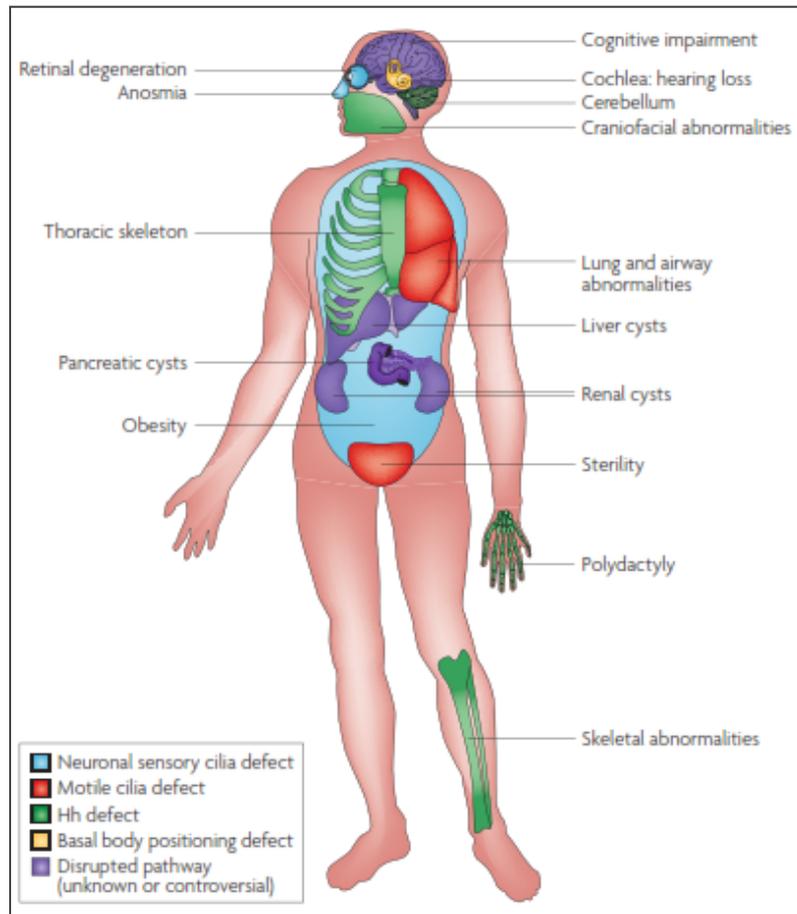


Abbildung 1.3: Organbeteiligung bei Ziliopathien in den mit Zilien ausgestatteten Geweben (Goetz & Anderson, 2010).

Die Aufklärung der Funktion der verschiedenen Ziliopathie-Proteine in den betroffenen Organsystemen ist Gegenstand intensiver Forschung. In der Niere wird unter anderem eine mechanosensorische und chemosensorische Funktion mit Reaktion auf die chemische Zusammensetzung des Urins diskutiert. Außerdem kann durch Fusion der Zilienmembran mit speziellen Vesikeln eine Zell-Zell-Interaktion stattfinden (Hogan et al, 2009). Die Tatsache, dass sich die Manifestation beispielsweise der Nierenveränderungen bei den verschiedenen Ziliopathien mitunter stark unterscheidet verdeutlicht die vielfältigen Funktionen von Zilienproteinen sowie die Komplexität der involvierten intra- und extraziliären Abläufe.

1.2. Klinik und Genetik der primären Ziliopathien

Die Hauptmerkmale und molekulargenetischen Grundlagen der in dieser Arbeit untersuchten primären Ziliopathien sollen hier kurz wiedergegeben werden.

1.2.1. Meckel-Gruber-Syndrom (MKS)

Die Beobachtung zweier Neugeborener mit okzipitaler Meningo-Enzephalozele, Polydaktylie, bilateral vergrößerten zystischen Nieren, Mikrozephalie und Gaumenspalte regte Johann Friedrich Meckel den Jüngeren 1822 zu einer ausgedehnten Fallbeschreibung hierüber an (Meckel, 1822). 1934 ergänzte Georg Benno Gruber diese um weitere 16 Fälle mit Enzephalozele und zystischer Nierendysplasie. Bei einem Teil der Feten fand sich ebenfalls eine Polydaktylie. Er benannte das Syndrom als „Dysencephalia Splanchnocystica“ (Gruber, 1934). J. M. Opitz und J. J. Howe schlugen schließlich 1969 in Verbindung mit einer weiteren Fallbeschreibung die Benennung als MKS vor. Interessanterweise stellte sich später heraus, dass der von Opitz und Howe beschriebene Fall nicht an einem MKS, sondern an einem Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, einer Differenzialdiagnose des MKS litt (Opitz & Howe, 1969). Tabelle 1.1 und Abbildung 1.4 fassen die wesentlichen Daten zum MKS zusammen. Die Diagnose wird pränatal oder unmittelbar postnatal gestellt. Mitunter wurden Veränderungen im pränatalen Ultraschall bereits im 1. Schwangerschaftstrimenon (ab 11. SSW) nachgewiesen. Das MKS gilt als häufigste erbliche Ursache für syndromale Neuralrohrdefekte. Die Diagnose ist i. d. R. aufgrund des Schweregrads der ZNS- und Nierenfehlbildungen nicht mit dem Leben vereinbar. Eine von F. C. Fraser und A. Lytwyn durchgeführte Studie vermittelt einen Eindruck über die Bandbreite der klinischen Veränderungen beim MKS (Fraser & Lytwyn, 1981). Sie beschrieben systematisch die klinischen Auffälligkeiten von 38 betroffenen Geschwistern von insgesamt 27 MKS-Indexfeten. Als gemeinsames Merkmal zeigten alle Feten bilaterale zystische Nierendysplasien, eine Polydaktylie fand sich bei 85 % der Indexfeten jedoch nur bei 55 % der betroffenen Geschwister. Insgesamt zeigten sich bei 100 % der Indexpatienten ZNS-Auffälligkeiten, diese wurden aber nicht bei allen Geschwistern nachgewiesen (82 %). Die klinischen Übergänge zu

1. Einleitung

anderen Ziliopathien, v. a. zum/zu JS/JSRD und zum pränatal manifesten BBS, sind fließend. Dies wurde beispielsweise für kanadische Hutterer Familien dokumentiert (Boycott et al, 2007). Hier wurde die initiale Verdachtsdiagnose MKS später revidiert und die Veränderungen als JSRD aufgrund der charakteristischen Gehirn-Auffälligkeiten und z. T. fehlenden Nierenveränderungen klassifiziert.

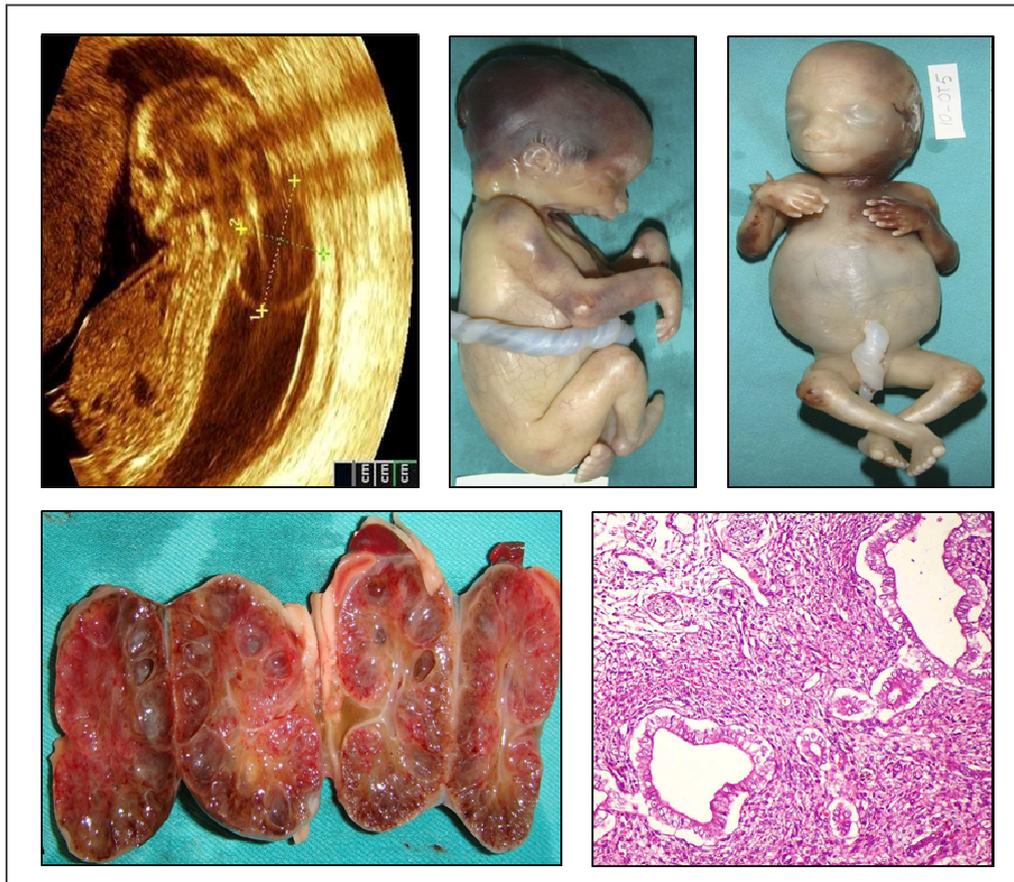


Abbildung 1.4: Klinische Manifestation des MKS. Oben links: Mit pränataler Darstellung einer okzipitalen Enzephalozele, oben mittig und rechts: Extrauteriner Aspekt mit vorgewölbter Bauchdecke durch massive Vergrößerung der Nieren und Polydaktylie; unten links: Multizystisch-dysplastische MKS-Nieren und histopathologische Darstellung des Leberparenchyms mit Malformation der Duktalplatte und periportalere Fibrose (Hakverdi et al, 2010).

Klinische und genetische Überlappungen finden sich auch zur Renalen Hepatischen Pankreatischen Dysplasie (RHPD, Goldston-Syndrom). Bei dem von B. I. Ivemark und Arbeitsgruppe beschriebenen Syndrom stehen pränatal bzw. perinatal als Symptome zystische Nierenveränderungen, eine Leberfibrose und eine zystische Pankreasdysplasie (Ivemark et al, 1959) im Vordergrund. Als Ursache wurden Mutationen im *NPHP3*-Gen, welches ebenfalls mit dem

1. Einleitung

MKS und der NPH assoziiert ist, beschrieben (Bergmann et al, 2008), (Fiskerstrand et al, 2010).

Tabelle 1.1: Klinische Merkmale des MKS.

Meckel-Gruber-Syndrom (MKS)	
Inzidenz:	<ul style="list-style-type: none"> • 1:13.250 (USA, ^{Holmes et al, 1976}) – 1:140.000 (Südenland, ^{Seller, 1978}) • 1:9.000 (Finnland, ^{Salonen & Norio, 1984}), 1:135.000 (Deutschland, ^{Auber et al, 2007}), • Bis zu 1:2.000 - 1:3.530 Jerusalem/Kuwait, (generell in arabischer Population hoch, ^{Teebi, 1994, 2005})
Manifestation:	<ul style="list-style-type: none"> • pränatal
Differenzialdiagnosen:	<ul style="list-style-type: none"> • Chromosomenstörungen (Trisomie 13, 18), Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, Fryns-Syndrom, Fraser-Syndrom, Hydrolethalus-Syndrom, CDG-Syndrom • Fließende Übergänge zu anderen syndromalen Ziliopathien: pränatal manifestes Joubert-Syndrom mit Nierenbeteiligung, pränatal manifestes Bardet-Biedl-Syndrom • In atypischeren Einzelfällen Überlappungen zu anderen pränatal auftretenden Nierenerkrankungen: Nephronophthise, ARPKD
Klinische Hauptkriterien beim Meckel-Gruber-Syndrom:	
Nieren:	<ul style="list-style-type: none"> • Multizystische Nierendysplasie Typ Potter IIA i. d. R. mit Organvergrößerung (100%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981, Sergi et al, 2000})
ZNS:	<ul style="list-style-type: none"> • Okzipitale Meningo-Enzephalozele (63-89%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981})
Skelett:	<ul style="list-style-type: none"> • Postaxiale Polydaktylie (55-85%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981})
Leber:	<ul style="list-style-type: none"> • Portale Fibrose/Duktalplattenmalformation (32-48%, ^{Jones & Smith, 2006}/100%, ^{Sergi et al, 2000})
Seltener beschriebene Symptome:	
Kraniofaziale Auffälligkeiten:	<ul style="list-style-type: none"> • Mikrozephalie; Anenzephalus (11-13%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981}) • Dandy-Walker-Malformation; Hydrozephalus (7-21%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981}) • Mikrognathie; Spaltbildung (30-32%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981}) • Klumpfüße (vermutlich meist durch Olighydramnie bedingt) • Augenfehlbildungen (Anophthalmie, Mikrophthalmie, Kolobome, 21-37%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981})
Sonstiges:	<ul style="list-style-type: none"> • Intrauterine Wachstumsretardierung • Milzanomalien (Milzhypoplasie, akzessorische Milz, Polysplenie, 16-22%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981}) • Herzfehler (Ventrikelseptumdefekte, Stenosen, Gefäßrotationen, Dextrokardie, 26-41%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981}) • Genitaltrakt-Anomalien (Penishypoplasie, 26-30%, ^{Fraser & Lytwyn, 1981})
Vereinzelt beschriebene Symptome:	
Situs inversus, Hufeisenniere, Harnleiter-, Blasen hypo- und aplasie, Leberzysten, Vaginalatresie, Uterus bicornis, Analatresie, Larynxfehlbildungen, weitere Hirn(stamm)fehlbildungen	

1. Einleitung

Nachdem der erste Locus für das autosomal-rezessiv erbliche MKS 1995 mittels finnischer Familien für Chromosom 17q21-q24 kartiert wurde (Paavola et al, 1995), ergaben sich 1997 erste Hinweise auf Locusheterogenie (Paavola et al, 1997). Mutationen im *MKS1*-Gen und somit das erste *MKS*-Gen wurde schließlich 2006 publiziert (Kyttälä et al, 2006). In der genannten Arbeit wurde bereits der Zusammenhang zu primären Zilien hergestellt, da sich für das *MKS1*-Genprodukt aus Proteomanalysen eine Funktion in Verbindung mit diesen ergab. Tabelle 1.5 fasst die weiteren bis dato identifizierten *MKS*-Gene zusammen.

1.2.2. Joubert-Syndrom (JS) und assoziierte Erkrankungen (JSRD)

A. De Haene beschrieb 1955 erstmals eine familiäre partielle Vermisagenesie mit Hypotonie und Tremor (De Haene, 1955). M. Joubert und Arbeitsgruppe veröffentlichten wiederum 1969 eine entfernt blutsverwandte, franko-kanadische Familie mit vier Betroffenen und einem sehr ähnlichen klinischen Bild (Joubert et al, 1969). Neben der Vermisagenesie zeigte ein Patient eine Meningomyelozele. Außerdem wurden episodische Hyperpnoen eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung und eine Augenbewegungsstörung diagnostiziert. Die Bezeichnung des distinktes Syndroms JS wurde schließlich 1977 im Zusammenhang mit weiteren Fallbeschreibungen eingeführt (Boltshauser & Isler, 1977). Als pathognomonisches Merkmal des JS wurde das so genannte *Molar-Tooth-Sign* (MTS) im axialen, T1-gewichteten Gehirn-MRT definiert (Abbildung 1.5). Dies zeichnet sich durch eine Agenesie/Hypoplasie des Kleinhirn(ober)wurms, eine tief eingezogene hintere Fossa interpedicularis und prominente superiore Kleinhirnstiele aus. Es entsteht durch eine Fehlentwicklung des Mittelhirns und Kleinhirns (Maria et al, 1997). Die Untersuchung einer JS-Patientenkohorte mit den typischen Gehirnauffälligkeiten und weiteren Organmanifestationen wie etwa Nierenzysten, Kolobomen, Retinaveränderungen oder einer hepatischen Fibrose führte zur Einführung des Terminus Joubert-Syndrom-assoziierte Syndrome (Chance et al, 1999). Hierzu zählen beispielsweise das Dekaban-Arima-Syndrom oder das COACH-Syndrom. Bisher hat sich keine einheitliche vereinfachte Klassifizierung der Syndrome durchsetzen können wie etwa von

1. Einleitung

E. Valente und ihrer Arbeitsgruppe 2008 vorgeschlagen (Valente et al, 2008). Wenngleich die beim JS auftretenden neurologischen Veränderungen i. d. R. mit dem MTS im MRT assoziiert sind, gestaltet sich die klinische Diagnosestellung aufgrund der genetischen Überlappungen oft komplex. Mutationen in der Mehrzahl der *JBTS*-Gene können auch bei Familien ohne MTS mit klinischer Ausprägung eher im Sinne anderer Ziliopathien wie etwa dem MKS auftreten, wobei die klinischen Übergänge fließend sind. Selbst innerhalb einer Familie können divergente Phänotypen auftreten. Die Prognose hängt maßgeblich von der phänotypischen Ausprägung bei dem einzelnen Patienten und dem Auftreten möglicher sekundärer Komplikationen wie etwa Aspirationspneumonien ab.

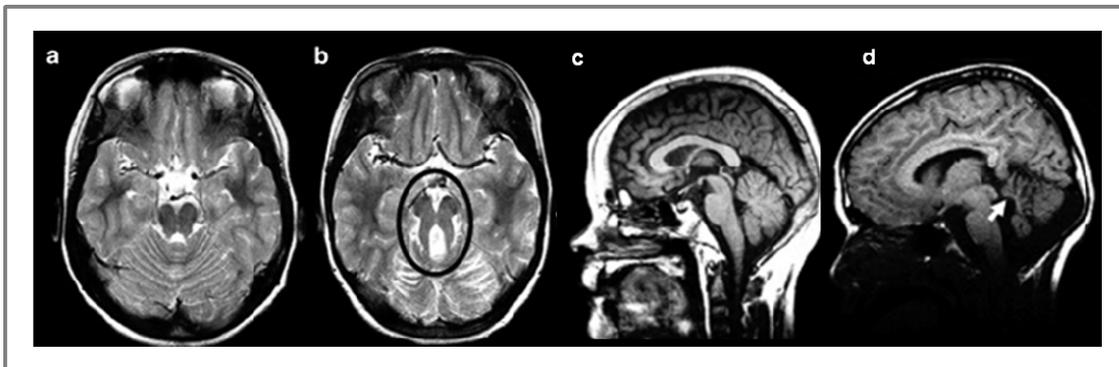


Abbildung 1.5: MRT-Befunde bei JS. a, c) Unauffälliges Gehirn-MRT b, d) MTS und Kleinhirnwurmagenesie bei einem JS-Patienten (Parisi et al, 2007).

Klinische Daten zum Syndrom sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst. Tabelle 1.3 zeigt die Einteilung der JSRD nach zusätzlich auftretenden Organmanifestationen wie verschiedentlich vorgeschlagen.

Die erste Loci für das i. d. R. autosomal-rezessiv erbliche Syndrom wurde 1999 (9q34.3) (Saar et al, 1999) und 2003 (perizentrischer Bereich des Chromosoms 11) kartiert (Valente et al, 2003), (Keeler et al, 2003). 2004 konnten erstmals Mutationen im *NPHP1*-Gen, welche zunächst als Ursache für die autosomal-rezessive NPH beschrieben wurden, bei einem Teil der Patienten mit JS identifiziert werden (Parisi et al, 2004). 2006 konnte für die JSRD die Zuordnung zu den primären Ziliopathien durch Detektion von Mutationen im *CEP290*/*JBTS5*-Gen bestätigt werden. Das Genprodukt wurde dem entsprechend in primären Zilien nachgewiesen (Valente et al, 2006b). Bis dato

1. Einleitung

konnten zahlreiche weitere für das/die JS/JSRD verantwortliche Gene identifiziert werden. Diese sind in Tabelle 1.5 zusammengefasst.

Tabelle 1.2: Klinische Merkmale des klassischen JS.

Joubert-Syndrom (JS)	
Inzidenz:	<ul style="list-style-type: none"> • 1:80.000-1:100.000 (derzeit angenommen, ^{Parisi et al, 2007}) • Heterozygotenfrequenz: 1:160 (derzeit angenommen, ^{Parisi et al, 2007})
Manifestation:	<ul style="list-style-type: none"> • Perinatal, (pränatal)
Differenzialdiagnosen:	<ul style="list-style-type: none"> • Bei Nachweis des MTS: per Definition keine Differenzialdiagnose • Klinisch: andere primäre Ziliopathien wie MKS, BBS, OFD, andere Erkrankungen mit Kleinhirnbeteiligung
Klinische Hauptkriterien des Joubert-Syndroms:	
Schädel-MRT/ZNS:	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Molar-Tooth-Sign</i> im MRT, =>pathognomonisch (100%, ^{Parisi et al, 2007}) • Hypotonie/Ataxie fallen im Neugeborenen/Kindesalter auf (100%, ^{Parisi et al, 2007}) • Variable, milde bis schwere (psycho-) motorische Entwicklungsverzögerung, verzögerte Meilensteine (annähernd 100%, ^{Parisi et al, 2007}) • Hypo-/Hyperpnoe-Episoden vor allem bei Neugeborenen (68%-88%, ^{Chance et al, 1999}) • Augenbewegungsstörungen v.a. Nystagmus, Okulomotorische Apraxie Cogan Typ II (72-79%, ^{Chance et al, 1999})
Sonstiges:	<ul style="list-style-type: none"> • Faziale Dysmorphien
Seltener beschriebene Symptome:	
ZNS:	<ul style="list-style-type: none"> • Weitere Hirnstammauffälligkeiten (30%, ^{Poretti et al, 2011}): Corpus callosum Dysgenese, Ventrikulomegalie, Hippocampus Malrotation, Migrationsstörungen • Dandy-Walker-Malformation (10%, ^{Parisi et al, 2007}) • Okzipitale (Meningo/Enzephalo)-zele (6%, ^{Doherty et al, 2009})
Skelettbeteiligung:	<ul style="list-style-type: none"> • Meist postaxiale Polydaktylie (8%-19%, ^{Chance et al, 1999, Doherty et al, 2009})
In Einzelfällen beschriebene Symptome:	
<ul style="list-style-type: none"> • Lateralisierungsdefekte: Situs inversus, Morbus Hirschsprung; Jeune-Dystrophie; sekundäre Skoliose; Polymikrogyrie, isolierter Hydrozephalus; Mikrozephalie, Makrozephalie, Choanalatresie, Duodenalatresie; Endokrine Störungen: Panhypopituitarismus, Mikropenis, Adipositas; Autismus; Epilepsie/EEG-Auffälligkeiten; Verhaltensauffälligkeiten; Hörstörung; Herzfehlbildungen 	

1. Einleitung

Tabelle 1.3: Vorgeschlagene Einteilung der JSRD nach Organmanifestationen (Parisi & Glass, 2003 [updated 2012]). (CORS-Syndrom= Cerebro-Oculo-Renales Syndrom, COACH-Syndrom mit cerebellärer Vermishypoplasie, Oligophrenie, Ataxie, Kolobomen und hepatischer Fibrose, OFD= Oro-Fazio-Digitales-Syndrom)

Joubert-Syndrom-assoziierte Erkrankungen (JSRD):
JS mit Nierenbeteiligung: (2-30%, ^{Doherty et al, 2009}) <ul style="list-style-type: none">• Mehrheitlich mit Nierenveränderungen im Sinne einer Nephronophthise, seltener: große, zystisch durchsetzte Nieren; auch in Kombination mit Retina-Degeneration (Dekaban-Arima-Syndrom; CORS-Syndrom)
JS mit Augenbeteiligung: (78% auffälliges ERG in <i>Follow-up</i> von 18 Patienten, ^{Hodgkins et al, 2004}) <ul style="list-style-type: none">• Mehrheitlich Retina-Degeneration, auch (chorioretinale) Kolobome (4-19%, ^{Doherty et al, 2009}) v.a. beim COACH-Syndrom, Lebersche kongenitale Amaurose (LCA), Papillendrusen, auch in Kombination mit Nierenveränderungen (Dekaban-Arima-Syndrom; CORS-Syndrom)
JS mit Leberbeteiligung: (9-18%, ^{Doherty et al, 2009}) <ul style="list-style-type: none">• Leberfibrose; COACH-Syndrom v.a. mit Kolobomen (71%, ^{Doherty, 2010}) und Nierenveränderungen (42%, ^{Doherty, 2010}) assoziiert
JS mit orofaziodigitaler Beteiligung: <ul style="list-style-type: none">• Polydaktylie auch präaxial/mesaxial, Spaltbildung, Zungenauffälligkeiten (Hamartome der Zunge, lobulierte Zunge), Synonym: OFD VI, Varadi-Papp-Syndrom

1.2.3. Bardet-Biedl-Syndrom (BBS)

Nachdem J. Z. Laurence und R. C. Moon erstmals 1866 ein Syndrom mit Adipositas, Retinitis Pigmentosa und mentaler Retardierung beschrieben (Laurence & Moon, 1866), folgten ähnliche Fallbeschreibungen erst in den 1920er Jahren durch G. Bardet und A. Biedl, (Bardet, 1920), (Biedl, 1922). Sie ergänzten das klinische Spektrum um eine Polydaktylie und einen Hypogonadismus. 1925 wurde für das beschriebene Syndrom die Bezeichnung "Laurence-Moon-Bardet-Biedl-Syndrom (LMBBS)" vorgeschlagen (Solis-Cohen & Weiss, 1925). Die von Laurence und Moon beschriebenen Patienten wiesen jedoch im Gegensatz zu den BBS-Patienten eine progrediente spastische Paraparese und keine Polydaktylie auf. Nach kurzfristiger Trennung der Syndrome wurden klinische Überlappungen innerhalb von Familien beschrieben und bei LMS-Patienten Mutationen in den *BBS*-Genen detektiert. Heute geht man daher eher von einem Syndrom aus (Moore et al, 2005). Klinische Überlappungen gibt es außerdem zum Alström-Syndrom, einer weiteren primären Ziliopathie, die durch Mutationen im *ALMS1*-Gen verursacht wird. Die

1. Einleitung

klinische Diagnose eines BBS wird anhand von Haupt- und Nebenkriterien meist im Kindesalter (durchschnittlich mit 9 Jahren) gestellt (Beales et al, 1999). Tabelle 1.4 fasst die wesentlichen Daten zum BBS zusammen. Meist fällt neben der bestehenden Polydaktylie zunächst eine milde bis moderate Entwicklungsverzögerung und eine sich ab dem 1.-3. Lebensjahr schleichend entwickelnde Fettleibigkeit auf (Abbildung 1.6). Die Prognose ist insgesamt eher günstig, hängt aber u. a. von dem Schweregrad und der Progredienz der Nierenfunktionsstörungen ab. Zu berücksichtigen sind ebenfalls mögliche Sekundärfolgen der Adipositas und Nierenveränderungen wie etwa das Auftreten von Bluthochdruck, Störungen im Glukose-Metabolismus bis hin zu Diabetes mellitus, eine Hyperlipidämie und kardiale Risiken wie eine hypertrophe oder dilatative Kardiomyopathie.

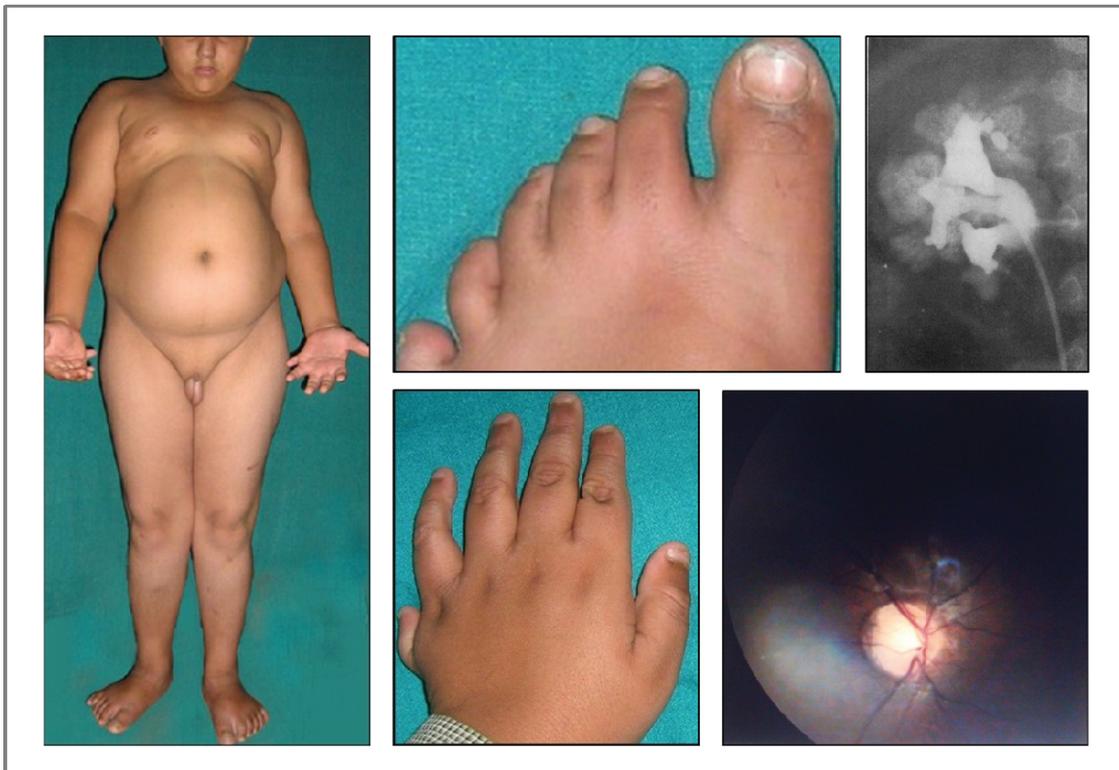


Abbildung 1.6: Klinische Auffälligkeiten beim BBS. Merkmale sind u. a.: Fettleibigkeit, Hypogonadismus, postaxiale Polydaktylie, keulenförmige Nierenkelch-Erweiterungen in Nierenurographie und Augenhintergrund bei Fundus-Untersuchung. Retinale Veränderungen lassen sich oft erst im Jungendalter darstellen (Bluett et al, 1977), (Kumar et al, 2012).

Schwerere bereits pränatal manifeste Verläufe wurden für Mutationen in den Genen *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS10* berichtet. Hierbei zeigen sich phänotypische Überlappungen zum MKS (*Meckel-Like*), da im pränatalen Ultraschall eine multizystische Nierendysplasie meist mit Fruchtwassermangel

1. Einleitung

sowie eine Polydaktylie und zum Teil auch ZNS-Fehlbildungen (Dandy-Walker-Malformation (DWM)) auffallen (Karmous-Benailly et al, 2005), (Putoux et al, 2010).

Tabelle 1.4: Klinische Merkmale des BBS (Beales et al, 1999)

Bardet-Biedl-Syndrom (BBS)	
Inzidenz:	<ul style="list-style-type: none"> • 1:140.000-160.000 (Nordamerika, Europa, ^{Katsanis et al, 2001}) • 1:13.500 Kuwait, 1:17.500 Neufundland (^{Katsanis et al, 2001})
Manifestation:	<ul style="list-style-type: none"> • Kindesalter (Diagnose ø mit 9 Jahren), (pränatal/perinatal)
Differenzialdiagnosen:	<ul style="list-style-type: none"> • Allelisch: McKusick-Kaufman-Syndrom; Cohan-Syndrom • Andere primäre Ziliopathien wie das Alström-Syndrom, z.T. Joubert-Syndrom, bei pränataler Manifestation <i>Meckel-Like</i>
Klinische Hauptkriterien des Bardet-Biedl-Syndroms: Beim Vorliegen von 4 Hauptkriterien gilt die Diagnose als bestätigt	
Augen: ZNS: Urogenitaltrakt: Skelett: Sonstiges:	<ul style="list-style-type: none"> • Stäbchen-Zapfen-Dystrophie (93%, ^{Beales et al, 1999}, Manifestation oft zunächst als Nachtblindheit ø ab dem 7.-8. Lebensjahr) • Milde bis moderate Lernbehinderung (62%, ^{Beales et al, 1999}, durch unerkannte Visuseinschränkungen oft schwerer oder fehleingeschätzt) • Nierenbeteiligung (24%, ^{Beales et al, 1999}, in systematischer Untersuchung bei >16 J. bei 82% der Patienten Funktionseinschränkung, ^{Imhoff et al, 2011}) • Männlicher Hypogonadismus (88%, ^{Jones & Smith, 2006}) • Postaxiale Polydaktylie (69%, ^{Beales et al, 1999}) • Adipositas, etwa ab dem 1. Lebensjahr zunehmend (72-96%, ^{Katsanis et al, 2001}, nach durchlaufener Pubertät)
Klinische Nebenkriterien des Bardet-Biedl-Syndroms: Beim Vorliegen von 3 Hauptkriterien und 2 Nebenkriterien gilt die Diagnose als bestätigt	
ZNS: Auge: Skelett: Sonstiges:	<ul style="list-style-type: none"> • Entwicklungsverzögerung (50%, ^{Beales et al, 1999}) • Ataxie (50%, ^{Beales et al, 1999}) • Strabismus, Katarakt, Astigmatismus (63%, ^{Jones & Smith, 2006}) • Brachydaktylie, Syndaktylie (50%, ^{Jones & Smith, 2006}) • Diabetes mellitus (6%, ^{Beales et al, 1999}) • Sprachstörung (54%, ^{Beales et al, 1999}) • Zahnfehlbildungen (27%, ^{Beales et al, 1999}, Malokklusion, Schmelzhypoplasien) • Angeborene Herzbeteiligung (7%, ^{Beales et al, 1999}) • Leberfibrose (vereinzelt)
Seltener oder in Einzelfällen beschriebene Symptome:	
<ul style="list-style-type: none"> • Lateralisierungsdefekte: Situs inversus, Morbus Hirschsprung; Makrozephalie; Hirsutismus; Hörstörung; Anosmie; Kraniofaziale Dismorphien; Minderwuchs, UGT bei weiblichen Betroffenen: Vaginalatresie, Hydrometrocolpos; Gallensteine, Nystagmus, Glaukome 	

1. Einleitung

Locusheterogenie wurde aufgrund von familiären Kopplungsdaten bereits früh für das BBS nachgewiesen (Kwitek-Black et al, 1993). Die Identifikation ursächlicher Gene begann um das Jahr 2000 mit dem Nachweis von Mutationen im *MKKS-* (*BBS6-*) Gen (Katsanis et al, 2000), (Slavotinek et al, 2000). In der Folge wurden Mutationen in zahlreichen weiteren Genen beschrieben (Tabelle 1.5). Neben einer autosomal-rezessiven Vererbung wird derzeit angenommen, dass möglicherweise bei etwa 10 % der Familien eine komplexere, multiallelische Vererbung vorliegen könnte (Waters & Beales, 1993).

Die Verbindung zu den primären Zilien wurde erstmals 2003 für das BBS hergestellt, da bei einem Patienten mit BBS und Situs inversus eine homozygote Mutation im *BBS8*-Gen nachgewiesen werden konnte. Für das Genprodukt konnte ein funktioneller Zusammenhang zu Zilien nachgewiesen werden (Ansley et al, 2003).

1.2.4. Differenzialdiagnosen

Durch die extreme klinische Variabilität der o.g. syndromalen primären Ziliopathien ergeben sich mitunter differenzialdiagnostisch fließende Übergänge zu den nicht-syndromalen Ziliopathien wie etwa der NPH und zu den rezessiven Zystennieren sowie zu Nierendysplasien anderer Genese und verschiedenen Chromosomenstörungen mit Nieren- und/oder ZNS-Beteiligung. Die Gruppe um M. Gunay-Aygun beschrieb 2009 drei Familien mit milder mentaler Retardierung bei ARPKD-artigen Nierenveränderungen (Gunay-Aygun et al, 2009). Die rezessiven Zystennieren werden durch Mutationen im *PKHD1*-Gen auf Chromosom 6p12 verursacht. In den genannten Familien konnten jedoch pathogene Mutationen im *MKS3-/JBTS6*-Gen nachgewiesen werden. Eine früh auftretende renale Anämie ließ differenzialdiagnostisch auch an eine NPH denken. Hierbei treten allerdings mehrheitlich normalgroße bis kleine Nieren mit spät auftretenden Zysten am Mark-Rinden-Übergang auf. Vergrößerte Nieren wurden beispielsweise in Verbindung mit Mutationen im *NPHP2*-Gen auf Chromosom 9q31.1 bei pränataler Manifestation beobachtet (Haider et al, 1998). Als Abgrenzung zur ARPKD ergab eine histopathologische Beurteilung

1. Einleitung

lediglich das Fehlen der für die ARPKD charakteristische Duktalplattenmalformation der Leber. Pränatale Nierendysplasien mit dem klinischen Bild einer ARPKD, vereinzelt auch in Verbindung mit Leberveränderungen, können auch bei Mutationen des *HNF1 β* -Gens auf Chromosom 17q12 oder bei einer seltenen Frühmanifestation der dominanten Zystennieren – verursacht durch Mutationen im *PKD1*- und *PKD2*-Gen – auftreten.

1.2.5. Gemeinsame molekulargenetische Grundlagen

Die o. g. primären Ziliopathien sind bei extremer Heterogenie mehrheitlich autosomal-rezessiv erblich. Sie verhalten sich teilweise allelisch zueinander. Mutationen in vielen der im Folgenden aufgezählten Gene können beispielsweise entweder ein MKS oder ein/eine JS/JSRD bedingen. Tabelle 1.5 fasst die derzeit bekannten *JBTS*-, *MKS*- und *BBS*-Gene zusammen. Anzumerken ist, dass aufgrund der rasanten Entwicklungen im Feld – vor allem durch den Einsatz von Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien (*Exome-Sequencing*) bei Familien ohne Mutation in den bekannten Genen – kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden kann.

Neben den o. g. klassischen Vererbungsmustern werden darüber hinaus modifizierende Gene mit Einfluss auf die phänotypische Ausprägung z. B. für die NPH diskutiert. Heterozygote Mutationen im *NPHP6*- oder *AHI1*-Gen wurden bei NPH-Patienten mit homozygoten Deletionen des *NPHP1*-Gens und zusätzlicher neurologischer Symptomatik in einer entsprechenden Studie gehäuft beobachtet (Tory et al, 2007). Führen diese zusätzlichen Mutationen in homozygoter oder *compound*-heterozygoter Form nicht zu einer phänotypischen Ausprägung oder zu einem deutlich milderem Phänotyp, werden diese als hypomorphe Mutationen bezeichnet (Leitch et al, 2008), (Otto et al, 2009). Tri-/Multiallelische/Oligogene Vererbung wurde für das BBS beschrieben (Katsanis et al, 2001), (Beales et al, 2003). Hierbei reichen zwei rezessive Mutationen allein in einem *BBS*-Gen nicht zur Ausprägung der Klinik aus. Erst in Verbindung mit einer dritten Mutation in einem weiteren *BBS*-Gen kommt es zur Ausprägung des klinischen Bildes. Tabelle 1.6 zeigt das bisher

1. Einleitung

angenommene Ausmaß der genetischen Überlappungen für die oben beschriebenen Ziliopathien auf.

Tabelle 1.5: Derzeit bekannte ursächliche Gene für die in dieser Arbeit thematisierten primären Ziliopathien.

Primäre Ziliopathie	Erbgang	Gene (Locus)	gebräuchliche Synonyme
<p>Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) (und z.T. auch McKusick-Kaufman-Syndrom (MKKS))</p> <p>Weitere assoziierte Gene (BBS-Modifizier/BBS-Like): MKS3 (8q21.13-q22.1) SDCCAG8 (1q43) (BBS16?) CCDC28B (1p35.1) LZTFL1 (3p21.31)</p>	AR (Oligogen)	<p>BBS1 (11q13) BBS2 (16q21) BBS3 (3p12-q13) BBS4 (15q22.3-q23) BBS5 (2q31) BBS6 (20p12) BBS7 (4q27) BBS8 (14q32.1) BBS9 (7p14) BBS10 (12q21.2) BBS11 (9q31-q34.1) BBS12 (4q27) BBS13 (17q23) BBS14 (12q21.3) BBS15 (2p15)</p>	<p>ARL6</p> <p>MKKS</p> <p>TTC8 PTHB1</p> <p>TRIM32</p> <p>MKS1 CEP290, MKS4, JBTS5, NPHP6 WDPCP, C2ORF86</p>
<p>Joubert Syndrom (JS), Joubert-Syndrom assoziierte Erkrankung (JSRD), z. B. Dekaban–Arima-Syndrom, COACH-Syndrom</p> <p>Weitere assoziierte Gene: TCTN2 (12q24.31) EXOC8 (1q42.2)</p>	AR, (JBTS10: X-Chromo- somal)	<p>JBTS1 (9q34.3) JBTS2 (11q13) JBTS3 (6q23.3) JBTS4 (2q13) JBTS5 (12q21.3) JBTS6 (8q21.13-q22.1) JBTS7 (16q12.2) JBTS8 (3q11.2) JBTS9 (4p15.3) JBTS10 (Xp22.3-p22.2) JBTS11 (2q24.3) JBTS12 (15q26.1) JBTS13 (12q24.11) JBTS14 (2q33.1) JBTS15 (7q32.2) JBTS16 (11q12.2) JBTS17 (5p13.2)</p>	<p>INPP5E, MORMS TMEM216, MKS2 AHI1 NPHP1, SLSN1</p> <p>CEP290, MKS4, JBTS5, NPHP6 TMEM67, MKS3, NPHP11 RPGRIPL, FTM, MKS5, NPHP8 ARL13B CC2D2A, MKS6 OFD1, SGBS2 TTC21B, NPHP12 KIF7, HLS2, ACLS TECT1, TCTN1 TMEM237 CEP41 TMEM138 C5ORF42</p>
<p>Meckel-Gruber-Syndrom (MKS)</p> <p>Weitere assoziierte Gene (MKS-Modifizier/Meckel-Like): BBS10 (12q21.2) (Meckel-Like) BBS15 (2p15) JBTS12 (15q26.1)</p>	AR	<p>MKS1 (17q23) MKS2 (11q13) MKS3 (8q21.13-q22.1) MKS4 (12q21.3) MKS5 (16q12.2) MKS6 (4p15.3) MKS7 (3q22) MKS8 (12q24.31) MKS9 (17p11.2) MKS10 (19q13.2)</p>	<p>BBS13 TMEM216, JBTS2 TMEM67, JBTS6, NPHP11 CEP290, JBTS5, NPHP6 RPGRIPL, FTM, JBTS7, NPHP8 CC2D2A, JBTS9 NPHP3 TECT2, TCTN2 B9D1, MKSR1 B9D2, MKSR2</p>

1. Einleitung

Tabelle 1.6: Genetische Überlappungen beim MKS, JS/JSRD und BBS. Mutationen im gleichen Gen können dennoch zu einem anderen Phänotyp führen, Heterozygote Mutationen in einigen Genen führen mitunter nur in Kombination mit Mutationen in einem anderen Gen zur Ausprägung der Erkrankung oder wirken möglicherweise modifizierend auf die Ausprägung ein (*Modifier*).

	MKS1	MKS2	MKS3	MKS4	MKS5	MKS6	MKS- Modifier
JBTS1							
JBTS2		x					
JBTS3							
JBTS4							
JBTS5				x			
JBTS6			x				
JBTS7					x		x
JBTS8							
JBTS9						x	
BBS13	x						
BBS14				x			
BBS15							x
BBS- Modifier			x				

2. Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der Entwicklung neuer molekularbiologischer Verfahren war das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung eines rationalen Algorithmus zur molekulargenetischen Aufklärung der klinisch und genetisch heterogenen Ziliopathiesyndrome MKS, JS/JSRD und BBS. Neben der Verwendung klassischer Analysetechniken wurden insbesondere SNP-Arrays („DNA-chips“) sowie *Next-Generation-Sequencing*-basierende Verfahren etabliert, validiert und implementiert. Die Ergebnisse dieser Strategien werden auf der Basis von 215 Ziliopathie-Familien des eigenen Kollektivs unter Einbeziehung der Literaturdaten ausgewertet.

Ein effizientes und zuverlässiges analytisches Prozedere ist für den klinischen Alltag von großer Bedeutung in Hinblick auf eine mögliche Pränataldiagnostik, da diese Option aufgrund des Schweregrads der Erkrankungen von den betroffenen Familien regelmäßig angefragt wird. Des Weiteren ergeben sich aus der molekulargenetischen Diagnosesicherung auch aufgrund der möglichen multiplen Organbeteiligungen klinische Konsequenzen bezüglich des erforderlichen Managements.

Die Entwicklung eines entsprechenden Algorithmus soll weiterhin sowohl zur Erhöhung der Gesamtaufklärungsraten – z. B. durch die Anwendung ergänzender Methoden oder die Detektion weiterer involvierter Gene – als auch zum ressourcensparenden Einsatz der verschiedenen Methoden beitragen.

Darüber hinaus sollte anhand der aus der Literatur ermittelten Daten und den eigenen Ergebnissen zu klinischen und genetischen Überlappungen zwischen den Syndromen geprüft werden, ob eine Neudefinition/Modifikation der Entitäten sinnvoll ist und inwieweit eine rein klinisch orientierte Klassifikation der Syndrome aufrecht erhalten werden kann.

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Familien mit initialer Verdachtsdiagnose auf die syndromalen Ziliopathien MKS, JS/JSRD oder BBS des Patientenkollektivs der Arbeitsgruppe Zystennieren/Ziliopathien des Instituts für Humangenetik am Universitätsklinikum der RWTH Aachen. Insgesamt wurden 215 Familien und dabei – wenn möglich – die Indexpatienten und/oder Familienangehörige untersucht. Bei 88 Familien wurde die Verdachtsdiagnose MKS geäußert, bei 61 Familien war die Verdachtsdiagnose JS/JSRD und bei 66 Familien bestand der klinische Verdacht auf ein BBS. Die Betroffenen stammen aus nach unserem Wissen nicht untereinander verwandten Familien. Sie wurden mehrheitlich von verschiedenen deutschen humangenetischen Instituten und europäischen Labors zur Untersuchung eingesandt. Das Kollektiv umfasst 60 deutsche, 41 türkische, 39 sonstige europäische sowie 27 arabische Familien. Zu den übrigen Familien lagen keine Informationen zur Herkunft bzw. dem ethnischen Hintergrund vor oder diese sind den Tabellen A1 bis A3 des Anhangs zu entnehmen. Einschlusskriterium für die Aufarbeitung war die klinische Verdachtsdiagnose durch den Einsender.

Bei 32 MKS-Familien wurden als klinische Symptome mindestens drei der vier Hauptkriterien (okzipitale Enzephalozele, postaxiale Polydaktylie, Duktalplattenmalformation oder Leberfibrose, Nierendysplasie) als klinische Manifestation angegeben, wobei in jedem Falle eine Nierenbeteiligung vorlag.

Bei 37 JS/JSRD-Familien wurde explizit der Nachweis eines MTS oder einer Kleinhirnwurmagenese berichtet.

Bei 30 BBS-Familien wurden als Symptome mindestens drei der klinischen Hauptkriterien als vorhanden angegeben (Adipositas, postaxiale Polydaktylie, Lernbehinderung oder mentale Retardierung, Nierenbeteiligung, männlicher Hypogonadismus, Retinabeteiligung).

Bei 20 der 88 MKS-Familien, 15 der 61 JS/JSRD-Familien und 22 der 66 BBS-Familien wurde durch den Einsender eine bestehende Blutsverwandtschaft angegeben. Proben wurden mit Einverständnis der Eltern bzw. Patienten entnommen. Weitere detaillierte klinische Angaben und Informationen zu den

3. Material und Methoden

durchgeführten Analysen sind den Tabellen A1 bis A3 des Anhangs zu entnehmen.

Die DNA-Proben der Patienten bzw. in seltenen Fällen die elterlichen DNA-Proben wurden mit den im Folgenden genannten Methoden systematisch auf Mutationen in den hier aufgeführten Genen untersucht.

MKS-Familien (n=88):

Primär wurden bei den MKS-Patienten die Gene *MKS1*, *MKS3*, *MKS4* und *MKS6* analysiert. Bei verschiedenen Patienten wurden – in Abhängigkeit von Voruntersuchungen, der ethnischen Herkunft oder dem klinischen Bild – ergänzend die Gene *MKS2*, *MKS5*, *MKS7* sowie z. T. auch differenzialdiagnostisch relevante Gene wie etwa das *PKHD1*-, *BBS10*- oder *HNF1 β* -Gen analysiert. Insgesamt wurden 82 Fälle für das *MKS1*-Gen, 75 Fälle für das *MKS3*-Gen, 41 Fälle für das *MKS4*-Gen und 26 Fälle für das *MKS6*-Gen untersucht. 42 Familien wurden außerdem in Bezug auf Mutationen bzw. Kompatibilität der Gene/Loci *MKS2*, *MKS5* und/oder *MKS7* getestet.

JS-/JSRD-Familien (n=61):

Bei den JS-/JSRD-Familien wurden i. d. R. die vier Gene *JBST3*, *JBTS5*, *JBTS6* und *JBTS9* untersucht. Im Einzelnen wurden 47 Patienten für das *JBST3*-Gen, 36 für das *JBTS5*-Gen, 42 für das *JBTS6*-Gen sowie 25 Patienten für das *JBTS9*-Gen analysiert. Bei 24 Betroffenen wurde darüber hinaus eine homozygote Deletion des *JBTS4*-Gens ausgeschlossen. 29 Familien wurden außerdem in Bezug auf Mutationen bzw. Kompatibilität der Gene/Loci *JBTS1*, *JBTS2*, *JBTS4*, *JBTS7* oder *JBTS8* untersucht. Darüber hinaus wurden bei einzelnen Patienten weitere *JBTS*-Gene (*JBTS10*-*JBTS17*) oder differenzialdiagnostisch relevante Gene wie das *MKS1*-, *MKS7*-, *BBS10*-, *PKHD1*- oder *HNF1 β* -Gen analysiert.

BBS-Familien (n=66):

Die BBS-Patienten wurden primär auf Mutationen in den Genen *BBS1*, *BBS2*, *BBS10*, *BBS12* untersucht. Insgesamt wurde bei 36 Patienten das *BBS1*-Gen, bei 26 Patienten das *BBS2*-Gen, bei 59 Patienten das *BBS10*-Gen und bei 43

3. Material und Methoden

Patienten das *BBS12*-Gen untersucht. 21 Betroffene wurden für das *BBS1*-Gen ausschließlich auf die häufige Mutation c.1169T>G (p.Met390Arg) untersucht. Bei 19 Patienten wurden auch andere *BBS*-Gene (*BBS3-BBS9*, *BBS11* oder *BBS13-BBS15*) und z. T. auch differenzialdiagnostisch relevante Gene wie verschiedene *MKS*- und *JBTS*-Gene oder das *PKHD1*-Gen analysiert. Vier Patienten wurden darüber hinaus im Vorfeld unserer Analysen auswertig mittels des Asper Ophthalmics BBS-Chips auf 347 bekannte *BBS*-Mutationen in den Genen *BBS1-BBS13* untersucht.

Je nach Familienkonstellation wurde ein Zusammenhang zu den genannten Genen auch mittels Kopplungsanalytik oder SNP-Array-Analytik mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Eine entsprechende Array-Analytik wurde bei 29 (mehrheitlich blutsverwandten) Familien im Vorfeld einer spezifischen Genanalytik (zur Ermittlung homozygoter Bereiche im Genom und auch zum Ausschluss chromosomaler Imbalancen) durchgeführt.

Nach Validierung wurde eine Subpopulation aktueller Patienten (21 Fälle; 9 JS/JSRD- und 12 MKS-Fälle) außerdem mittels des im Rahmen dieser Arbeit etablierten *Next-Generation-Sequencing-Panels* untersucht.

3.2. Geräte, Zubehör und Chemikalien

Im Folgenden werden die genutzten Geräte sowie die Hersteller, von welchen der Großteil der Chemikalien bezogen wurde, kurz aufgelistet. Wurden Chemikalien von anderen Herstellern bezogen, wird dies bei der beschriebenen Methodik gesondert aufgeführt.

3.2.1. Geräte und Zubehör

- Array-System: GeneChip Hybridization Oven, Affymetrix GeneChip® Scanner, GeneChip Fluidics Station und weitere Komponenten, Affymetrix, USA
- Autoklav HV-85, HD-Tek, Süßen, D
- Brutschrank Kendro, Heraeus, Hanau, D

3. Material und Methoden

- Geldokumentationssystem Gel Doc 2000 und zugehörige Software (Quantity One v. 4.0.3), Bio-Rad, USA
- Gelkammer EasyPhor Maxi und Zubehör, Biozym, Hess. Oldendorf, D
- Heizblock Unitek™ HBS-130/E, peqlab, Erlangen, D
- Techne Dry Block® DB 3D, Techne (Cambridge) LTD, UK
- Magnetrührer Ikamag RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen, D
- Magnetständer MagnaRack™, Invitrogen, Karlsruhe, D
- 96 well Well-Magnetic-Ring Stand, Invitrogen, Karlsruhe, D
- Mikrowelle Boxford
- NGS-Gerät GS Junior System und Zubehör, Roche, USA
- Photometer Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg, D
- Pipetten Pipetman P10, P20, P100, P1000, Gilson, F
- Schüttelapparat GFL 3015 & GFL 3005, Burgwedel, D
- Sequenzierer und ABI Prism® 310 und 3130 und Zubehör, Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- Spannungsgeräte Electrophoresis Power Supply PS 304, Gibco BRL, Groningen, NL
- StepOne™ Real-Time PCR System, Life Technologies, USA
- Thermocycler PTC 200 DNA Engine MJ Research, Bio-Rad, Hess. Oldendorf, T-Professional-Basic, Biometra, Göttingen, D
- Thermomixer 5437, Eppendorf, Hamburg, D
- Waagen BP 2100 & BP615, Sartorius AG, Göttingen, D
- Wasserbad GFL 1086, GFL, Burgwedel, D
- Vakuumpumpe Membranvakuumpumpe, Vacuubrand, Wertheim, D
- Zentrifugen: Fresco 17, Heraeus, USA; Megafuge, Heraeus, USA, Plattenfuge 5430, Eppendorf, Hamburg, D

3.2.2. Chemikalien

- Applichem, Darmstadt, D
- Applied Biosystems/Life Technologies, USA
- Bio-Rad, Hercules, USA
- Biozym, Oldendorf, D

3. Material und Methoden

- Boehringer, Mannheim, D
- Dianova, Hamburg, D
- ICN Biomedicals, Ohio, USA
- Invitrogen, Karlsruhe, D
- Merck, Darmstadt, D
- Promega, Mannheim, D
- QIAGEN GmbH, Hilden, D
- Riedel-de Haen, Seelze, D
- Roth, Karlsruhe, D
- Serva, Heidelberg, D
- Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, D
- USB, Cleveland, USA

3.3. Referenzsequenzen und Bioinformatik

3.3.1. Referenzsequenzen

Als Referenzsequenzen für die zu analysierenden Gene wurden i. d. R. *Ref-Seq*-annotierte DNA-Sequenzen verwendet. Die genomischen Basenabfolgen wurden vom UCSC human genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>) bezogen (Referenzgenom: Feb2009 GRCh37/hg19). Dabei wurde zunächst das Transkript des längsten offenen Leserahmens ermittelt und unter Berücksichtigung der vorhandenen Literatur festgelegt, welche Isoform als Grundlage für die folgenden Analysen zu verwenden ist. Eine Untersuchung wurde dabei für folgende Ziliopathie- und Nierendysplasie-Gene und Loci durchgeführt:

Syndromale Ziliopathien:

MKS1 (BBS13):	NM_017777.3
MKS2 (TMEM216; JBTS2):	NM_001173991.2
MKS3 (TMEM67, JBTS6, NPHP11):	NM_153704.5
MKS4 (CEP290, NPHP6, BBS14, JBTS5):	NM_025114.3
MKS5 (RPGRIP1L, NPHP8, JBTS7):	NM_015272.2
MKS6 (CC2D2A, JBTS9):	NM_001080522.2
MKS7 (NPHP3):	NM_153240.3
JBTS1 (INPP5E):	NM_019892.3

3. Material und Methoden

JBTS2 (TMEM216; MKS2):	NM_001173991.2
JBTS3 (AHI1):	NM_001134831.1
JBTS4 (NPHP1):	NM_000272.3
JBTS5 (CEP290, MKS4, NPHP6, BBS14):	NM_025114.3
JBTS6 (TMEM67, MKS3, NPHP11):	NM_153704.5
JBTS7 (RPGRIP1L, NPHP8, MKS5):	NM_015272.2
JBTS8 (ARL13B):	NM_182896
JBTS9 (CC2D2A, MKS6):	NM_001080522.2
BBS1:	NM_024649.4
BBS2:	NM_031885.3
BBS4:	NM_033028.3
BBS5:	NM_152384.2
BBS6:	NM_170784.1
BBS7:	NM_176824.1
BBS8:	NM_144596.2
BBS9:	NM_198428.2
BBS10:	NM_024685.3
BBS11:	NM_012210.3
BBS12:	NM_152618.2
BBS13 (MKS1):	NM_017777.3
BBS14 (CEP290, MKS4, JBTS5, NPHP6):	NM_025114.3

Weitere Ziliopathie-Gene:

ARPKD: PKHD1:	NM_138694.3
NPH: NPHP2 (INVS):	NM_014425.2

Weitere Nierendysplasie-Gene:

RCAD: HNF1B:	NM_000458.2
--------------	-------------

3.3.2. (Bioinformatische) Validierung von Varianten

Für die Bewertung von detektierten Sequenzvarianten wurde zunächst geprüft, ob die Veränderungen in den einschlägigen Genom- und Locus-spezifischen Mutationsdatenbanken aufgeführt wird. Hierbei wurden vor allem über den UCSC genome browser die Daten der Polymorphismendatenbank dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) abgefragt (v130-v137). Dabei wurden grundsätzlich für die Einschätzung der Relevanz des Eintrags sowohl die Validierung als auch die Häufigkeit in der Normalbevölkerung der Polymorphismen (z. B. Angaben zur *Minor-Allele-Frequency* (MAF) oder *Allele-*

3. Material und Methoden

Frequency, falls vorhanden) und die Information bezüglich des homozygoten Auftretens der Veränderung in die Bewertung mit einbezogen. Des Weiteren fanden Angaben aus der Literatur bezüglich untersuchter Kontrollchromosomen und der generellen Einordnung Verwendung. Eigene Daten untersuchter Kontrollchromosomen wurden ebenfalls berücksichtigt. Es wurden grundsätzlich vier Gruppen von Mutationen unterschieden:

- 1) Rasterschub- und Stoppmutationen (*Nonsense*-Mutationen):
 - Grundsätzlich als pathogen zu bewerten
- 2) Mutationen der kanonischen Spleißstellen (-2 bis +2):
 - Grundsätzlich als pathogen zu bewerten, es sei denn als häufige Polymorphismen hinterlegt (i. d. R. MAF: > 0,02)
- 3) *Missense*-Mutationen, *In-Frame*-Veränderungen:
 - Bewertung in Abhängigkeit der o. g. Kriterien in Verbindung mit bioinformatischer Bewertung und evolutionärer Konservierung der Aminosäure, Segregation in der Familie und Phänotyp (Plausibilität) als pathogen, apathogen (Polymorphismen mit MAF: > 0,02) oder als von unklarer Bedeutung
- 4) Weiter intronisch gelegene und stumme Mutationen:
 - Bewertung in Abhängigkeit der o. g. Kriterien sowie Basen-Konservierung, bioinformatischer Bewertung bezüglich des Spleißens in Verbindung mit Segregationsdaten und Phänotyp (Plausibilität) als pathogen, apathogen oder als von unklarer Bedeutung

Für die bioinformatische Bewertung der *Missense*-Varianten bezüglich eines möglichen pathogenen Effekts wurden im Wesentlichen zwei Web-Programme genutzt:

- 1) PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>)
(Adzhubei et al, 2010)
- 2) MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>)
(Schwarz et al, 2010)

3. Material und Methoden

Für die bioinformatische Bewertung von möglichen Spleißvarianten bezüglich eines potentiellen pathogenen Effekts wurden im Wesentlichen drei Web-Programme genutzt:

- 1) Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/credits.html>)
(Desmet et al, 2009)
- 2) Berkeley Drosophila Genome Project Splice Site Prediction by Neural Network (<http://www.fruitfly.org>)
(Reese et al, 1997)
- 3) NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)
(Brunak et al, 1991)

Die Benennung von Varianten erfolgte nach den Empfehlungen der Human Genome Variation Society (HGVS v2) mittels des Mutalyzer 2.0. Webtools (<https://mutalyzer.nl/index>).

3.4. Molekulargenetische Methoden

Die praktische Durchführung erfolgte unter Einbeziehung des Institutspersonals. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Validierung, Auswertung und Interpretation der erhobenen Daten und zu etablierenden Methoden.

3.4.1. DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte aus EDTA-Frischblut mittels Aussalzverfahren (Miller et al, 1988). Die Isolation aus anderen Materialien wie Chorionzotten, Fruchtwasser oder anderem Gewebe mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (QIAamp DNA Blood Mini Kit) nach Herstellerangaben. Die DNA-Isolation aus Paraffingewebe erfolgte mittels des picodna-OLS-Kits (Firma: OMNI Life Science) ebenfalls nach Herstellerangaben.

3.4.2. DNA-Amplifikation

In seltenen Fällen wurde aufgrund der geringen vorhandenen Patienten-DNA-Menge eine Genom-Amplifikation der DNA erforderlich. Diese erfolgte mittels des GenomePlex Complete WGA Kits (Firma: Sigma-Aldrich), bzw. mittels REPLI-g Mini Kit nach Herstellerangaben. Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels einer Test-PCR überprüft.

3.4.3. RNA-Isolation und RT-PCR

Für die Bewertung des pathogenen Charakters bezüglich des Spleißens einzelner detektierter Varianten kam Patienten-RNA bzw. cDNA zum Einsatz. Dabei erfolgte die Isolation der RNA aus Heparin- bzw. PAX-Blut oder aus Gewebeproben mit folgenden Kits nach Herstellerangaben: PAXgene Blood RNA Kit bzw. QIAamp RNA Blood Mini Kit. Die Lagerung der RNAs erfolgte bei -70-80 °C. Zur Stabilisierung wurde die isoliert RNA mittels eines Reverse-Transkriptase-Kits in cDNA umgeschrieben (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR; Firma: Fermentas). Der Ansatz erfolgte nach Herstellerangaben. War die Amplifikation erfolgreich, wurden die PCR-Produkte je nach Fragestellung für die u. g. weiteren Methoden (vornehmlich für die Sequenzierung) weiter verwendet.

3.4.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein molekulargenetisches Verfahren zur selektiven exponentiellen Amplifikation von DNA-Abschnitten (Mullis et al, 1986), (Saiki et al, 1988). Die PCR-Bedingungen wurden entsprechend den angenommenen Schmelztemperaturen optimiert. Um eine Kontamination der PCR mit DNA oder PCR-Produkten auszuschließen, wurde stets eine Leerkontrolle ohne DNA mitgeführt und diese Probe auf das Vorkommen von Kontaminationsbanden überprüft.

Die Synthese der verwendeten Oligonukleotid-Primer wurde für alle Anwendungen bei der Firma Eurofins MWG Operon in Auftrag gegeben. Primer-Sequenzen für die zu untersuchenden DNA-Abschnitte wurden

3. Material und Methoden

entweder der Literatur entnommen oder mehrheitlich mittels eines Primer-Design-Tools (Primer3: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; ExonPrimer: <http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>) ermittelt. Dabei wurde im Vorfeld mittels den o. g. Genom- bzw. Polymorphismendatenbanken möglichst ausgeschlossen, dass im Bereich der Primer-Bindestellen ein häufiger Polymorphismus vorliegt, um das Risiko einer selektiven Allel-Amplifikation (*Allelic-Drop-Out*) zu verringern. Generell wurde eine Länge der Primer von 18-25 Basen gewählt, wobei ein GC-Gehalt von 40-60 % angestrebt wurde. Bei der Auswahl wurden Basenabfolgen vermieden, die eine Dimerisierung oder Haarnadelstrukturausbildung begünstigten. Für den *Sense*- und *Anti-Sense*-Primer wurde dabei stets eine ähnliche DNA-Schmelztemperatur von 60 °C (55-75 °C) angestrebt. Meist wurden Primer für die kodierenden Exons der o. g. Transkripte des längsten ORF verwendet. Primer-Sequenzen sind aufgrund des Umfangs nicht in der Arbeit enthalten und sind separat zu erfragen.

3.4.5. PCR-Standardbedingungen

Eine Etablierung der individuellen PCR-Bedingungen wurde nach Möglichkeit zunächst mit den hier genannten Standardreagenzien (*Taq* DNA Polymerase, recombinant-Kit) versucht. Die Primer-Anlagerungstemperatur wurde je nach zu verwendenden Oligonukleotid-Primern entsprechend der Schmelztemperatur zwischen 48 und 64 °C variiert. Als Etablierungsstartpunkt wurde eine um zwei Grad niedrigere Anlagerungstemperatur als die Schmelztemperatur der Primer gewählt (initiale Anlagerungstemperatur i. d. R. 58 °C).

Standard-PCR-Ansatz in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen:

4 µl	dNTP-Mix (5 mM)
2,5 µl	10-fach <i>Taq</i> -DNA-Polymerase-Puffer
0,75 µl	MgCl ₂ (50 mM)
2 µl	Primer F (= <i>Sense</i> -Primer; einer 10 µM Verdünnung)
2 µl	Primer R (= <i>Anti Sense</i> -Primer; einer 10 µM Verdünnung)
0,2 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase, rekombinant (5 U/µl)
<u>2-4 µl</u>	Patienten-DNA-Verdünnung (20 ng/µl)
Ad 25 µl	A. dest.

3. Material und Methoden

Thermocycler-Programm (FC35):

94 °C	05:00 min	Denaturierung	
94 °C	00:45 min	Denaturierung	} x 30
58 °C	00:30 min	Anlagerung	
72 °C	01:30 min	Elongation	
72 °C	10:00 min	Finalisierung	
15 °C	∞		

War eine Etablierung der PCR mittels der o. g. Standardbedingungen nicht möglich, kamen additive Substanzen und andere Polymerase-Kits nach Herstellerangaben zum Einsatz. Hierbei wurde die Primer-Anlagerungstemperaturen ebenfalls in Abhängigkeit der Primer-Schmelztemperaturen individuell angepasst. Im Folgenden seien hier die alternativ verwendeten Polymerase-Kits und additive Substanzen kurz aufgeführt:

- DNA-Polymerase-Kit
- HotStarTaq-Master-Mix-Kit
- AccuPrime-Taq-DNA-Polymerase-High-Fidelity-Kit
- Platinum-Taq-DNA-Polymerase-Kit
- AccuPrime-GC-Rich-DNA-Polymerase-Kit
- AmpliTaq-Gold-360-Master-Mix-Kit

Als Additiv wurde neben der o. g. Q-Solution folgendes Reagenz verwendet:

- PCRx-Enhancer-System

Die erzeugten PCR-Produkte wurden im Anschluss auf ein 1x TBE gepuffertes 1 % Agarosegel (3 g StarPure Agarose (Firma: Starlab) auf 300 ml 1x TBE (1:10 Aq. Dest. + Ultra Pure 10x TBE Puffer) und 80 µl Ethidiumbromid) geladen. Dabei lagert sich das Ethidiumbromid zwischen die DNA-Moleküle. Das fluoreszierende Ethidiumbromid und somit die umgebende DNA kann so unter UV-Licht im Gel dargestellt werden. Dafür wurden 5 µl jeder Probe mit 5 µl Agarose-Ladepuffer (8 % Ficoll PM400, 0,01 % Bromphenolblau ad 100 ml

3. Material und Methoden

1x TBE) vermischt und das Gemisch in die Ladetaschen des Gels pipettiert. Zur Beurteilung der Fragmentgröße wurde außerdem eine Basenpaarleiter mit aufgetragen (100-bp-DNA-Leiter). Die Elektrophorese – mit dem Ziel der Auftrennung der Fragmente entsprechend ihrer Fragmentlänge durch Wanderung der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld – erfolgte ca. 35 min bei 140-160 Volt und flexibler Stromstärke in einer Elektrophoresekammer. Im Anschluss wurde die Auftrennung sowie die Qualität und Intensität der PCR-Produkte visuell unter UV-Licht geprüft. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei der Verwendung von Ethidiumbromid bei etwa 5-20 ng DNA/Bande. War die Amplifikation erfolgreich, wurden die PCR-Produkte je nach Fragestellung für die u. g. weiteren Methoden (vornehmlich für die Sequenzierung) weiter verwendet.

3.4.6. *Junction-Fragment-PCR*

Zur näheren Charakterisierung von Bruchpunkten bei größeren Gen-Deletionen kamen z. T. *Junction-Fragment-PCRs* zum Einsatz. Dabei wurden mehrere Deletions-überspannende, Exon-flankierende Oligonukleotid-Primer nach den o. g. Kriterien ausgewählt. Es wurde stets eine Kontroll-DNA mitgeführt. Für den Ansatz wurde das HotStarTaq Master Mix Kit verwendet. Die PCR-Produkte wurden vergleichend auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt (5 µl Probe mit 5 µl Agarose-Ladepuffer). Zur Beurteilung der Fragmentgröße wurde eine entsprechende Basenpaarleiter mit aufgetragen (100-bp-DNA-Leiter). Konnten mittels Patienten-DNA PCR-Produkte von abweichender Größe zum Wildtyp erzeugt werden, wurden die entsprechenden Produkte direkt-sequenziert (ggf. wurden zusätzliche Sequenzier-Primer bestellt) und damit der Bruchpunkt charakterisiert.

3.4.7. *Multiplex-Deletions-PCR*

Zum Ausschluss der häufigen homozygoten Deletionen des *JBTS4-* (*NPHP1-*) Gens (Größe des deletierten Bereichs: 290 Kb) kam eine Multiplex-PCR zum Einsatz (Otto et al, 2008). Dazu wurden simultan drei verschiedene innerhalb der bekannten Deletionsregion lokalisierte *JBTS4*-Exons (Exon 7/Fragment d:

3. Material und Methoden

236 bp, Exon 11/Fragment c: 286 bp und Exon 20/Fragment b: 436 bp) und zwei interne Kontrollgen-Exons (*LHX9*-Gen Exon 4/Fragment a: 515 bp und *LHX9*-Gen Exon 6/Fragment e: 180 bp) entsprechend dem Protokoll amplifiziert und analysiert (Abbildung 3.1). Für den Ansatz kam das HotStarTaq Master Mix Kit zum Einsatz. Die Multiplex-PCR-Produkte wurden auf einem 3 % Agarosegel aufgetrennt (5 µl Probe mit 5 µl Agarose-Ladepuffer). Zur Beurteilung der Fragmentgröße wurde eine Basenpaarleiter mit aufgetragen (100-bp-DNA-Leiter). Die Auftrennung sowie die Qualität und Intensität der PCR-Produkte wurde visuell unter UV-Licht ermittelt und ein entsprechender Ausdruck zur Dokumentation erstellt. Stets wurde die DNA eines Patienten mit bekannter Deletion als Positivkontrolle mitgeführt, wobei hier ausschließlich die Kontrollfragmentbanden auf dem Gel darstellbar waren.

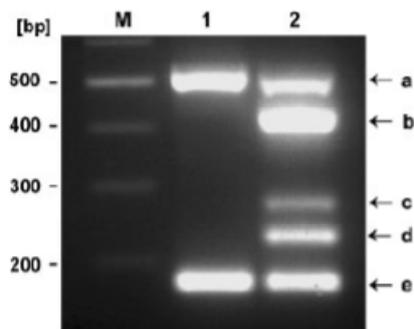


Abbildung 3.1: Multiplex-Deletions-PCR zur Detektion von homozygoten (*JBTS5*-)*NPHP1*-Deletionen, Bahn 1: DNA-Leiter, Bahn 2: Patient mit homozygoter Deletion, Bahn 3: Wildtyp-DNA (Otto et al, 2008)

3.4.8. cDNA PCR und Transkript-Analysen

Für die Bewertung des möglichen Einflusses von einzelnen Varianten auf das Spleißen kam Patienten-RNA bzw. cDNA zum Einsatz. Im Vorfeld wurde zunächst die Gewebexpression des Gens in der Literatur recherchiert und mittels PCR für das zur Verfügung stehende Material (i. d. R. RNA aus Blut) bestätigt. Dabei sowie für die Folgeanalysen kamen Oligonukleotid-Primer zum Einsatz, die für diese spezifische Anwendung weitgehend Exon überspannend gelegt wurden, um möglichen DNA-Kontaminationen auszuschließen. Die Primer wurden mittels der o. g. Kriterien ermittelt. Als PCR-Bedingungen wurden die o. g. Standardbedingungen gewählt. Als Grundlage für das Primer-Design und die Auswertung dienten die entsprechenden Transkript-Sequenzen

3. Material und Methoden

des längsten offenen Leserahmens. Die generierten PCR-Produkte wurden auf einem 1 % Agarose-Gel entsprechend ihrer Produktgröße aufgetrennt und auf die Anzahl der Banden visuell unter UV-Licht überprüft. Als Kontrolle wurde stets ein Ansatz mit einer Wildtyp-cDNA mitgeführt. Die Patienten-Transkript-Banden wurden mit dem Wildtyp-Transkriptmuster verglichen und distinkte Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Diese Banden-DNA wurde mit dem Nucleospin-Extract-II-Kit (Firma: Macharey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Im Anschluss wurden die Banden sequenziert.

3.4.9. Sequenzierung nach Sanger

Die Didesoxymethode zur DNA-Sequenzierung nach F. Sanger stellt wie die PCR eine molekulargenetische Standardmethode dar (Sanger & Coulson, 1975). Seit Anfang der 1990er Jahre ermöglichen individuell fluoreszenzmarkiert Didesoxyribonukleotide die Verwendung aller vier Didesoxyribonukleotide in einem Ansatz. Die Ermittlung der Basenabfolge erfolgt heute mittels eines Kapillarelektrophoresegeräts und die Anregung der fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleotide mit einem Laser. Nach dem Prinzip der o. g. Methode wurden im Einzelnen die entsprechend an Patienten-DNA erzeugten PCR-Produkte mittels ExoSAP-IT enzymatisch aufgereinigt. Der Ansatz erfolgte dabei nach folgendem Standardprotokoll:

Ansatz in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen:

2,5 µl – 5 µl PCR-Produkt (je nach Konzentration) evtl. ad 5 µl A. dest.

2 µl ExoSAP

7 µl

Thermocycler-Programm:

37 °C 15 min.

80 °C 15 min.

15 °C ∞

Das mittels ExoSAP-IT aufgereinigte PCR-Produkt wurde in der Folge in eine Sequenzier-PCR eingesetzt. Dabei wurde das Produkt mit einem Oligonukleotid-Primer und einem entsprechenden Sequenzier-Mix (Big Dye

3. Material und Methoden

Terminator v1.1 Ready Reaction Mix) inklusive fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleosidtriphosphate versetzt und im Thermocycler linear amplifiziert und die Produkte im Anschluss gefällt. Der Ansatz erfolgte dabei nach folgendem Standardprotokoll:

Sequenzier-PCR-Ansatz in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen:

7 µl	ExoSAP-IT behandeltes PCR-Produkt
1 µl	Oligonukleotid-Primer F oder R (10 µM)
<u>1,5 µl</u>	Big Dye Terminator v1.1 Ready Reaction Mix
9,5 µl	

Thermocycler-Programm:

96 °C	01:00 min	Denaturierung	} x 24
96 °C	00:10 min	Denaturierung	
50 °C	00:05 min	Anlagerung	
60 °C	04:00 min	Elongation	
15 °C	∞		

Fällung des Sequenzier-PCR-Produktes in 1,5 ml Reaktionsgefäßen:

9,5 µl	Sequenzier-PCR-Produkt
100 µl	Natrium-Acetat-Mix (90 µl A. dest. +10 µl NaAc 3 M, pH 4,6-5,2)
<u>250 µl</u>	Ethanol absolut
359,5 µl	

Für die Fällung wurde der Ansatz 30 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 500 µl 70 % Ethanol zum Waschen des Pellets zugegeben. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (10 min, RT, 13.000 rpm) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet im Trockenschrank bei 50 °C getrocknet. Im Anschluss wurde das DNA-Pellet in 20 µl Hi-Di Formamide gelöst. Das so gelöste Produkt wurde auf einem auf einem Kapillarsequenzierer nach Herstellerangaben analysiert. Die qualitative Beurteilung der generierten Elektropherogramme erfolgte mittels Sequencing Analysis Software Version 5.2, die Auswertung der Patientendaten und Dokumentation erfolgte weitgehend mit der SEQUENCE Pilot Software Version

3. Material und Methoden

3.4.2 (Firma: JSI medical systems GmbH). Meist wurde unidirektional in *Forward*-Richtung oder bidirektional sequenziert. Wurden Veränderungen detektiert wurde stets eine Wiederholung der PCR und Sequenzierung aus dem Patienten-DNA-Stock durchgeführt.

3.4.10. Mikrosatelliten

Bei Mikrosatelliten bzw. *Short-Tandem-Repeats* handelt es sich um hochrepetitive Nukleotidsequenzen von 1-6 Basenpaaren, die über das gesamte Genom verteilt vorliegen. Sie sind in der Bevölkerung häufig polymorph. Diese Eigenschaft macht man sich u. a. zur indirekten Aussage bezüglich der Vererbung von krankheitsrelevanten Genen zu Nutze. Die Mikrosatelliten und flankierende Bereiche werden mittels PCR an genomischer DNA amplifiziert, fluoreszenzmarkiert und entsprechend ihrer Größe kapillarelektrophoretisch aufgetrennt, sodass eine Differenzierung von Allelen möglich wird. Die zur Analyse verwendeten Mikrosatelliten-flankierenden Primer wurden entweder der Literatur oder den einschlägigen Mikrosatellitendatenbanken (*UniSTS*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>) entnommen. Waren für die zu untersuchenden Loci keine Mikrosatelliten beschrieben, wurde in den o. g. Genomdatenbanken die genomischen DNA-Sequenz des zu untersuchenden Bereichs auf mögliche Mikrosatelliten geprüft und in die flankierenden Bereiche mittels des *Primer3-Design-Tools* Primer gelegt. Die Austestung bezüglich Allelverteilung in der Bevölkerung erfolgte anhand von Kontrollproben. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden die Mikrosatelliten-Primer entweder direkt 6-FAM-markiert oder der spezifische F-Primer wurde am 5'-Ende um eine Universal- (Com-F-) Sequenz verlängert (Com-F-Sequenz: 5'-TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG-3'). Dann wurde in der PCR zusätzlich zu den spezifischen Primern ein dritter, 6-FAM-markierter Primer hinzugegeben, welcher sich an den oben genannten Überhang lagert und auf diese Art eine Markierung erreicht. Primer-Sequenzen sind aufgrund des Umfangs nicht in der Arbeit enthalten und sind separat zu erfragen. Individuelle PCR-Bedingungen für die Mikrosatelliten-PCRs wurden mit den o. g. Standardreagenzien (*Taq* DNA Polymerase, recombinant-Kit) etabliert.

3. Material und Methoden

Standard-Mikrosatelliten-PCR-Ansatz in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen:

4 µl	dNTPs (dNTP-Mix, 5 mM)
2,5 µl	10-fach <i>Taq</i> -DNA-Polymerase-Puffer
0,75 µl	MgCl ₂ (50 mM)
1 µl	Primer F (10 µM-Verdünnung) und:
1 µl	Com-F (10 µM-Verdünnung) oder:
2 µl	Fam-Primer F (10 µM-Verdünnung)
2 µl	Primer R (10 µM-Verdünnung)
0,2 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase, rekombinant (5 U/µl)
<u>2-4 µl</u>	DNA-Verdünnung (20 ng/µl)
Ad 25 µl	A. dest.

Thermocycler-Programm:

94 °C	05:00 min	Denaturierung	} x 34
94 °C	00:45 min	Denaturierung	
58 °C	00:30 min	Anlagerung	
72 °C	01:30 min	Elongation	
72 °C	10:00 min	Finalisierung	
15 °C	∞		

Das erzeugte PCR-Produkt wurde nach grober visueller Abschätzung der Produktmenge im 1 % Agarosegel (zum Auftragen 1:1 vermengt mit Agarose-Ladepuffer) unter UV-Licht durch Vergleich mit einer Basenpaarleiter (*100 bp DNA ladder*) je nach Bandenintensität 1:1 bis 1:50 mit A. dest. verdünnt. Für die weitere Fragmentanalytik wurden 1-2 µl der verdünnten Probe mit 8,5 µl Hi-Di Formamid und 0,5 µl LIZ-Größenstandard (GeneScan-500 LIZ) versetzt. Die Auftrennung der Fragmente zur Längenbestimmung erfolgte mittels eines hochauflösenden Polymers (3130: POP-7 Polymere) auf einem Kapillarsequenzierer (AB3130 Genetic Analyzer). Die Auswertung der Fragmentanalytik erfolgte mittels Genemapper Software Version 4.0 nach Herstelleranleitung.

3.4.11. SNP-Array-Analysen

In den letzten Jahren werden zunehmend Mikro-Arrays zum Nachweis submikroskopischer chromosomaler Veränderungen wie Deletionen und Duplikationen verwendet, da diese eine höhere Auflösung als die konventionelle Zytogenetik ermöglichen (Fodor et al, 1991). SNP-Arrays wurden ursprünglich vor allem für Assoziationsstudien eingesetzt und entwickelt. Sie ermöglichen eine Genotypisierung und den Nachweis von homozygoten Bereichen im untersuchten Genom. Der für beide Zwecke hier verwendete Genome-Wide Human SNP Array 6.0 ist ein mit 25-mer Oligonukleotiden beschichteter Gene-Chip-Array. Er enthält insgesamt etwa 1,8 Millionen Marker, davon 906.600 für bekannte, über das komplette Genom verteilte Polymorphismen. Diese dienen der Detektion von homozygoten Bereichen im Genom. Zusätzlich enthält der Array 946.000 nicht-polymorphe Marker zum Nachweis von Kopienzahlveränderungen. Im Durchschnitt wird damit ein maximaler Markerabstand von 700 Basenpaaren im menschlichen Genom erreicht. Die Methodik basiert bei dem Genome-Wide Human SNP Array 6.0 auf dem *Perfect-Match/Mismatch*-Prinzip (Abbildung 3.2), bei dem die fluoreszenzmarkierte Patienten-DNA nach Verdau und Amplifikation entweder an die entsprechende Sonde hybridisiert (*Perfect-Match*) oder nicht (*Mismatch*).

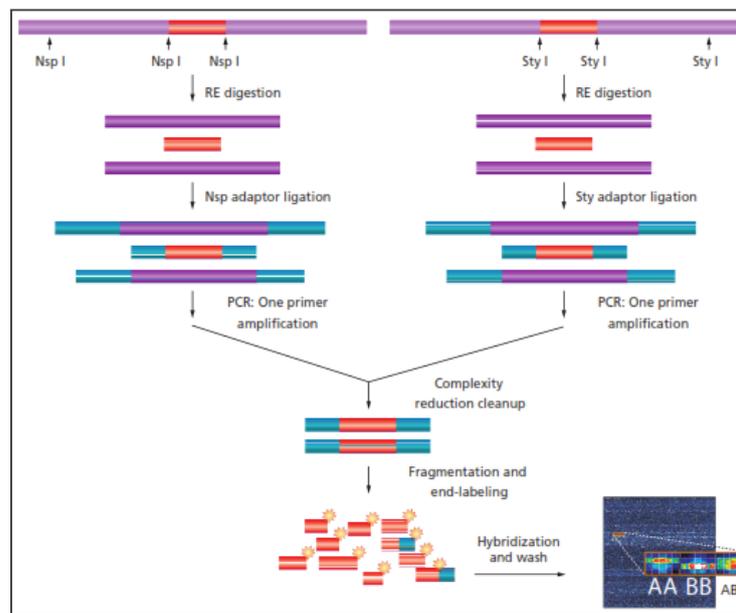


Abbildung 3.2: *Perfect-Match/Mismatch*-Methodik des Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 zur SNP-Detektion (<http://www.affymetrix.com>).

3. Material und Methoden

Die mittels eines Scanners detektierten Signale der entsprechenden Sonden werden bioinformatisch verrechnet (u. a. normalisiert gegen Kontrollproben-Signale und die Signale des aktuellen Laufs). In Verbindung mit Annotationsdaten, die Informationen zur genomischen Position der Sonden enthalten, können diese zugeordnet werden und Rückschlüsse auf den Genotyp und die Kopienzahl eines bestimmten chromosomalen Abschnitts gezogen werden.

Die Patienten-DNA-Proben wurden nach Herstellerangaben in zwei parallelen Ansätzen mittels zweier Restriktionsenzyme verdaut (Enzyme: *NspI* bzw. *StyI*), die Adaptoren ligiert und die Fragmente schließlich mittels PCR amplifiziert (Fragmentgröße: 200-1100 bp). Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung mittels magnetischer *Beads*. Die gereinigten PCR-Produkte wurden durch einen *DNaseI*-Verdau fragmentiert, durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase Biotin-gelabelt und weiter entsprechend den Herstellerangaben verfahren. Die Messung der Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Scanners durchgeführt. Die bioinformatische Verarbeitung der Rohdaten erfolgte mit der Affymetrix Genotyping Console 4.0 Software unter Verwendung der *Annotation-Files* Version NA30 (hg18/GRCh36) bzw. NA32 (hg19/GRCh37) unter Verwendung von Referenzproben.

3.4.11.1. Nachweis submikroskopischer Deletionen/Duplikationen

Für die Kopienzahlanalyse wurden als Qualitätsmindestanforderung ein MAPD-Wert $< 0,3$ und Waviness-SD-Wert $< 0,1$ gewählt. Zur Interpretation und Darstellung der Ergebnisse wurde die Chromosome Analysis Suite Software verwendet. In der Auswertung und Interpretation von Kopienzahlvarianten wurden i. d. R. ausschließlich Abweichungen mit einer Mindestgröße von 200 Kb und einem durchschnittlichen Markerabstand von maximal 5 Kb berücksichtigt. Für die Einschätzung des Charakters einer Kopienzahlvariante wurden öffentliche Datenbanken (Database of Genomic Variants: <http://projects.tcag.ca/variation/>, DECIPHER: <http://decipher.sanger.ac.uk>) bzw. Daten des eigenen Kollektivs zu Rate gezogen. Außerdem wurde geprüft, inwieweit die Bereiche annotierte Gene enthalten. Wurden Varianten als möglicherweise pathogenetisch relevant eingestuft, wurde eine Bestätigung

3. Material und Methoden

mittels quantitativer PCR und falls verfügbar eine Untersuchung von elterlichen Proben durchgeführt.

3.4.11.2. Nachweis von Homozygotie bei Blutsverwandtschaft

A priori ist bei parentaler Konsanguinität von homozygoten Haplotypen der Patienten für den der Erkrankung zugrunde liegenden Genort auszugehen. Diese vermehrte genomisch auftretende Homozygotie kann bei bekannter Blutsverwandtschaft der Eltern vor allem bei Verdachtsdiagnose auf eine heterogene autosomal rezessive Erkrankung zur gezielten Priorisierung von Kandidatengeneten zum Einsatz kommen. Zum Nachweis der Homozygotie können beispielsweise Mikrosatelliten oder wie in der hier vorliegenden Arbeit SNP-Arrays verwendet werden, da mittels dieser Methodik eine Genotypisierung möglich ist. Abbildung 3.3 zeigt, dass größere Homozygotieblöcke beispielsweise > 10 Mb in der zentraleuropäisch-stämmigen Population bei nicht bestehender Blutsverwandtschaft sehr selten vorkommen (McQuillan et al, 2008).

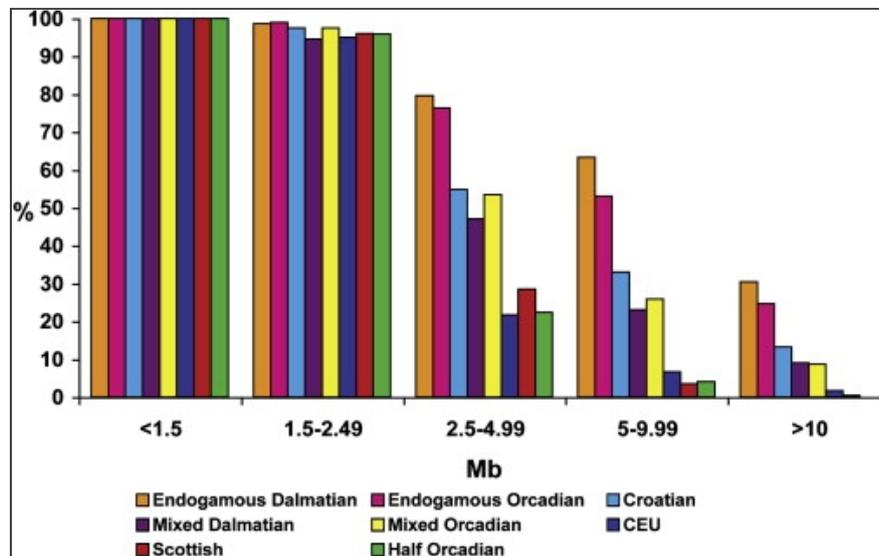


Abbildung 3.3: Durchschnittliche Größe der detektierten homozygoten Bereiche in verschiedenen Populationen, beispielweise zeigen 0,5 % der nicht blutsverwandten zentraleuropäisch-stämmigen (CEU-) Population homozygote Bereiche mit einer Größe von > 10Mb (McQuillan et al, 2008).

Der o. g. Array kam bei Indexpatienten mit bekannter Konsanguinität für die Priorisierung von Kandidatengeneten zum Einsatz. Als Qualitätsparameter für die

Genotypisierungsdaten wurde ein Contrast-QC-Wert $> 0,4$ angestrebt. Die Visualisierung der Daten erfolgte ebenfalls mit der Chromosome Analysis Suite Software (Version: N1-2-0.225). Homozygotieblöcke wurden als Bereiche mit mindestens 10 homozygoten SNPs und eine Mindestblockgröße von 1000 Kb definiert. Zur Priorisierung wurde ein spezielles *Cytoregions-Files* erstellt, mit welchem die aktuell bekannten Ziliopathie- und Zystennieren-Loci gleichzeitig visualisiert werden können.

3.4.12. Quantitative *Real-Time*-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Methode zur Echtzeit-Quantifizierung von PCR-Produkten während der PCR-Reaktion. Einer Messung der PCR-Produkt-Menge in der exponentiellen Phase der PCR ermöglicht Rückschlüsse auf die Menge der ursprünglich eingesetzten DNA (Weis et al, 1992), (Higuchi et al, 1993). Hierfür werden die zu untersuchenden Produkte während der PCR fluoreszenzmarkiert, beispielsweise mit dem in die DNA interkalierenden Farbstoff SYBR-Green, und die Menge an Produkt anhand der Detektion der Intensität des Fluoreszenzsignals ermittelt (Morrison et al, 1998). Die Quantifizierung kann dabei absolut oder relativ erfolgen. Zum Vergleich der PCR-Effizienz und zur relativen Quantifizierung kann außerdem eine Standardreihe für Ziel- und Referenzgen zum Einsatz kommen. Die *Real-Time*-PCR kommt bei einer Vielzahl von Anwendungen wie der Ermittlung der Gewebeexpression verschiedener Transkripte eines Zielgens, aber auch zur Kopienzahlermittlung an genomischer DNA zum Einsatz.

Zur Bestätigung der mittels SNP-Array-Analytik ermittelten Kopienzahlabweichungen wurden für die Anwendung der quantitativen PCR i. d. R. drei Primer-Paare in der zu untersuchenden Region nach den o. g. Kriterien und mittels der o. g. Primer-Design-Tools ausgewählt und bestellt. Für die Ansätze wurde das Power SYBR Green Master-Mix-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zur relativen Quantifizierung wurde eine Standardreihe aus drei DNA-Verdünnungen hergestellt (50 ng/μl, 5 ng/μl, 0,5 ng/μl) und neben Patienten und elterlichen DNA-Proben sowie Kontroll-DNA-Proben mitgeführt.

3. Material und Methoden

Standard-q-PCR-Ansatz in 1,5 ml Reaktionsgefäß:

10 µl	2x Power SYBR Green Master-Mix
2 µl	Primer-Mix F und R (10 µM-Verdünnung)
6 µl	RNAse freies A. dest.
<u>2 µl</u>	DNA (10 ng/µl), bzw. Verdünnungen der Standardreihe
20 µl	

Der o. g. Ansatz wurde stets als Doppelansatz angesetzt, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich vor dem Start der Amplifikation im Thermocycler jeweils auf zwei Wells einer 96-well-Platte pipettiert.

Thermocycler-Programm:

95 °C	10:00 min	Polymerase-Aktivierung	
95 °C	00:15 min	Denaturierung	} x 40
60 °C	01:00 min	Anlagerung, Elongation	
4 °C	∞		

Die Beurteilung der Laufqualität und die Bestimmung der Kopienzahl der untersuchten Bereiche erfolgte mit der StepOne™-Software (Version: 2.2.1).

3.4.13. Next-Generation-Sequencing und Pyrosequenzierung

Neue Sequenziertechnologien ermöglichen die Amplifikation eines gesamten menschlichen Genoms oder des gesamten kodierenden Bereichs (Exom) mittels Hochdurchsatzgeräten in wenigen Tagen. Die zugrunde liegenden Sequenzier Techniken sind bei den jeweiligen Herstellern verschieden und haben entsprechend unterschiedliche Vor- und Nachteile. Allen Geräten dieser so genannten "zweiten Generation" ist jedoch gemein, dass sie die verschiedenen Nukleotide indirekt z. B. durch Fluoreszenzmarkierung oder Lichtemission detektieren und auf einer massiven parallel ablaufenden Amplifikation und Sequenzierung der DNA basieren. Dies ist auch erforderlich, um Fehler, die in den Einzelsequenzen entstehen, auszugleichen. Die *Coverage* ist entsprechend ein Maß dafür, wie oft eine Base innerhalb eines Laufs gelesen wurde. Als Qualitätswert für die einzelnen Basen dient dabei der

3. Material und Methoden

Q-Wert. Ein Q-Wert von 30 (Q30) bedeutet beispielsweise, dass bei der entsprechenden Base eine 99,9 %ige Wahrscheinlichkeit besteht, dass diese Base korrekt gelesen wurde. Neben den Hochdurchsatzgeräten etablieren sich zunehmend auch *Benchtop*-NGS-Geräte am Markt. Sie basieren auf den gleichen Prinzipien wie die größeren Geräte. Die *Benchtop*-Geräte bringen zwar eine geringere Sequenzierkapazität mit, sind jedoch mit geringerem Aufwand zu betreiben. Neben weiteren Aspekten sei vor allem erwähnt, dass ein wesentlicher Vorteil in den verhältnismäßig gering ausfallenden Datenmengen pro Lauf besteht. Somit werden keine besonderen Anforderungen an die IT-Infrastruktur und die *Auswerte-Pipeline* der Daten gestellt. Die Leistung dieser Geräte wurde bereits ausführlich erprobt (Loman et al, 2012).

Am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen wurde als *Next-Generation-Sequencing*-Gerät ein GS Junior der Firma Roche angeschafft und im Rahmen dieser Arbeit die Methodik des *Next-Generation-Sequencings* anhand eines *Gen-Panels* für die häufig von Mutationen betroffenen MKS- und JS-/JSRD-Gene *MKS1*, *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5*, *MKS6/JBTS9*, *JBTS3* etabliert. Die bei dem GS Junior zum Einsatz kommende, in Abbildung 3.4 und 3.5 dargestellte 454-Technologie basiert auf dem Prinzip der Pyrosequenzierung (Ronaghi et al, 1998).

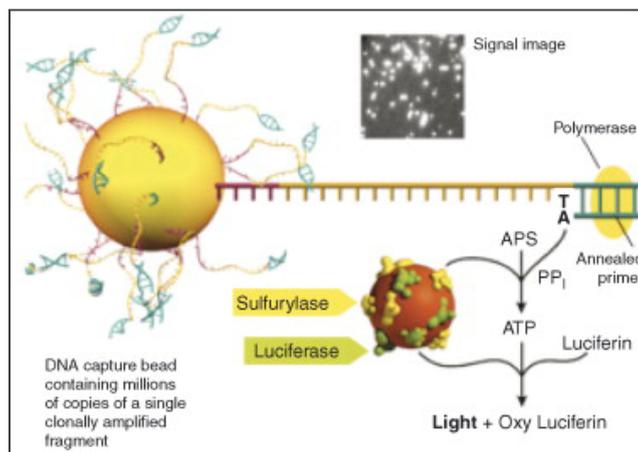


Abbildung 3.4: Prinzip der Pyrosequenzierung beim GS Junior (Mardis, 2008).

Bei dieser Methodik finden grundsätzlich Amplifikation und Sequenzierung parallel statt, wobei die vier Nukleotide stets nacheinander zugegeben werden. Wird ein entsprechendes Nukleotid durch die Polymerase eingebaut, wird ein

3. Material und Methoden

Lichtsignal freigesetzt, welches detektiert werden kann. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf die Base an der entsprechenden Position. Das Lichtsignal kommt bei der Pyrosequenzierung basierend auf einer Kette von chemischen Reaktionen zu Stande. Beim Einbau des Nukleotids wird Pyrophosphat (PPi) freigesetzt. Aufgrund der enthaltenen weiteren Substrate und Enzyme entsteht in der Folge Adenosintriphosphat. Eine ebenfalls enthaltene Luciferase nutzt dieses zur Umwandlung von Luciferin in Oxiluciferin, wodurch das Lichtsignal entsteht. Bei dem GS Junior wird dies für etwa 200.000 PCR-Produkt-tragende *Beads* parallel durchgeführt. Die *Beads* werden auf eine gerätespezifische Pico-Titer-Platte aufgebracht, im Gerät fixiert und mittels einer CCD-Kamera detektiert. Für die Analyse von *Gen-Panels* ist eine Voranreicherung der zu untersuchenden Fragmente erforderlich (*Target-Enrichment*). Diese kann beispielsweise durch eine sondenbasierte gezielte Anreicherung von DNA durch Hybridisierung oder durch gezielte PCR-Amplifikation im Vorfeld der Sequenzierung erfolgen. Bei dem konventionellen PCR-basierten Angang mit genspezifischen Primern werden die generierten PCR-Produkte, hier Amplikons genannt, aufgereinigt, äquimolar gepoolt und die jeweiligen Stränge mittels Emulsions-PCR in Mikroreaktoren in einer Reaktion erneut amplifiziert und über die unten genannten Adapter-Sequenzen A und B während der Reaktion an *Beads* gebunden. Nach dem Aufbrechen der Emulsion und der Freisetzung der Produkttragenden *Beads* werden diese mittels weiterer magnetischer *Beads* von den *Beads* ohne Amplifikate getrennt und entsprechend angereichert. Schließlich werden Sequenzier-Primer angelagert und die Pyrosequenzierung bidirektional im Gerät durchgeführt (Abbildung 3.4 und 3.5).

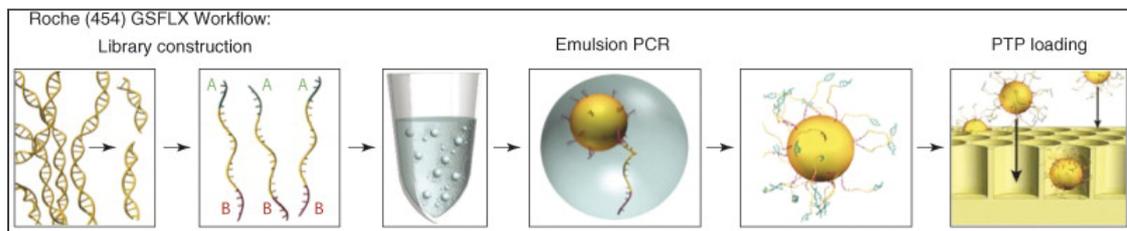


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der *Library*-Generierung (hier mittels Adapter-Ligation), Emulsions-PCR und Beladen der Picotiter-Platte bei der 454-Technologie (Mardis, 2008).

Der gewählte Ansatz basiert auf PCR-Voramplifikation der kodierenden Bereiche und entsprechender Exon-/Intron-Übergänge der o. g. Ziliopathie-

3. Material und Methoden

Gene. Primer für die zu untersuchenden Abschnitte wurden nach den Herstellerempfehlungen (454 Sequencing System Guidelines for Amplicon Experimental Design) konzipiert, wobei stets die folgenden durch den Hersteller vorgegebenen Universal-Erkennungssequenzen angefügt wurden:

Vorwärts-Primer (A-Adapter-Sequenz):

5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-genspezifischer Teil-3'

Rückwärts-Primer (B-Adapter-Sequenz):

5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-genspezifischer Teil-3'

Entsprechend den Herstellerempfehlungen wurden einheitliche PCR-Produktgrößen von 350-450 Basenpaaren gewählt. Insgesamt wurden die kodierenden Abschnitte der genannten Gene mit 173 Amplikons abgedeckt. Auf *Multiplex-Identifizierung* zur parallelen Amplifikation mehrere Patienten wurde verzichtet. In Einzelfällen wurden jedoch verschiedene Patienten für verschiedene Gene in einem Lauf gemeinsam angesetzt. Die HPLC-gereinigten-Primer wurden über die Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Aufgrund des Umfangs an Primern wurde an dieser Stelle auf eine vollständige Auflistung der Sequenzen verzichtet. Diese können bei Bedarf separat erfragt werden.

Der gesamte Ansatz erfolgte weitgehend entsprechend den im Folgenden genannten Protokollen des Herstellers:

<u>Amplikonsdesign:</u>	454 Sequencing System Guidelines for Amplicon Experimental Design (Version-1: August 2010, Version-2: March2012)
<u>Amplikongenerierung:</u>	Amplicon Library Preparation Method Manual (Version-1: RevJune2010, Version-2: March2012)
<u>Emulsions-PCR, Anreicherung:</u>	emPCR Amplification Method Manual - Lib-A (Version-1: RevApril2011, Version-2: March2012)
<u>Sequenzier-Lauf:</u>	Sequencing Method Manual (Version-1: RevJune2010, Version-2: March2012)

3. Material und Methoden

Die Amplikons wurden zunächst mittels PCR an Patienten-DNA in 96-well-Platten generiert.

Amplikon-PCR-Ansatz in 96-well-Platten:

2,5 µl	10-fach AccuPrime PCR Puffer II
2 µl	Primer-Mix F/R (einer 5 µM Verdünnung)
0,1 µl	AccuPrime <i>Taq</i> DNA Polymerase High Fidelity
15,4 µl	A. dest.
<u>5 µl</u>	Patienten-DNA-Verdünnung (10 ng/µl) bzw. A. dest. (Leerwerte)
25 µl	

Thermocycler-Programm:

94 °C	02:00 min	Aktivierung, Denaturierung	} x 35
94 °C	00:30 min	Denaturierung	
59 °C	00:30 min	Anlagerung	
68 °C	01:00 min	Elongation	
72 °C	10:00 min	Finalisierung	
4 °C	∞		

Zur Etablierung wurden alle generierten Amplikons sowie die entsprechenden Wasserkontrollen auf Agarosegelen analysiert. Im Anschluss an die Etablierungsphase wurde auf ein vollständiges Testen aller Amplikons auf Agarosegelen verzichtet und lediglich einzelne Amplikons exemplarisch getestet. Eine Primer-Dimer-Bildung wurde für einzelne Primer-Paare auch mittels des 2100 Bioanalyzers (Firma: Agilent) ausgeschlossen, wobei die PCR-Produkte zur Visualisierung mit dem genannten Gerät nach Herstellerangaben vorbereitet wurden (Kit: DNA 1000, Firma: Agilent). Die generierten Amplikons wurden schließlich mit dem Agencourt AMPure XP-Kit (Vertrieb: Beckman Coulter) in 96-well-Platten mittels eines Magnetständers aufgereinigt, wobei nach Titrationsversuchen ein vom Originalprotokoll abweichendes *Bead*-DNA-Verhältnis gewählt wurde (Verhältnis: 18 µl PCR-Produkt, 32 bzw. 50 µl *Beads*). Im Anschluss wurden die Amplikons mittels des Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent-Ansatzes weitgehend nach Herstellerangaben (96-well-Platten-Protokoll) quantifiziert. Zur Generierung der erforderlichen Standardreihe im

3. Material und Methoden

Doppelansatz wurde abweichend eine Lamda-DNA (eigene Ausgangs-Verdünnung 100 ng/µl) der Firma Promega verwendet. Für die Standardreihe wurden folgende Verdünnungsstufen verwendet: 1) 100 ng/Well, 2) 50,00 ng/Well, 3) 25,00 ng/Well, 4) 12,50 ng/Well, 5) 6,65 ng/Well 6) 3,13 ng/Well, 7) 1,56 ng/Well. Abweichend vom originalen Amplikonprotokoll wurden 3 µl gereinigtes PCR-Produkt mit 97 µl *Tris*-EDTA-Puffer zur Messung verwendet. Die PCR-Produkt-Menge wurde mittels eines VICTOR²-Plattenfluorimeters gemessen (Parameter der Fluoreszenzmessung: 485 nm/535 nm, 0,1 Sekunde, Firma: PerkinElmer). Die Berechnung der tatsächlichen Quantitäten der Amplikons erfolgte mittels einer Excel-Vorlage unter Einbeziehung der Standardreihe (*Cut-off*: $R^2 > 0,98$) und Verrechnung der entsprechenden Verdünnungsstufen. Die Verdünnung der Amplikons auf 1×10^9 Moleküle/µl und die Herstellung des äquimolaren Amplikonpools (=Library) erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben (Abweichung: Es wurden 3 µl gereinigtes PCR-Produkt mit entsprechend der 3-fachen Menge *Tris*-EDTA-Puffer angesetzt) Im Anschluss wurde die 10^7 -Library-Verdünnung für den Ansatz der Emulsions-PCR generiert.

Für die erneute Amplifikation der *Library* und die Verknüpfung der Produkte an *Beads* in der Emulsions-PCR, die Anreicherung der PCR-Produkt-tragenden *Beads* und die Beschickung und Vorbereitung des Pyrosequenzierlaufs kamen folgende Kits und Gerätschaften der Firma Roche zum Einsatz:

- GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A)
- GS Junior Titanium Sequencing Kit
- GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit
- GS Junior Titanium Sequencing Buffers Kit
- GS Junior emPCR Bead Counter
- GS Junior Bead Deposition Device und Counterweight
- GS Junior Sipper Maintenance Kit
- GS Junior Maintenance Wash Kit
- IKA Turrax

3. Material und Methoden

Die Emulsions-PCR wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Es wurden 5 µl einer 1:10-Verdünnung der 10^7 -*Library* eingesetzt (entspricht 1 Molekül/*Bead*). Die fertige Emulsion-PCR wurde stets optisch auf einen möglichen Bruch der Emulsion geprüft. Nach Freisetzung der PCR-Produkt-tragenden *Beads* wurden diese entsprechend den Herstellerangaben mittels der o. g. Kits angereichert. Mittels des *Bead-Counter*s wurde die Menge an angereicherten *Beads* kontrolliert, Wurden 450.000-1.000.000 *Beads* angereichert, wurde eine Sequenzierlauf durchgeführt. Das Gerät wurde nach Herstellerangaben auf den Lauf vorbereitet und die PCR-Produkt-tragenden *Beads* auf die Pico-Titer-Platte mit dem *Bead-Deposition-Device* aufgebracht:

1. Lage (*Pre-Layer*): *Enzym-Beads*
2. Lage: *PCR-Produkt-Beads* und *Packing-Beads*
3. Lage (*Post-Layer*): *Enzym-Beads*
4. Lage: *PPiase-Beads*

Für den o. g. Ansatz kamen außerdem folgende nicht enthaltene Komponenten und Geräte zum Einsatz: Natriumhydroxid, Ethanol absolut und 2-Propanol, 1,5 ml-Reaktionsgefäß-Magnetständer (Eigenkonstruktion) sowie eine Plattenzentrifuge (Model 5430) und eine Tischzentrifuge (Fresco 17). Der Lauf wurde schließlich mittels der GS Junior Sequencer Software (Versionen 2.5p1/2.7) mit 200 Zyklen gestartet.

Zur primären Datenverarbeitung wurde das *Full-Processing-For-Amplicons*-Protokoll gewählt. Die Laufqualität wurde mittels der GS Run Browser Software visualisiert und überprüft. Besonderes Augenmerk wurde darauf gerichtet, dass kurze Fragmente (< 150 Basenpaare), welche beispielsweise ein vermehrtes Auftreten von Primer-Dimeren kennzeichnen, nicht gehäuft enthalten waren. Generell wurden folgende Laufparameter angestrebt:

- *Total Raw Wells*: < 250.000 (> 100.000)
- *Total Key Pass/Total Raw Wells*: > 90 %
- *Number Of Passed Filter Reads*: > 50.000-88.000
- *Mix+Dots/Total Key Pass*: < 20 %
- *Total Pass Filtering/Total Key Pass*: > 25-50 %

3. Material und Methoden

Zur weiteren Auswertung der Läufe wurde die SequencePilot Software (Modul: SeqNext, Version: 3.5.2) der Firma JSI medical systems verwendet. Hierzu wurden die im Vorfeld generierten SFF-Dateien verwendet und gegen die angelegten Referenzsequenzen für die jeweiligen Amplikons (i. d. R. kodierende Exons sowie +/- zehn Basen des Introns) *aligned*. Als *Coverage-Cut-off* wurden 50 *Reads* je Base für den o. g. analyserelevanten Bereich (mindestens 25 *Reads* pro Base in jede Richtung) definiert. Als *Cut-off* für die Detektion heterozygoter Basen wurden dabei folgende Parameter festgelegt:

- *Ignore Coverage*: 5 %
- *Distinct Coverage*: 20 %
- *Low coverage absolute*: 0
- *Complete fragments only*: no

Bei zu geringer *Coverage* oder Abweichungen von der Referenzsequenz im kodierenden Bereich sowie im Bereich der Exon-/Intron-Übergänge > 20 % wurde der entsprechende Abschnitt mittels Sanger-Sequenzierung nachanalysiert.

4. Ergebnisse

4.1. Zusammenfassende Ergebnisse für MKS, JS/JSRD und BBS

Als Basis für die Erstellung eines diagnostischen Algorithmus wurden zunächst für die Syndrome MKS, JS/JSRD und BBS die bestehenden Literaturdaten zu Mutation in den derzeit bekannten *MKS-* (*MKS1-10*), *JBTS-* (*JBTS1-17*) und *BBS-* (*BBS1-16*) Genen geprüft. Die einbezogenen Literaturdaten sind in den Tabellen A4, A5 und A6 des Anhangs zusammengestellt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse der eigenen molekulargenetischen Analysen und klinische Daten des eigenen Kollektivs erfasst und mit den ermittelten Literaturdaten verglichen. Dabei lag der Fokus für die Syndrome MKS, JS/JSRD auf den derzeit als häufig von Mutationen betroffenen, bekannten Genen *MKS1*, *MKS3*, *MKS4* und *MKS6* sowie *JBTS3*, *JBTS5*, *JBTS6*, *JBTS9*.

4.1.1. MKS

4.1.1.1. Literaturdaten zu Mutationshäufigkeiten für die MKS-Gene

Die bestehenden Literaturdaten zu Mutationen in den Genen *MKS1-10* wurden systematisch in Hinblick auf die ethnische Zusammensetzung der Kohorten, Anzahl der untersuchten Familien/Individuen, Vorselektion der Kohorten (Kopplungsanalytik, *Homozygosity-Mapping*, Mutationsausschluss in anderen Genen), angewandte Methodik (Sanger-Sequenzierung, dHPLC-/WAVE-Technologie, *Next-Generation-Sequencing*) und Anzahl der detektierten Mutationen sowie klinische Einschlusskriterien geprüft. Insgesamt wurden zunächst 27 Publikationen und eine Dissertation mit Mutationsbeschreibungen ausgewertet und in Hinblick auf die Erfüllung folgender Einschlusskriterien für eine weitere Einbeziehung der Daten analysiert (Liste der Publikationen: Anhang Tabelle A4):

- 1) Die klinischen Einschlusskriterien der Kohorte wurden angegeben und diese waren mit der Diagnose MKS vereinbar. Somit lag mindestens eine pränatale multizystische Nierendysplasie und mindestens eins der folgenden drei

4. Ergebnisse

Kriterien bei mindestens einem Betroffenen in einer Familie vor: Okzipitale Enzephalozele und/oder (postaxiale) Polydaktylie, Duktalplattenmalformation der Leber bzw. (periportale) Leberfibrose.

- 2) Die ethnische Zusammensetzung der Kohorte wurde angegeben.
- 3) Es handelte sich nicht um eine Einzelfallbeschreibung zur Genidentifikation ohne weitere Patienten.

In die finale Auswertung wurden schließlich Daten von acht Publikationen in Verbindung mit einer Dissertation einbezogen, die die o. g. Kriterien erfüllten (MKS P1 bis P8: Tabelle A4 des Anhangs). Hierbei wurde aufgrund der in der Literatur beschriebenen Unterschiede in den Mutationshäufigkeiten und Foundereffekten in verschiedenen Ethnien eine Unterteilung in drei Gruppen vorgenommen: 1) Europäisch-kaukasische Kohorten, 2) Finnische Kohorten, 3) Multiethnische Kohorten inklusive blutsverwandter Patienten aus verschiedenen orientalischen Ländern (Türkei und arabische Länder). Insgesamt wurden Daten zu 313 Familien erfasst, davon 61 europäische, 56 finnische und 196 Familien aus multiethnischen Kollektiven. Von den derzeit bekannten 10 *MKS*-Genen wurden zunächst Häufigkeitsdaten zu vier Genen erfasst: *MKS1*, *MKS3*, *MKS4* und *MKS6*, da hier nach Auswertung in der Mehrzahl der Fälle Mutationen detektiert wurden. Zu den weiteren *MKS*-Genen (*MKS2*, *MKS5*, *MKS7-MKS10*) wurden bisher meist Einzelfallbeschreibungen oder Beschreibungen von Mutationen in spezifischen ethnischen Populationen publiziert (Tabelle 4.2).

Im Falle von *MKS7* ist außerdem die phänotypische Zugehörigkeit zu MKS nicht restlos nachgewiesen. Die Patienten werden derzeit als *Meckel-Like* eingeordnet, da bisher kein Fall mit okzipitaler Enzephalozele beschrieben wurde.

Wurden Patienten in mehreren Kollektiven untersucht, wurden diese – soweit ersichtlich – nicht mehrfach erfasst. Bei vorselektierten Kohorten wurden die Patientenzahlen anhand der bekannten Häufigkeiten für die zuvor beschriebenen und untersuchten Gene hochgerechnet. Die Detektion lediglich einer pathogenen Mutation wurde für die verschiedenen Gene kaum berichtet (n= vier Fälle) und daher die Daten zu diesen Patienten nicht berücksichtigt.

4. Ergebnisse

Die detaillierte Zusammensetzung der europäischen Kollektive wurde in den Studien nicht näher beschrieben. Mutationen wurden explizit in deutschen, irischen, schwedischen und portugiesischen Familien erwähnt. Keine Mutation wurde in den europäischen Kollektiven in 13 % der Fälle nachgewiesen, bei 87 % der Patienten wurden somit ursächliche pathogene Mutationen identifiziert. Die Mehrzahl der Mutationen findet sich im *MKS1*-Gen (36 %), gefolgt von den Genen *MKS3*, *MKS4* und *MKS6* (Abbildung 4.1).

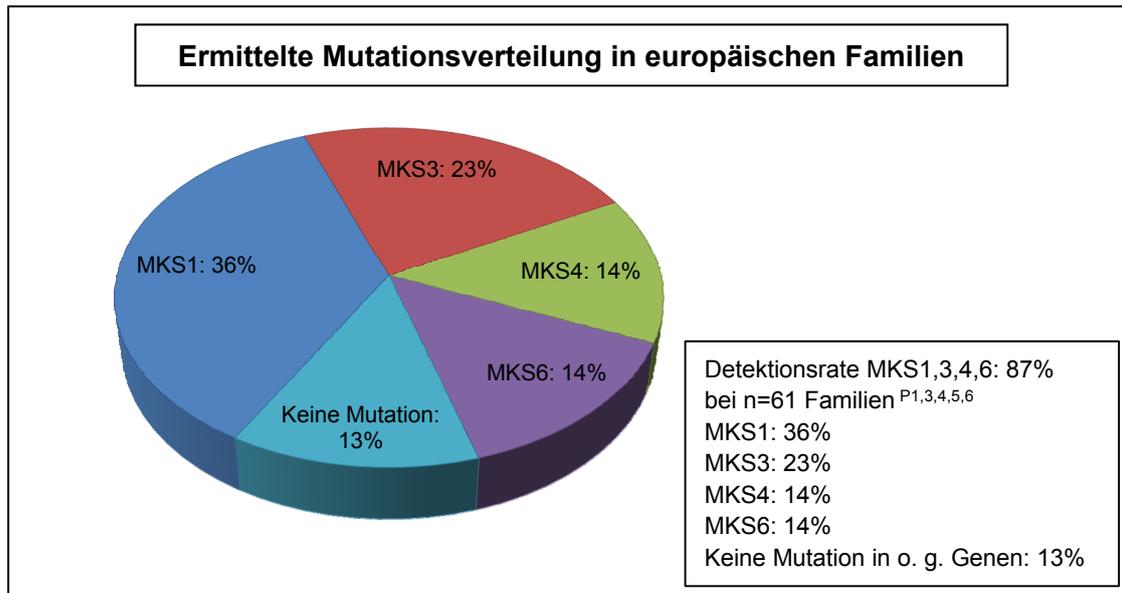


Abbildung 4.1: Aus der Literatur ermittelte Mutationshäufigkeiten der für die Auswertung einbezogenen *MKS*-Gene der europäischen Kollektive.

Die höchste Gesamtdetektionsrate wurde für das MKS in Finnland ermittelt (Abbildung 4.2). In 90 % der Fälle konnte die Ursache der Erkrankung molekulargenetisch aufgeklärt werden. Der Großteil der Mutationen wird im *MKS1*-Gen detektiert (65%). Hierbei ist vor allem die intronische spleißrelevante *MKS1*-Foundermutation Fin_{major} : c.1408-34_1408-6del (zunächst in der Literatur als IVS15-7_35del bezeichnet) von Bedeutung. Neben dieser und der *MKS6*-Spleißmutation c.1762C>T, p.Gln588X (funktionell: p.Val587fs) wurden bisher lediglich vier weitere Mutationen bei zwei Betroffenen beschrieben. Somit tragen zu den o. g. hohen Detektionsraten für das MKS in Finnland fast ausschließlich die zwei einleitend genannten Veränderungen bei (Tallila, 2009).

4. Ergebnisse

Die Heterozygotenfrequenz für die *MKS1*-Foundermutation (Fin_{major}: c.1408-34_1408-6del) wurde in einer Publikation ebenfalls für deutsche Fälle ermittelt und mit 1:260 beziffert (Auber et al, 2007).

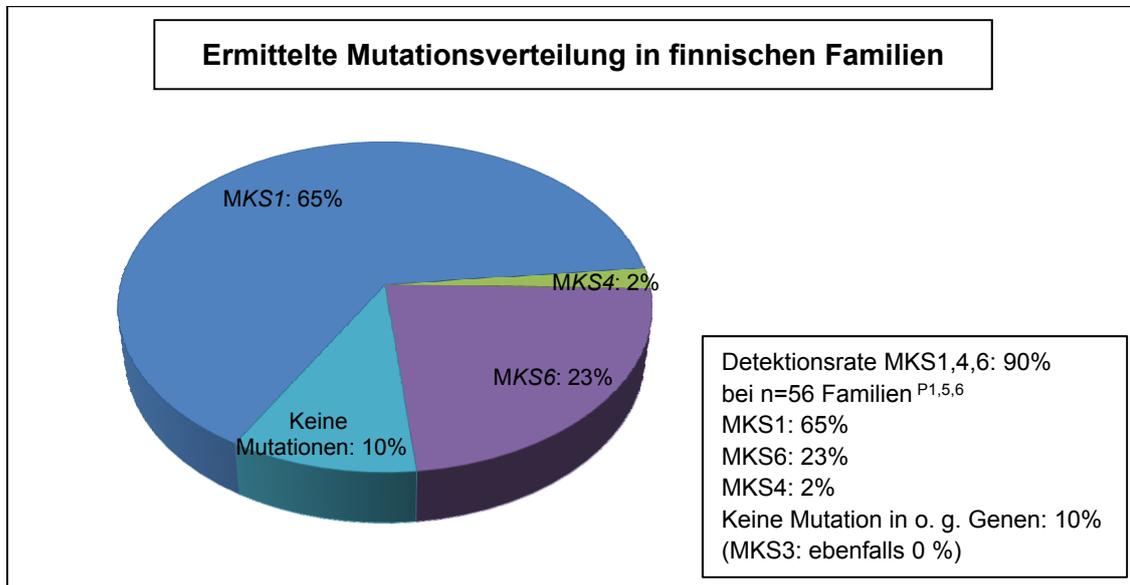


Abbildung 4.2: Aus der Literatur ermittelte Mutationshäufigkeiten der für die Auswertung einbezogenen *MKS*-Gene der finnischen Population.

Die Beurteilung der multiethnischen Kollektive führte nicht zu validen Ergebnissen über Häufigkeitsverteilungen aller vier genannten Gene, da bezüglich des *MKS4*-Gens bisher keine Häufigkeitsdaten veröffentlicht wurden (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Derzeit existierende Daten zu multiethnischen Kollektiven in Bezug auf Mutationshäufigkeiten der Gene *MKS1*, *MKS3*, *MKS4* und *MKS6*. (*=Häufigkeitsbereich: Angabe über Anzahl der untersuchten Familien unklar (n=54-120), **= Mindestdetektionsrate, KA= keine Angaben).

Gen	Ermittelte Mutationshäufigkeit
MKS1	7-15%* ^{P2}
MKS3	11-16%* ^{P2,8}
MKS4	KA
MKS6	>9%** ^{P7}

Darüber hinaus konnte für das *MKS6*-Gen nur ein Mindestanteil ermittelt werden, da die Analytik der in Tabelle 4.1 berücksichtigten Publikation zum Zeitpunkt der Veröffentlichung nach Angabe der Autoren nicht vollständig

4. Ergebnisse

abgeschlossen war. Hier wurden zunächst blutsverwandte und Multiplex-Familien auf eine Vereinbarkeit mit Mutationen im *MKS6*-Gen voruntersucht und mehrheitlich in den kompatiblen Familien Mutationen detektiert. Untersuchungen der weiteren sporadischen Fälle im Gesamtkollektiv lagen jedoch noch nicht vor, daher geben die Autoren eine Mindestdetektionsrate an. Etwa die Hälfte der hier einbezogenen Mutationen wurde in blutsverwandten Familien aus Algerien, Pakistan und der Türkei detektiert.

Ein geringerer Anteil an Mutationen, der zu einer 100 %-igen Detektionsrate fehlenden 13 % bzw. 10 % der europäischen und finnischen Population, verteilen sich auf die weiteren bekannten Gene *MKS2*, *MKS5*, *MKS7*, *MKS8*, *MKS9*, *MKS10*. Der genaue Anteil konnte jedoch nicht ermittelt werden, da hier bis dato i. d. R. nur Einzelfamilien berichtet wurden oder mehrheitlich besondere Populationen oder Familienkonstellationen untersucht wurden. Die bisher veröffentlichten Fälle sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der beschriebenen Einzelfamilien für die weiteren *MKS*-Gene. (Französisch.= französisch, KI= keine Information verfügbar, Kons.= Konsanguinität, Pakistan.= pakistanisch, Palästin.= palästinensisch, Tun.= tunesisch, *= bei einer Familie wurde eine Dandy-Walker-Malformation berichtet, drei Familien zeigten keine oder diffuse ZNS-Auffälligkeiten)

Gen:	MKS2 (TMEM216) (Valente et al, 2010)	MKS5 (RPGRI1L) (Delous et al, 2007)	MKS7 (NPHP3) (Bergmann et al, 2008)	MKS8 (TCTN2) (Shaheen et al, 2011)	MKS9 (B9D1) (Hopp et al, 2011)	MKS10 (B9D2) (Dowde et al, 2011)
Anzahl Familien:	n=6	n=2	n=4 (1*)	n=1	n=1	n=1
Herkunft:	2x Tun., 3x Palästin., 1x Britisch	1x Marokkan., 1x Französ.	Türkisch	Arabisch	USA	Surinamisch (Indisch- Pakistan.)
Kons.	KI	+ , -	+	+	-	+

Um Überschneidungen der Daten zu vermeiden wurden Publikationen zum eigenen Kollektiv nicht in die initiale Literaturlauswertung bezüglich der Häufigkeit von Mutationen mit einbezogen (Frank et al, 2007), (Frank et al, 2008).

4. Ergebnisse

4.1.1.2. Daten des eigenen MKS-Kollektivs

Bei Indikation "Verdacht auf Meckel-Gruber-Syndrom" wurden im eigenen multiethnischen Patientenkollektiv bei 33 der 88 Familien zwei klar pathogenetisch relevante Veränderungen in den vier Genen *MKS1*, *MKS3*, *MKS4* und *MKS6* detektiert (37,5 %). Die Segregation wurde bestätigt, soweit elterliche/kindliche Proben vorlagen. In sechs Familien wurden lediglich eine pathogene Mutation oder eine oder mehrere Mutationen von ungeklärter pathogenetischer Relevanz nachgewiesen (7,4 %). Die detaillierte Mutationsverteilung auf die vier Gene beschreibt Abbildung 4.3.

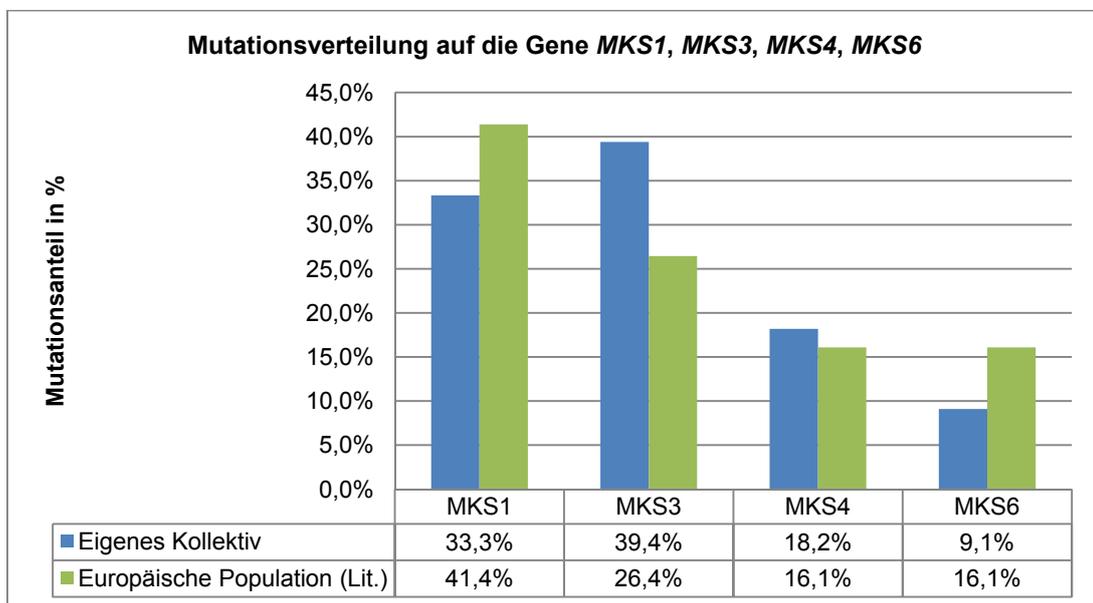


Abbildung 4.3: Vergleich der Mutationsverteilung der Gene *MKS1*, *MKS3*, *MKS4* und *MKS6* zwischen dem eigenen Kollektiv und den aus der Literatur ermittelten Daten.

Berücksichtigt man lediglich die Familien, bei denen alle vier genannten Gene untersucht wurden und im Falle einer Locuskompatibilität auch eine Sequenzieranalytik erfolgt ist (n=43), erhöht sich die Detektionsrate auf 76,7 %. Wobei auch Familien inkludiert wurden, bei denen aufgrund der Detektion von pathogenen Mutationen keine weitere Analytik der genannten Gene erfolgte. Bei vier Patienten (18,2 %) wurden lediglich eine klar pathogenetisch relevante Mutation in einem der Gene oder eine oder mehrere unklare Varianten beobachtet. In keinem der weiteren untersuchten *MKS*-Gene (*MKS2*, *MKS5*, *MKS7*) konnten nachweislich pathogene Mutationen nachgewiesen werden.

4.1.2. JS/JSRD

4.1.2.1. Literaturdaten zu Mutationshäufigkeiten für die JS-Gene

Die einschlägige Literatur wurde bezüglich der derzeit bekannten JS-Gene (*JBTS1-17*) systematisch in Hinblick auf Angaben zu Mutationshäufigkeiten in den entsprechenden Genen sowie die klinischen Einschlusskriterien gesichtet. Hierzu wurden primär 51 Publikationen (Anhang Tabelle A5) mit Mutationsbeschreibungen ausgewertet. Angaben zur ethnischen Zusammensetzung der Kollektive lagen im Detail nicht vor und konnten daher nicht regelhaft berücksichtigt werden. Es ist von multiethnischen Kollektiven auszugehen. Für die nach Literaturrecherche derzeit als "am häufigsten von Mutationen betroffen" zu bezeichnenden Gene (*JBSTS3*, *JBTS5/MKS4*, *JBTS6/MKS3*, *JBTS9/MKS6*) wurden die entsprechenden Mutationshäufigkeiten erfasst und ausgewertet (Tabelle 4.3). Final konnten hierfür schließlich acht Publikationen ausgewertet werden (JS P1 bis P8: Anhang Tabelle A5). Aufgrund der klinischen Überlappungen und fließenden Übergänge zwischen dem/den JS/JSRD und verschiedenen weiteren Ziliopathien wie der Nephronophthise konnten keine einheitlichen klinischen Einschlusskriterien ermittelt werden. Als einziges Einschlusskriterium wurde somit die Angabe über den Nachweis des MTS- oder einer Vermishypoplasie bzw. -agenesie bei den Patienten gewertet. Die Angaben beziehen sich soweit ersichtlich ausschließlich auf weder klinisch noch genetisch vorselektierte Kohorten und wurden daher unter der Annahme einer gleichmäßigen Verteilung aller JS-Subgruppen ermittelt.

Tabelle 4.3: Daten zu multiethnischen Kollektiven in Bezug auf Mutationshäufigkeiten der Gene *JBTS3*, *JBTS5*, *JBTS6* und *JBTS9*. Die Ergebnisse basieren auf der Untersuchung von n=768 Individuen.

Gen	Ermittelte Mutationshäufigkeit
JBTS3	12% ^{P1,2,4,6}
JBTS5/MKS4	13% ^{P3,6}
JBTS6/MKS3	6% ^{P6,7}
JBTS9/MKS6	9% ^{P6}
Detektionsrate JBTS3,5,6,9:	40%

4. Ergebnisse

Die Gesamtdetektionsrate für die genannten Gene beträgt 40 %, insgesamt wird diese derzeit für alle bekannten Gene mit ca. 50 % angegeben (Valente et al, 2011).

Die für die weiteren bekannten *JBTS*-Gene beschriebenen Fälle sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Inwieweit sich die o. g. Detektionsrate durch die weiteren, jüngst detektierten *JBTS*-Gene erhöht, lässt sich derzeit noch nicht im Detail beurteilen. Für einige Gene wurde bereits nachgewiesen, dass sie in besonderen Bevölkerungsgruppen eine größere Rolle spielen. So wurde für eine Mutation im *JBTS2-* (*TMEM216-*) Gen in der aschkenasisch-jüdischen Bevölkerung eine Heterozygoten-Frequenz von 1:92 ermittelt (Edvardson et al, 2010).

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der beschriebenen Familien für die nach der hier durchgeführten Literaturrecherche derzeit als "vermutlich seltener von Mutationen betroffen" oder als "bisher von unklarer Relevanz" zu bezeichnenden *JBTS*-Gene. (Ägypt.= ägyptisch, Arab.= arabisch, Aschk.= aschkenasisch-jüdisch, Bangl.= aus Bangladesch stammend, Eur.= europäisch, FH= Founderhaplotyp nachgewiesen oder angenommen, Franz.= französisch, Ital.= italienisch, Jordan.= jordanisch, Kanad.= kanadisch, KI= keine Information verfügbar, Kons.= Konsanguinität, Malay.= malaysisch, Neus.= neuseeländisch, Österr.= österreichisch, Pakist.= pakistanisch, Palästin.= palästinensisch, Portug.= portugiesisch, Türk.= türkisch, X-Chrom.= X-chromosomal, *= heterozygote Mutationen detektiert)

Gen:	JBTS1 (INPP5E) (Bielas et al, 2009)	JBTS2 (MKS2/ TMEM216) (Edvardson et al, 2010, Valente et al, 2010)	JBTS4 (NPHP1) (Parisi & Glass, 2003 [updated 2012])	JBTS7 (MKS5/ RPGRIP1L) (Parisi & Glass, 2003 [updated 2012])	JBTS8 (ARL13B) (Cantagrel et al, 2008)	JBTS10 (OFDI) (Coene et al, 2009)	JBTS11 (TTC21B) (Davis et al, 2011)
Anzahl Familien	n=7	n=22			n=2	n=3	n=0 (3*)
Her-kunft	3x Arab., 1x Türk., 1x Ägypt., 2x Ital.	2x Ital., 1x Türk., 1x Neus., 1x Eur., 9x Aschk.	ca. 1-2%	ca. 2-4%	1x Pakist., 1x USA	1x Malay., 2x KI	2x Eur., 1x Türk.
Kons.	+	+, FH	+/-	+/-	+/-	X-Chrom.	KI

4. Ergebnisse

Gen:	JBTS12 (KIF7) (Dafinger et al, 2011)	JBTS13 (TCTN1) (Garcia- Gonzalo et al, 2011, Alazami et al, 2012)	JBTS714 (TMEM237) (Huang et al, 2011, Alazami et al, 2012)	JBTS15 (CEP41) (Lee et al, 2012, Alazami et al, 2012)	JBTS16 (TMEM138) (Lee et al, 2012)	JBTS17 (C5ORF42) (Srouf et al, 2012, Alazami et al, 2012)
Anzahl Familien	n=1 (3*)	n=3	n=15	n=3	n=8	n=9
Her- kunft	1x Ägypt., (2x Deutsch)	1x Bangl., 2x Arab.	10x Kanad.- Hutterer, 1x Österr., 1x Jordan., 1x Eur., 2x Arab.	2x Ägypt., 1x Portug.	Arab.	7x Franz.- Kanad., 2x Arab.
Kons.	+ / (-)	+	+, FH, 1x -	+	+	+, FH

4.1.2.2. Daten des eigenen JS-Kollektivs

Bei Indikation "Verdacht auf Joubert-Syndrom oder assoziierte Erkrankungen" konnten im eigenen multiethnischen Kollektiv bei 14 der 61 Familien zwei klar pathogenetisch relevante Veränderungen in den vier in Abbildung 4.4 genannten Genen nachgewiesen werden (23,2 %). Die Segregation wurde bestätigt, soweit elterliche/kindliche Proben vorlagen. Lediglich eine pathogenetisch relevante Veränderung bzw. unklare Varianten wurden bei zwei Patienten detektiert (3,3 %).

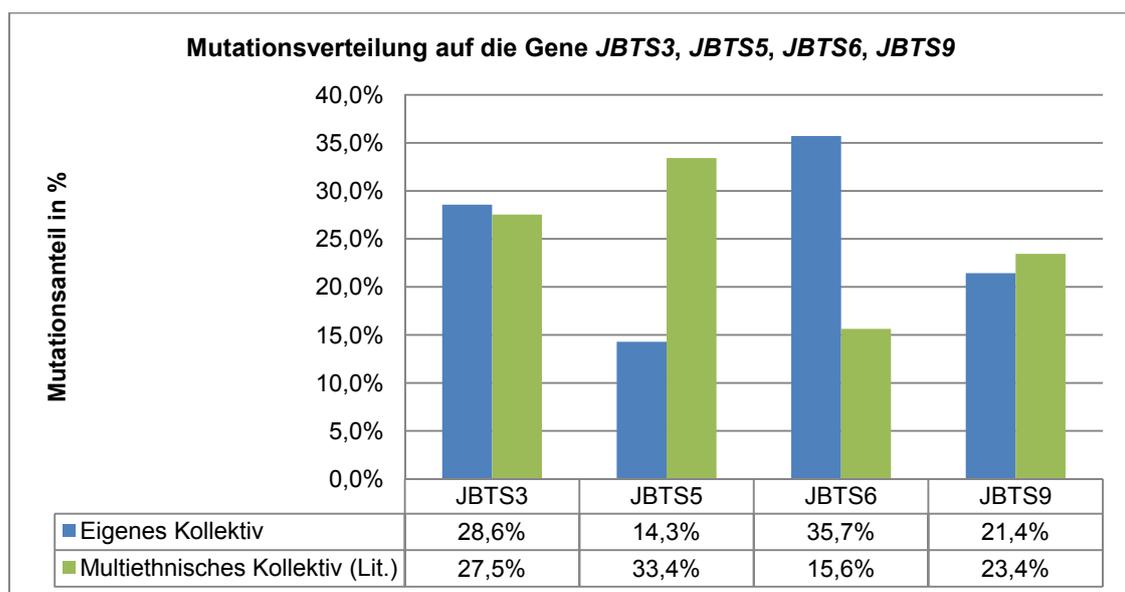


Abbildung 4.4: Korrelation der Mutationsverteilung auf die Gene JBTS3, JBTS5, JBTS6 und JBTS9 der Literaturdaten mit den Daten des eigenen Kollektivs.

4. Ergebnisse

Unter ausschließlicher Einbeziehung von Familien, bei denen alle vier Gene untersucht wurden, sowie im Falle einer Locuskompatibilität auch eine Sequenzieranalytik erfolgt ist (n=31), liegt die Gesamtdetektionsrate bei 45,2 %. Familien, bei welchen aufgrund der Detektion von pathogenen Mutationen in den genannten Genen keine weitere Analytik erfolgte, wurden ebenfalls eingeschlossen. Bei zwei Patienten (6,4 %) wurden lediglich eine klar pathogenetisch relevante Mutation bzw. unklare Varianten nachgewiesen. In keinem der weiteren untersuchten *JBTS*-Gene (*JBTS1*, *JBTS2*, *JBTS4*, *JBTS7* oder *JBTS8*) konnten klar pathogene Mutationen detektiert werden.

4.1.3.BBS

4.1.3.1. Literaturdaten zu Mutationshäufigkeiten für die BBS-Gene

Die für die Ermittlung der Mutationshäufigkeiten in den derzeit bekannten *BBS*-Genen (*BBS1-16*) ausgewerteten Literaturdaten sind in Anhang Tabelle A6 zusammengefasst. Neben Mutationsfrequenzen wurden außerdem ermittelte Heterozygotenfrequenzen für verschiedene *BBS*-Gene in Nordamerika (Tabelle 4.5) aufgenommen. Zwei rekurrente Mutationen, die v. a. in der europäischen Population den Hauptanteil der detektierten Mutationen ausmachen sind außerdem hervorzuheben: c.1169T>G (p.Met390Arg) des *BBS1*-Gens und c.271dup (p.Cys91LeufsX5, in der Literatur auch als p.Cys91fsX95 bezeichnet) des *BBS10*-Gens. Sie machen beispielsweise in einer Studie 73,4 % bzw. 48,3 % der Mutationen in den entsprechenden Genen aus (Muller et al, 2010). Unterschiede in verschiedenen Populationen sind hier nicht berücksichtigt, wurden jedoch beschrieben. So wurden beispielsweise in der neufundländischen Bevölkerung vermehrt Mutationen im *BBS6*-Gen nachgewiesen (Katsanis et al, 2000). Bei den in dieser Arbeit berücksichtigten Fällen wurde mit großer Mehrheit eine autosomal-rezessive Vererbung beobachtet, wobei jeweils nicht alle Gene untersucht wurden. Die kumulative Heterozygotenfrequenz für alle *BBS*-Gene wird für die europäische Bevölkerung auf etwa 1:50 geschätzt (Laurier et al, 2006). Eine triallelische oder andere Vererbung wird derzeit für < 10 % der Familien angenommen (Waters & Beales, 1993 [updated 2011]). Mutationen in den Genen *BBS1*,

4. Ergebnisse

BBS2, *BBS10* und *BBS12* finden sich somit laut Literatur bei etwa 64,6 % der Patienten bei einer durchschnittlichen Gesamtdetektionsrate von 82,7 %.

Tabelle 4.5: Auswahl von in der Literatur zusammengestellten Mutationshäufigkeiten in *BBS*-Genen multiethnischer Kollektive. Die am häufigsten von Mutationen betroffenen *BBS*-Gene (mindestens in einem Kollektiv bei > 10 % der Patienten detektiert) sind in grau hinterlegt.

Zitat:// Gen:	Waters & Beales 1993, (updated 2011) ^{P1} (Sammlung)	Muller et al, 2010 ^{P2} (eigenes Kollektiv)	Deveault et al, 2011 ^{P4} (eigenes Kollektiv)	Mockel et al, 2011 ^{P5} (Sammlung)	Sapp et al, 2010 ^{P3} (eigene Kollektive, Nordamerika)
BBS1	23,3%	25,1%	16,9%	23,0%	40%, 1:250
BBS2	8,1%	4,6%	12,0%	8,0%	6,4%, 1:620
BBS3	0,4%	-	-	0,4%	0,5%, 1:2.200
BBS4	2,3%	4,6%	1,2%	2,0%	2,1%, 1:1.100
BBS5	0,4%	1,7%	2,4%	0,4%	1,6%, 1:1.200
BBS6	5,8%	2,9%	4,8%	6,0%	5,9%, 1:650
BBS7	1,5%	1,1%	2,4%	2,0%	2,1%, 1:1.100
BBS8	1,2%	1,7%	2,4%	1,0%	-
BBS9	6,0%	2,3%	1,2%	6,0%	3,7%, 1:820
BBS10	20,0%	25,1%	21,7%	20,0%	28,9%, 1:290
BBS11	< 0,4%	-	-	0,1%	-
BBS12	5,0%	8,0%	10,8%	5,0%	8,0%, 1:560
BBS13	4,5%	KA	KA	5,0%	KA
BBS14	0,6%	KA	KA	1,0%	KA
BBS15	KA	KA	KA	1,0%	KA
SDCCAG8	KA	KA	KA	1,0%	KA
Detektions- rate	79,5%	77,1%	75,8%	81,9%	99,2%

4. Ergebnisse

4.1.3.2. Daten des eigenen BBS-Kollektivs

Bei Indikation "Verdacht auf Bardet-Biedl-Syndrom" wurden im eigenen multiethnischen Patienten-Kollektiv bei 26 der 66 Patienten zwei klar pathogenetisch relevante Mutationen mehrheitlich in den Genen *BBS1*, *BBS2*, *BBS10* und *BBS12* identifiziert. Bei zwei der 26 aufgeklärten Patienten wurden Mutationen im *BBS4*- und bei jeweils einem Patienten Mutationen im *BBS7*- und *BBS8*-Gen detektiert. Somit konnten im eigenen Kollektiv bei 39,4 % der Patienten ursächliche Mutationen nachgewiesen werden (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Vergleich der Mutationsverteilung der *BBS*-Gene zwischen den Daten des eigenen Kollektivs und den aus der Literatur ermittelten. (NU= nicht untersucht)

Gen	Eigenes Kollektiv	Literatur
BBS1	7,6%	25,7%
BBS2	3,0%	7,8%
BBS3	-	0,3%
BBS4	3,0%	2,4%
BBS5	-	1,3%
BBS6	-	5,1%
BBS7	1,5%	1,8%
BBS8	1,5%	1,3%
BBS9	-	3,8%
BBS10	16,7%	23,1%
BBS11	-	0,1%
BBS12	6,1%	7,4%
BBS13	-	1,9%
BBS14	-	0,3%
BBS15	NU	0,2%
Gesamtdetektionsrate	39,4%	82,5%

Relative Vergleichszahlen bei einer angenommenen 100 %-igen Detektionsrate sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Der Großteil der Mutationen entfällt sowohl für die der Literatur entnommenen Daten als auch für das eigene Kollektiv auf die Gene *BBS1*, *BBS2*, *BBS10* und *BBS12*. Im eigenen Kollektiv wurden bei 42,4 % der Fälle mit Mutation, Mutationen im *BBS10*-Gen nachgewiesen. Bei 19,3 % der Patienten wurden Mutationen im *BBS1*-Gen detektiert.

4. Ergebnisse

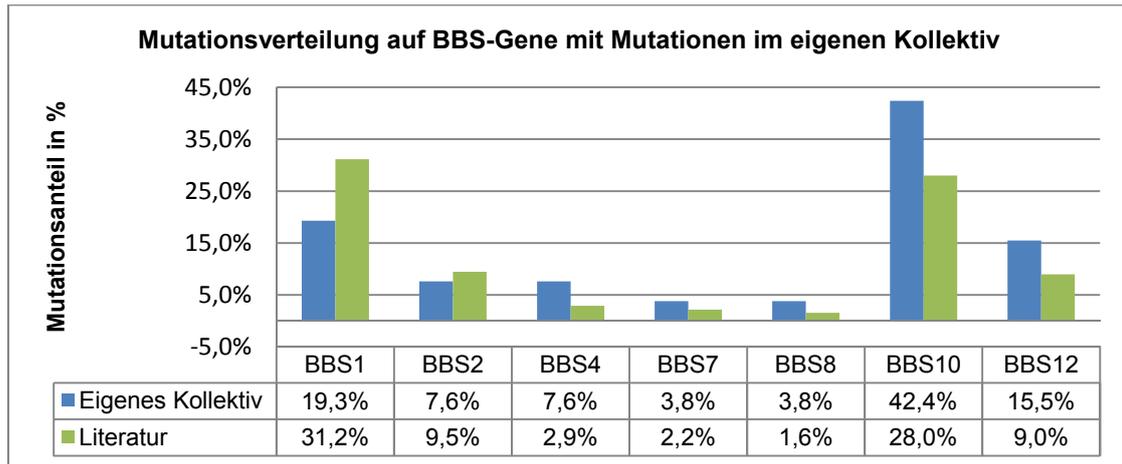


Abbildung 4.5: Vergleich der Mutationsverteilung der Gene *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS7*, *BBS8*, *BBS10* und *BBS12* zwischen den Daten des eigenen Kollektivs und den aus der Literatur ermittelten Daten. Es wurden nur die Gene berücksichtigt, bei denen im eigenen Kollektiv ebenfalls Veränderungen detektiert wurden.

Während in den Kollektiven aus der Literatur 15,8 % der Mutationen auf die Gene *BBS3*, *BBS5*, *BBS6*, *BBS9*, *BBS11*, *BBS13*, *BBS14*, *BBS15* entfallen, wurden im eigenen Kollektiv hier bisher – soweit untersucht – keine Mutationen nachgewiesen. Das *BBS15*-, sowie das *SDCCAG8*-Gen wurden im eigenen Kollektiv bisher nicht analysiert.

4.2. SNP-Array-Analytik im eigenen Kollektiv

SNP-Arrays werden sowohl zum Nachweis von chromosomalen Imbalancen als auch für die Testung auf homozygote Bereiche im Patientengenom (*Runs-Of-Homozygosity*, ROH) bei bestehender Blutsverwandtschaft im Vorfeld einer gezielten molekulargenetischen Analytik eingesetzt. Bei konsanguinen Ziliopathie-Patienten scheint die Technik aufgrund der extremen Heterogenie und genetischen Überlappungen attraktiv. Eine diagnostische Anwendung wurde jedoch für die hier thematisierten Ziliopathien bisher ausschließlich beim BBS berichtet (Abu Safieh et al, 2010). Darüber hinaus muss je nach klinischer Manifestation bei Verdacht auf ein Ziliopathiesyndrom als wichtige Differenzialdiagnose eine chromosomale Imbalance berücksichtigt werden (Kroes et al, 2011).

4.2.1. Homozygotie-Screening

Neben der Anwendung eines häufigkeitsbasierten Algorithmus sollte geprüft werden, inwieweit in blutsverwandten Familien SNP-Arrays durch Einbeziehung von ROH und anschließender gezielter Genanalytik der ermittelten Bereiche zur Detektion von ursächlichen Mutationen eingesetzt werden können. Die Ergebnisse der SNP-Array-Analytik für die jeweiligen bekannten Loci (*MKS1-10*, *JBTS1-9* bzw. *JBTS11-17*, *BBS1-16*) sind in den Tabellen 4.7-4.9 zusammengefasst. Aufgeführt werden aus Gründen der Übersicht allgemein ROH ab einer Größe von 5 Mb bzw. 2 Mb für die untersuchten Syndrom-Loci, da der kleinste ROH-Block mit Nachweis einer homozygoten Mutation 2 Mb entsprach. Bei unklarem Verdacht auf Blutsverwandtschaft ist der sichere Nachweis mittels SNP-Array komplex. Für die hier untersuchten Familien lag die Information über das (mögliche) Bestehen einer Blutsverwandtschaft durch den Einsender vor. Dennoch sollte ermittelt werden inwieweit sich dies durch die erhobenen ROH-Daten belegen lässt.

Alle hier mit dieser Technik untersuchten Familien mit angegebener Blutsverwandtschaft zeigten ROH > 5 Mb. Ausgenommen Familie JS-21, bei welcher bei angegebener Konsanguinität lediglich zwei ROH von 5-10 Mb nachgewiesen werden konnten, zeigten alle Familien auch mindestens einen

4. Ergebnisse

ROH-Block > 10 Mb. Familie MKS-11 soll an dieser Stelle aufgrund der eingeschränkten DNA- und somit Datenqualität von der Auswertung ausgenommen werden. Alle weiteren Arrays erfüllten die angesetzten Qualitätsparameter. Z. T. konnten ROH bis zu einer Größe von über 60 Mb bei einzelnen Patienten (z. B. MKS-88) beobachtet werden.

Insgesamt wurden bei 29 blutsverwandten Individuen (ohne Berücksichtigung von Verwandtschaftsgrad und ethnischen Hintergrund) im Mittel 12 (2-20) ROH von 5 Mb und größer bzw. 7 (0-14) ROH von 10 Mb und größer beobachtet. Bei drei untersuchten Familien wurde vom Einsender angegeben, dass keine Blutsverwandtschaft besteht (zwei deutsche Familien). Bei keiner der Familien wurde ein ROH-Block > 10 Mb nachgewiesen, zwei der drei Patienten zeigten ROH von 5-10 Mb.

Mutationen wurden im Mittel im viertgrößten ROH-Block (1.-16.-größter ROH-Block) nachgewiesen. Bei sechs der 18 Patienten mit Nachweis einer homozygoten Mutation (ausgenommen Familie MKS-11) wurden diese im größten ROH-Block ermittelt. Die mutationstragenden ROH erreichten im Durchschnitt eine Größe von 23,4 Mb (2,5 Mb- 61,4 Mb) (Abbildung 4.6).

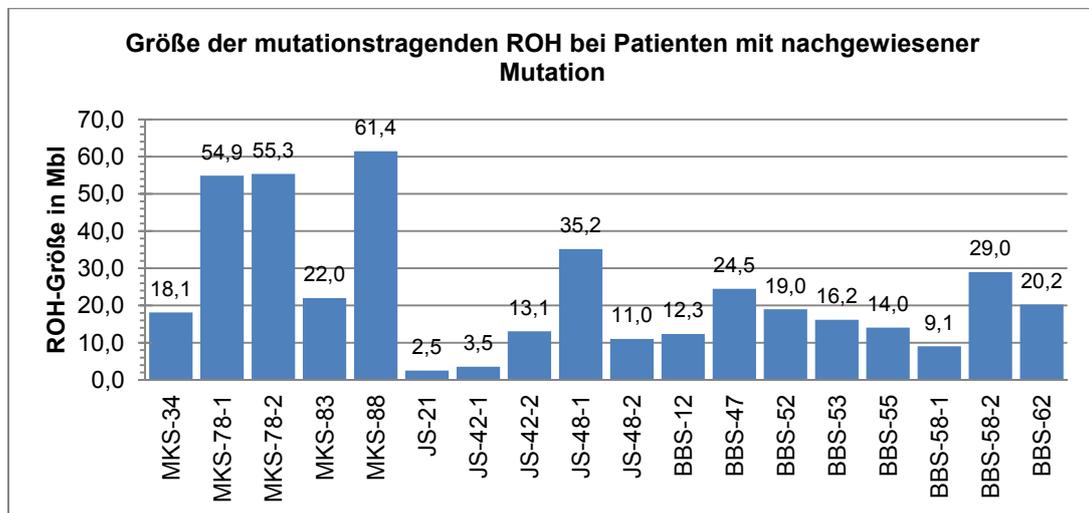


Abbildung 4.6: Darstellung der Größe der mutationstragenden ROH bei mittels SNP-Array untersuchten Ziliopathie-Familien des eigenen Kollektivs.

Im Mittel zeigte sich für zwei der untersuchten Syndrom-Loci eine Homozygotie > 2 Mb, wobei Mutationen in den weiteren homozygoten Genen i. d. R. ebenfalls ausgeschlossen wurden (Tabellen A1-A3 des Anhangs). Es ist anzumerken, dass einzelne Loci in räumlicher Nähe zueinander liegen, sodass eine Homozygotie für beide Loci gehäuft beobachtet werden konnte (z. B.:

4. Ergebnisse

BBS7 und *BBS12*; *BBS14* und *BBS10*). Abbildung 4.7 zeigt exemplarisch die Darstellung von ROH für die hier durchgeführten Auswertungen.

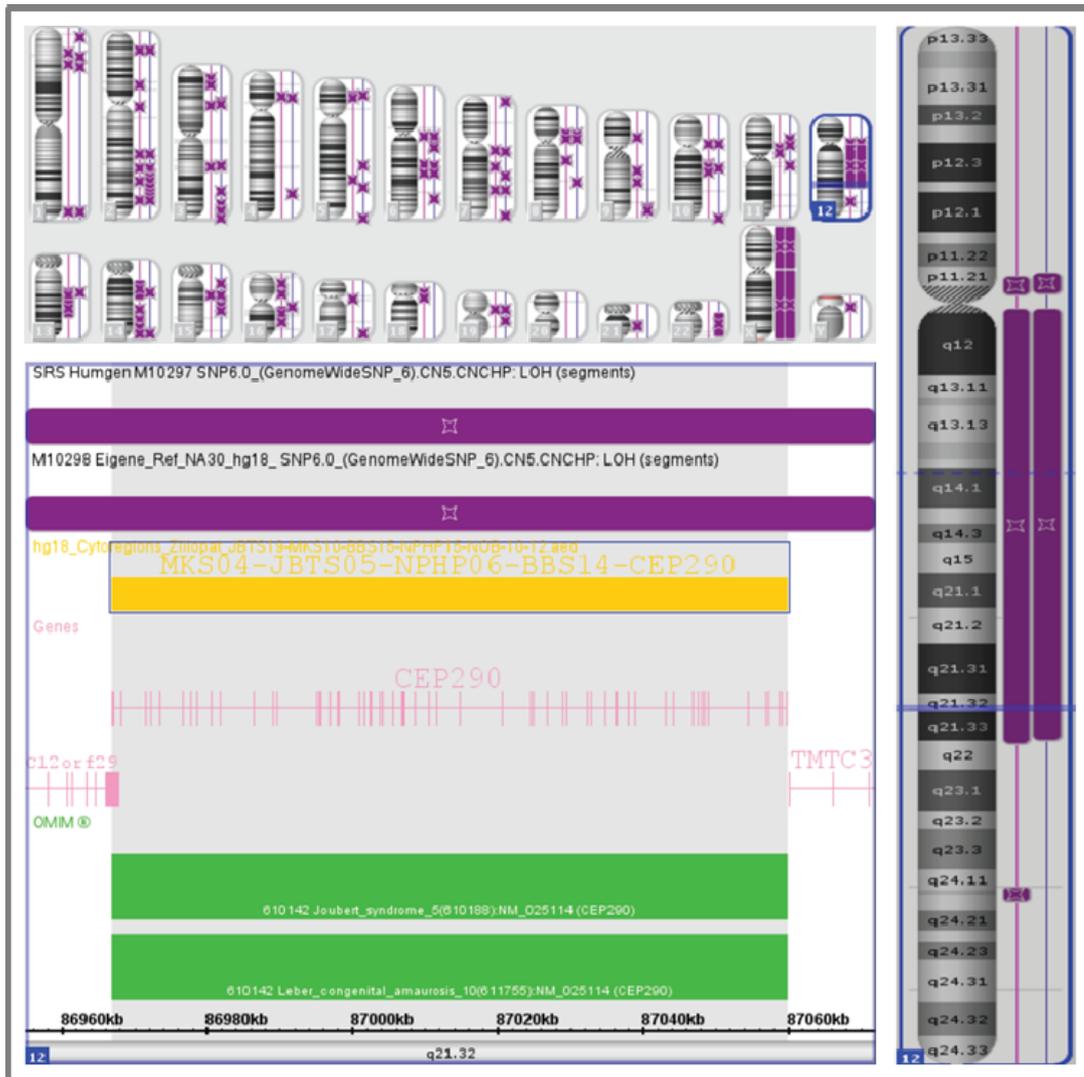


Abbildung 4.7: Darstellung der ROH der betroffenen Feten der Familie MKS-78 mittels Chromosome Analysis Suite in lila. Im *MKS4-* (*CEP290-*) Gen wurde in der Folge eine homozygote *Frameshift*-Mutation (p.Asn1049LysfsX16) nachgewiesen. Die initiale klinische Verdachtsdiagnose ARPKD (aufgrund des fehlenden Nachweises einer ZNS-Beteiligung und einer Polydaktylie) wurde revidiert. Der zweite betroffenen Fet zeigte schließlich neben zystischen Nierenveränderungen eine Dandy-Walker-Malformation.

Bei fünf der neun blutsverwandten und fraglich blutsverwandten MKS-Familien wurde eine Homozygotie > 2 Mb für bekannte *MKS*-Loci und in der Folge ursächliche Mutationen in den entsprechenden Genen nachgewiesen. Anzumerken ist, dass bei Familie MKS-39 trotz anzunehmender Blutsverwandtschaft *compound*-heterozygote Mutationen im *MKS6*-Gen ermittelt wurden. Bei Familie MKS-56 ist eine Blutsverwandtschaft ebenfalls wahrscheinlich (zwei der drei Indexfeten zeigen ROH > 10 Mb, 1 Fet einen

4. Ergebnisse

ROH-Block > 20 Mb), es konnte keine gemeinsame Homozygotie für die bekannten Loci bei den drei Betroffenen nachgewiesen werden. Bei Familie MKS-85 ergab sich kein Hinweis auf eine Blutsverwandtschaft.

Tabelle 4.7: Mittels SNP-Array ermittelte Homozygotie für ausgewählte mehrheitlich blutsverwandte MKS-Patienten. Loci mit Mutationsnachweis wurden durch Unterstreichen gekennzeichnet. ROH-Größen-Kategorie mit mutationstragendem ROH wurde in fett markiert. (C/C= Cousin/Cousine, Ge.= Geschlecht, Ko.= Konsanguinitätsgrad, Mb= Megabasen, ROH= Homozygotieblock, 1G= 1. Grades etc., *= zur Validierung genutzte Proben, **= Prüfung auf Homozygotie für die Gene *MKS1-MKS10*, ***= Ergebnisse entsprachen nicht den angelegten Qualitätsparametern aufgrund der eingeschränkten DNA-Qualität)

Familie	Status	Herkunft	Ge.	Ko.	Homozygotie**	Befund
MKS-11*	Index	Kosovarisch	XY	unklar	<u>MKS4: 2,0 Mb***</u> ROH >50 Mb: 0*** ROH >20 Mb: 0*** ROH >10 Mb: 0*** ROH >5 Mb: 0***	<u>MKS4:</u> p.Ala1832ProfsX19(d)ho
MKS-34*	Index	KI	XY	+	<u>MKS3: 18,1 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 2 ROH >10 Mb: 11 ROH >5 Mb: 3	<u>MKS3:</u> p.Gly195IlefsX13(d)ho
MKS-39	Gesundes Kind	Arabisch	XX	unklar	- ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 2 ROH >10 Mb: 1 ROH >5 Mb: 4	<u>MKS6:</u> p.Arg1218X(n)he, c.4315-6_4315-4del(s)he
	Index 1		XY		- ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 0 ROH >5 Mb: 3	
	Index 2		XX		- ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 1 ROH >5 Mb: 2	
MKS-56	Index 1	Türkisch	XX	unklar	<u>MKS3: 16,1 Mb</u> <u>MKS10: 5,1 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 1 ROH >5 Mb: 2	-
	Index 2		XY		- ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 1 ROH >5 Mb: 1	
	Index 3		XY		<u>MKS10: 5,3 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 0 ROH >5 Mb: 2	

4. Ergebnisse

Familie	Status	Herkunft	Ge.	Ko.	Homozygotie**	Befund
MKS-70	Index	Türkisch	XX	C/C 1G	- ROH >50 Mb: 2 ROH >20 Mb: 4 ROH >10 Mb: 3 ROH >5 Mb: 11	-
MKS-78	Index 1	Tunesisch	XY	C/C 1G	<u>MKS4: 54,9 Mb</u> <u>MKS7: 12,3 Mb</u> ROH >50 Mb: 1 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 1 ROH >5 Mb: 2	MKS4: p.Asn1049Lys fsX16(d,i)ho
	Index 2		XY		<u>MKS4: 53,3 Mb</u> <u>MKS5: 18,9 Mb</u> ROH >50 Mb: 1 ROH >20 Mb: 2 ROH >10 Mb: 3 ROH >5 Mb: 2	
MKS-81	Index	Türkisch	XY	+	MKS9: 2,5 Mb ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 3 ROH >10 Mb: 3 ROH >5 Mb: 5	- (MKS9 nicht untersucht)
MKS-83	Index	Türkisch	XX	C/C 1G	<u>MKS4: 22 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 1 ROH >5 Mb: 7	MKS4: c.5012-5G>T(s)ho
MKS-85	Index	KI	XY	nicht bekannt	- ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 0 ROH >5 Mb: 0	(MKS6: p.Arg1445X(n)he; MKS3: p.Val171Ile(m)he MKS4: p.Arg1746Gln(m)he (rs61941020 <1%))
MKS-88	Index	Türkisch	XX	+	<u>MKS3: 61,4 Mb</u> <u>MKS1: 2,0 Mb</u> ROH >50 Mb: 1 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 4 ROH >5 Mb: 3	MKS3: p.Gln467X(n)ho

Bei drei der acht blutsverwandten JS-Familien wurde eine Homozygotie > 2 Mb für bekannte *JBTS*-Loci sowie die ursächlichen Mutationen nachgewiesen (Tabelle 4.8). Familie JS-6 und JS-39 wurden bisher nicht auf Mutationen in den homozygoten Loci untersucht, sodass Mutationen in den entsprechenden Genen nicht auszuschließen sind. Bei Familie JS-10 konnte keine gemeinsame Homozygotie für die bekannten Loci bei den zwei Betroffenen detektiert werden. Für die Familie JS-57 und JS-58 ergab sich kein Hinweis auf eine Blutsverwandtschaft. Bei Familie JS-21 wurde vom Einsender eine bestehende Konsanguinität angegeben. Es konnte eine homozygote Mutation im *JBTS3*-

4. Ergebnisse

Gen nachgewiesen werden. In der Familie konnte kein ROH > 10 Mb detektiert werden, es wurden lediglich zwei ROH von 5-10 Mb nachgewiesen.

Tabelle 4.8: Mittels SNP-Array ermittelte Homozygotie für ausgewählte mehrheitlich blutsverwandte JS-Patienten. Loci mit Mutationsnachweis wurden durch Unterstreichen gekennzeichnet. ROH-Größen-Kategorie mit mutationstragendem ROH wurde in fett markiert. (C/C= Cousin/Cousine, Ge.= Geschlecht, Ko.= Konsanguinitätsgrad, Mb= Megabasen, ROH= Homozygotieblock, 1G= 1. Grades etc., *= zur Validierung genutzte Proben, **= Prüfung auf Homozygotie für die Gene *JBTS1-JBTS17*, ausgenommen *JBTS10* aufgrund des X-chromosomalen Erbgangs.)

Familie	Status	Herkunft	Ge.	Ko.	Homozygotie**	Befund
JS-6	Index	Türkisch	XY	C/C 1G	<u>JBTS1: 7,4 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 1 ROH >5 Mb: 4	- (JBTS1 nicht untersucht)
JS-9	Index	Türkisch/ arabisch	XY	C/C 1G	- ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 2 ROH >10 Mb: 3 ROH >5 Mb: 1	-
JS-10	Index 1	KI	XY	+	<u>JBTS6: 49,9 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 5 ROH >10 Mb: 3 ROH >5 Mb: 6	-
	Index 2		XY		<u>JBTS4: 2,0 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 4 ROH >10 Mb: 6 ROH >5 Mb: 9	
JS-21*	Index	Serbisch	XX	+	<u>JBTS3: 2,5 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 0 ROH >5 Mb: 2	<u>JBTS3:</u> p.Thr671Ile(m)ho
JS-39	Index	Türkisch	XY	+	<u>JBTS11: 2,0 Mb</u> ROH >50 Mb: 1 ROH >20 Mb: 2 ROH >10 Mb: 2 ROH >5 Mb: 8	- (JBTS11 nicht untersucht)
JS-42	Index 1	Kuwaitisch	XX	+	<u>JBTS9: 3,6 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 2 ROH >5 Mb: 6	<u>JBTS9:</u> p.Pro1122Ser(m)ho
	Index 2		XX		<u>JBTS9: 13,1 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 2 ROH >5 Mb: 13	

4. Ergebnisse

Familie	Status	Herkunft	Ge.	Ko.	Homozygotie**	Befund
JS-44	Index 1	Türkisch	XY	+	<u>JBTS17: 22,0 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 5 ROH >5 Mb: 5	-
	Index 2		XX		<u>JBTS4: 2,0 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 3 ROH >5 Mb: 5	
JS-48	Index 1	Irakisch	XX	C/C 1G	<u>JBTS3: 35,2 Mb</u> <u>JBTS10: 11,4 Mb</u> <u>JBTS1: 4,5 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 4 ROH >10 Mb: 6 ROH >5 Mb: 2	JBTS3: p.Gly644Glu(m)ho
	Index 2		XY		<u>JBTS1: 24,7 Mb</u> <u>JBTS3: 11,0 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 3 ROH >10 Mb: 6 ROH >5 Mb: 4	
JS-57	Index	Deutsch	XX	nicht bekannt	- ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 0 ROH >5 Mb: 2	<u>MKS1:</u> p.Arg124Gln(m)he, c.1408-34_1408- 6del(s)he (<u>JBTS3:</u> p.Arg835Arg he (rs41288017 <1%), p.Tyr933Cys(m)he rs41288013 <1%))
JS-58	Index	Deutsch	XY	nicht bekannt	- ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 0 ROH >5 Mb: 1	-

In sieben der neun konsanguinen BBS-Familien wurden Mutationen in Genen mit nachgewiesener Homozygotie ermittelt (Tabelle 4.9). Besonderes Augenmerk ist auf die Familie BBS-58 zu richten, hier ergab sich eine pseudodominante Vererbung, da Mutter und Tochter von einem BBS betroffen sind. Aus den erhobenen Array-Daten ist zu ersehen, dass vermutlich eine doppelte Blutsverwandtschaft besteht. Die betroffene Mutter gab an mit einem Cousin 1. Grades verheiratet zu sein. Die ermittelten Array-Daten machen wahrscheinlich, dass die jeweiligen Eltern ebenfalls blutsverwandt sind, hierüber lag keine Information vor. Sowohl die betroffene Mutter als auch das betroffene Kind des Paares zeigen Homozygotie für das *BBS7*-Gen, in welchem eine Mutation nachgewiesen werden konnte.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.9: ROH für ausgewählte BBS-Patienten. Loci mit Mutationsnachweis wurden durch Unterstreichen gekennzeichnet. ROH-Größen-Kategorie mit mutationstragendem ROH wurde in fett markiert. (C/C= Cousin/Cousine, Ge.= Geschlecht, Ko.= Konsanguinitätsgrad, Mb= Megabasen, ROH= Homozygotieblock, 1G= 1. Grades etc., *= zur Validierung genutzte Proben, **= Prüfung auf Homozygotie für die Gene *BBS1-BBS16*)

Familie	Status	Herkunft	Ge.	Ko.	Homozygotie**	Befund
BBS-12	Index	Arabisch	XY	C/C 1G	<u>BBS4: 12,3 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 3 ROH >10 Mb: 9 ROH >5 Mb: 6	<u>BBS4:</u> c.332+2_332+3 insTT(s)ho
BBS-47*	Index	Türkisch	XX	+	<u>BBS7, BBS12: 24,5 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 2 ROH >5 Mb: 4	<u>BBS12:</u> p.Glu495Arg fsX3(del)ho
BBS-52*	Index	Asiatisch	XX	+	<u>BBS10: 19,0 Mb</u> <u>BBS11: 9,5 Mb</u> <u>BBS14: 9,4 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 3 ROH >10 Mb: 10 ROH >5 Mb: 12	<u>BBS10:</u> p.Tyr559X(n)ho
BBS-53	Index	KI	XX	C/C 1G	<u>BBS2: 16,2 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 2 ROH >5 Mb: 4	<u>BBS2:</u> p.Val510Phe(s)ho
BBS-54	Index	Liba- nesische	XY	C/C 1G	<u>BBS5: 30,1 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 3 ROH >10 Mb: 4 ROH >5 Mb: 5	-
BBS-55	Index	Irakisch	XY	C/C 2G	<u>BBS11: 30,1 Mb</u> <u>BBS5: 24,1 Mb</u> <u>BBS4: 14,0 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 6 ROH >10 Mb: 5 ROH >5 Mb: 5	<u>BBS4:</u> p.Glu136Val fsX27(del)ho
BBS-57	Index	Türkisch	XX	C/C 2G	<u>BBS7, BBS12: 44,4 Mb</u> <u>BBS5: 32,9 Mb</u> <u>BBS11: 4,7 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 5 ROH >10 Mb: 9 ROH >5 Mb: 7	-

4. Ergebnisse

Familie	Status	Herkunft	Ge.	Ko.	Homozygotie**	Befund
BBS-58	Vater	KI	XY	unklar, C/C 1G	- ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 1 ROH >10 Mb: 2 ROH >5 Mb: 3	BBS7: p.Cys243Tyr(m)ho
	be- troffene Mutter		XX		<u>BBS15: 12,4 Mb</u> <u>BBS7, BBS12: 9,1 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 0 ROH >10 Mb: 2 ROH >5 Mb: 3	
	ge- sunder Bruder		XY		<u>BBS13: 27,3 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 3 ROH >10 Mb: 7 ROH >5 Mb: 9	
	Index		XX		<u>BBS4: 53,5 Mb</u> <u>BBS7, BBS12: 29 Mb</u> ROH >50 Mb: 1 ROH >20 Mb: 4 ROH >10 Mb: 9 ROH >5 Mb: 6	
BBS-62	Index	Türkisch	XX	C/C 1G	<u>BBS4: 22,2 Mb</u> <u>BBS1: 20,2 Mb</u> ROH >50 Mb: 0 ROH >20 Mb: 5 ROH >10 Mb: 6 ROH >5 Mb: 5	<u>BBS1:</u> c.48-1G>A(s)ho

Zusammenfassend konnten in 14 der 23 blutsverwandten Familien (60,9 %) bzw. bei 18 Patienten ursächliche homozygote Mutationen basierend auf der Voruntersuchung mittels SNP-Array ermittelt werden (4 von 6 blutsverwandten MKS-Familien, 3 von 8 blutsverwandten JS-/JSRD-Familien, 7 von 9 blutsverwandten BBS-Familien). Tabelle 4.10 zeigt die Beziehung zwischen ROH-Blockgröße und Mutationsfrequenzen bei den Familien des eigenen Kollektivs mit Mutation. Familie MKS-11 wurde aufgrund der unklaren Konsanguinität und eingeschränkten Datenqualität von der Auswertung ausgenommen. Bei 13 der 18 aufgeführten Patienten (72,2 %) wurden die ursächlichen Mutationen in den Syndrom-Loci detektiert, die den größten genomischen Umfang in Mb zeigten. Bei 15 von 18 Patienten (83,3 %) wurden die ursächlichen Mutationen in den Genen detektiert, die die höchste Mutationsfrequenz für den entsprechenden Locus zeigten. Bei zwei Familien wurden Mutationen in seltener von Mutationen betroffenen Genen ermittelt (Familie MKS-88 und BBS-58). Bei zwei Patienten wiederum trugen weder das

4. Ergebnisse

am häufigsten betroffene Gen, noch der größte ROH-Block die ursächliche Mutation.

Tabelle 4.10: Verhältnis von ROH-Blockgröße und Mutationsfrequenzen bei den mutationstragenden Patienten des eigenen Kollektivs. Der jeweils größte ROH-Block bzw. die höchste Mutationsfrequenz wurde durch Unterstreichen markiert, die ursächlichen Gene und zugehörigen Mutationsfrequenzen bei den Patienten wurden fett markiert. (*= Mutationsfrequenzen: MKS: Durchschnittliche ermittelte Daten der europäische Kollektive, JS/JSRD, BBS: Durchschnittliche ermittelte Daten multiethnischer Kollektive; unbekannte Mutationsfrequenzen wurde durch „?“ gekennzeichnet)

Familie	Homozygote Syndrom-Loci	ROH-Größe	Mutationsfrequenz*
MKS-34	MKS3	<u>18,1 Mb</u>	<u>23,0%</u>
MKS-78-1 MKS-78-2	MKS4 MKS7	<u>54,9 Mb</u> 12,3 Mb	<u>14,0%</u> ?
	MKS4 MKS5	<u>53,3 Mb</u> 18,9 Mb	<u>14,0%</u> ?
MKS-83	MKS4	<u>22 Mb</u>	<u>14,0%</u>
MKS-88	MKS3 MKS1	<u>61,4 Mb</u> 2,0 Mb	<u>23,0%</u> <u>36,0%</u>
JS-21	JBTS3	<u>2,5 Mb</u>	<u>12,0%</u>
JS-42-1 JS-42-2	JBTS9	<u>3,6 Mb</u>	<u>> 9%</u>
	JBTS9	<u>13,1 Mb</u>	<u>> 9%</u>
JS-48-1 JS-48-2	JBTS3 JBTS10	<u>35,2 Mb</u> 11,4 Mb	<u>12,0%</u> ?
	JBTS1	4,5 Mb	?
	JBTS1	<u>24,7 Mb</u>	?
	JBTS3	<u>11,0 Mb</u>	<u>12,0%</u>
BBS-12	BBS4	<u>12,3 Mb</u>	<u>2,4%</u>
BBS-47	BBS12/ BBS7	<u>24,5 Mb</u>	<u>7,4%</u> 1,8%
BBS-52	BBS10 BBS11	<u>24,5 Mb</u> 9,5 Mb	<u>23,1%</u> 0,1%
	BBS14	9,4 Mb	0,3%
BBS-53	BBS2	<u>16,2 Mb</u>	<u>7,8%</u>
BBS-55	BBS11	<u>30,1 Mb</u>	0,1%
	BBS5	24,1 Mb	1,3%
	BBS4	<u>14,0 Mb</u>	<u>2,4%</u>
BBS-58-1 BBS-58-2	BBS15	<u>12,4 Mb</u>	0,2%
	BBS12/ BBS7	<u>9,1 Mb</u>	<u>7,4%</u> / <u>1,8%</u>
	BBS4	<u>53,5 Mb</u>	2,4%
	BBS12/ BBS7	<u>9,1 Mb</u>	<u>7,4%</u> / <u>1,8%</u>
BBS-62	BBS4	<u>22,2 Mb</u>	2,4%
	BBS1	<u>20,2 Mb</u>	<u>25,7%</u>

4. Ergebnisse

4.2.2. Kopienzahlanalysen

Im eigenen Kollektiv sollte mittels SNP-Array geprüft werden, in welchem Umfang pathogene oder unklare Kopienzahlvariante detektiert werden können. Tabelle 4.11 zeigt die Kopienzahlauswertung der mittels Array analysierten Familien ohne nachgewiesene pathogene Mutationen. Als eindeutig apathogen identifizierte CNVs werden nicht erwähnt.

Tabelle 4.11: Mittels SNP-Array ermittelte unklare Kopienzahlvarianten (CNVs) der bis dato molekulargenetisch nicht aufgeklärten Array-Familien. (C/C= Cousin/Cousine, Ge.= Geschlecht, Ko.= Konsanguinitätsgrad, Kb= Kilobasen, 1G= 1. Grades etc.)

Familie	Status	Herkunft	Ge.	Ko.	Unklare CNVs >200Kb	Anmerkung
MKS-56	Index 1	Türkisch	XX	unklar	202 Kb Duplikation (3x) Xq13.3	Keine gemeinsamen unklaren CNVs
	Index 2		XY		-	
	Index 3		XY		-	
MKS-70	Index	Türkisch	XX	C/C 1G	-	-
MKS-81	Index	Türkisch	XY	+	424 Kb Deletion (1x) 3q25.1, 352 Kb Duplikation (3x)1q44	Eltern bisher nicht untersucht
MKS-85	Index	KI	XY	nicht bekannt	-	-
JS-6	Index	Türkisch	XY	C/C 1G	507 Kb Deletion (1x) 1q21.2	Partielle Überlappung mit bekannten neutralen CNVs, Eltern bisher nicht untersucht
JS-9	Index	Türkisch/arabisch	XY	C/C 1G	-	-
JS-10	Index 1	KI	XY	+	-	-
	Index 2		XY		-	-
JS-39	Index	Türkisch	XY	+	301 Kb Duplikation (3x) 2q31.1	Q-PCR: maternal
JS-44	Index 1	Türkisch	XY	+	-	-
	Index 2		XX		-	-
JS-58	Index	Deutsch	XY	nicht bekannt	-	-
BBS-54	Index	Libanesische	XY	C/C 1G	-	-
BBS-57	Index	Türkisch	XX	C/C 2G	-	-

4. Ergebnisse

Bei vier der zwölf mittels SNP-Array untersuchten Familien ohne Mutationsnachweis in den Syndrom-Loci wurden CNVs nachgewiesen, die bisher nicht als neutrale CNVs in den entsprechenden Datenbanken (DGV) oder im eigenen Kollektiv nachgewiesen wurden. Bei Familie MKS-56 ist ein pathogener Effekt der detektierten Variante unwahrscheinlich, da diese lediglich bei einem der drei Indexpatienten nachgewiesen wurde. Die in Familie JS-39 nachgewiesene Duplikation wurde mittels Q-PCR ebenfalls bei der gesunden Mutter nachgewiesen, sodass ein Zusammenhang mit dem Phänotyp ebenfalls unwahrscheinlich ist. Bei zehn Familien konnte somit ein pathogener Effekt von CNVs anhand des Nachweises in Kontrollkollektiven, durch weitere eigene Analysen bzw. durch das Einbeziehen von Segregationsanalysen ausgeschlossen werden. In zwei Familien (MKS-81, JS-6) konnte bisher ein Zusammenhang zum Phänotyp nicht sicher ausgeschlossen werden. Die unklaren Kopienzahlvarianten des betroffenen Feten von Familie MKS-81 sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Sie liegen in Regionen bekannter Mikrodeletions-/duplikations-Syndrome und überlappen nur teilweise mit bekannten Kopienzahlvarianten.

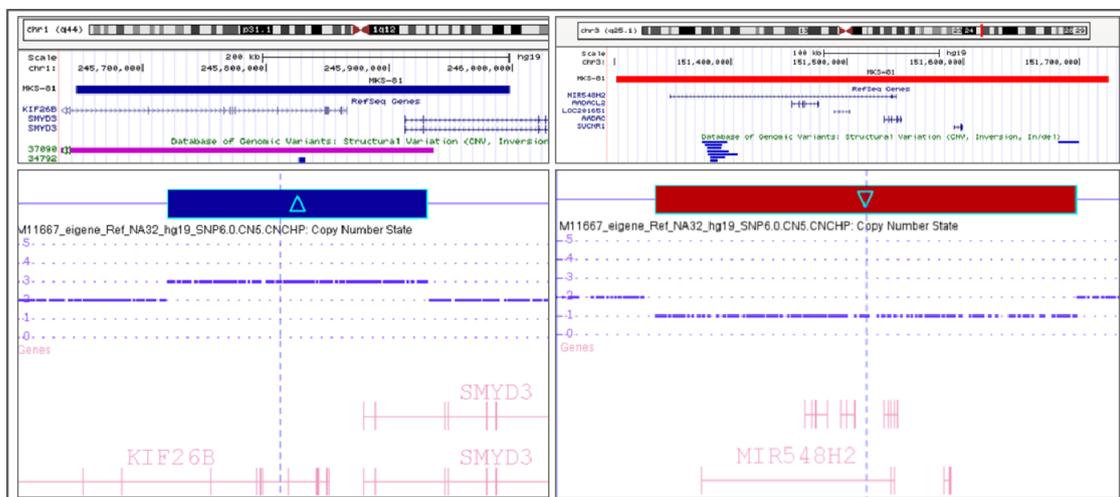


Abbildung 4.8: Darstellung der Kopienzahlvarianten von unklarer pathogenetischer Relevanz der Familie MKS-81. Oben: Darstellung im UCSC human genome browser, in lila (Inversion) bzw. blau (Duplikation) sind die bisher in der Datenbank hinterlegten Kopienzahlvarianten der Normalbevölkerung mit partieller Überlappung dargestellt. Unten: Darstellung der deletierten/duplizierten Bereiche (links: 352 Kb Duplikation (3x)1q44, rechts: 424 Kb Deletion (1x) 3q25.1.) sowie enthaltene Gene mittels Chromosome Analysis Suite.

Alle mittels SNP-Array untersuchten Familien wurden über die Homozygotie- und CNV-Auswertung hinaus auch auf Deletionen/Duplikationen < 200 Kb in

4. Ergebnisse

den jeweiligen Syndrom-Loci (*MKS1-MKS10*, *JBTS1-JBTS17*, *BBS1-BBS16*) geprüft. Bei keiner Familie ergab sich eine kleinere genomische Deletion/Duplikation in den genannten Loci. Bei einer Familie (MKS-85) war der explizite Anlass der Nachweis einer heterozygoten *Nonsense*-Mutation im *MKS6*-Gen ohne Detektion einer zweiten Mutation. Abbildung 4.9 zeigt die Kopienzahldarstellung und Markerabdeckung des *MKS6*-Gens bei Familie MKS-85.

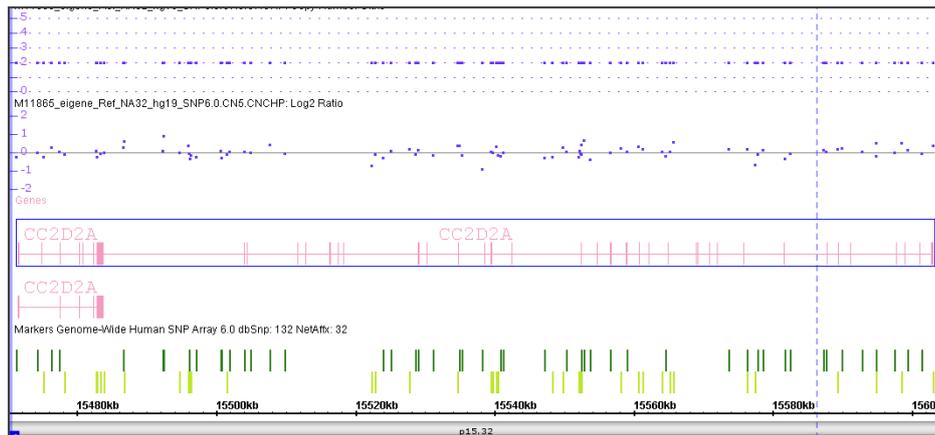


Abbildung 4.9: Darstellung der Kopienzahlanalyse des *MKS6*- (*CC2D2A*-) Gens bei Familie MKS-85 mit nachgewiesener heterozygoter *Nonsense*-Mutation mittels **Chromosome Analysis Suite**. In der obersten Zeile zeigt sich für alle Marker des Gens ein Kopienzahlstatus von zwei für den Betroffenen. Auf dem SNP 6.0 Array vorhandene Kopienzahlmarker sind als dunkelgrüne Balken gekennzeichnet

Bei einer blutsverwandten Familie (BBS-55) ergab sich bei bestehender Homozygotie für den *BBS4*-Locus der Verdacht auf eine partielle homozygote Deletion des Gens, da für die Exons 7 und 8 keine PCR-Produkte generiert werden konnten. Eine Deletion konnte im Array jedoch nicht dargestellt werden. Dabei ist anzumerken, dass für Familie BBS-55 mittels einer *Junction*-Fragment-PCR eine homozygote Deletion der Exons 7 und 8 und umspannender intronischer Bereiche schließlich nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.5).

4. Ergebnisse

4.3. Untersuchung mittels NGS-Panel für spezifische MKS-/JS-Gene

Die Methodik des *Next-Generation-Sequencings* mittels *Benchtop*-Geräten stellt eine effiziente Methodik zur parallelen Analytik von Genen dar. Diese sollte anhand eines *Gen-Panels* für die ermittelten häufig von Mutationen betroffenen MKS- und JS-/JSRD-Gene *MKS1*, *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5*, *MKS6/JBTS9*, *JBTS3* etabliert und validiert werden.

4.3.1. Etablierung und Validierung

Nach Etablierung der NGS-Methodik sollte zunächst eine reproduzierbare Laufqualität erreicht werden. Hierfür wurden die Qualitätsparameter der jeweiligen Läufe stets überprüft. Läufe wurden für eine weitere Auswertung berücksichtigt, wenn die im Kapitel 3.4.13 genannten, angestrebten Gesamtlaufqualitätsparameter erreicht wurden. Abbildung 4.10 zeigt exemplarisch, die Laufparameter eines NGS-Patienten-Laufs.

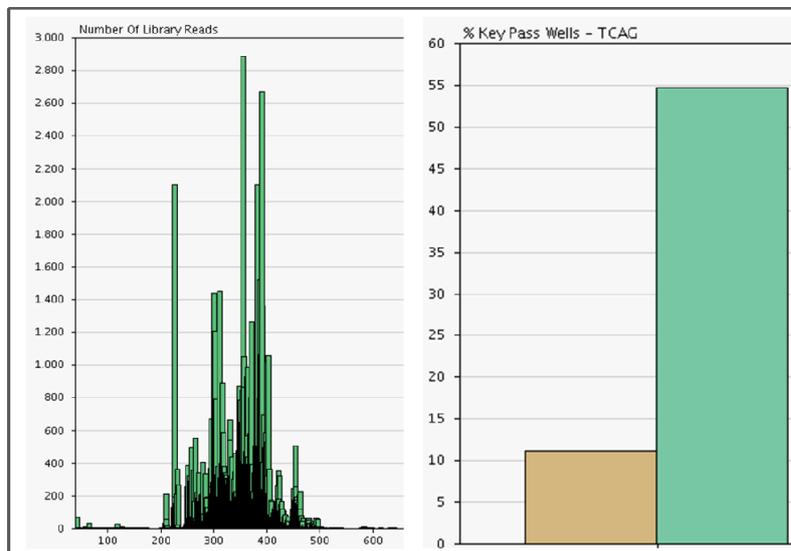


Abbildung 4.10: Darstellung der Parameter eines NGS-Patienten-Laufs mit GS Run Browser Software. Links: Leselängenabhängige *Coverage* der 173 Amplikons. Alle Amplikons zeigen die erwartete Länge zwischen 200-500 bp (X-Achse entspricht der Fragmentlänge in bp, die Y-Achse gibt die Lesehäufigkeit wieder). Rechts: Exemplarische Darstellung des Anteils der für die weitere Auswertung nutzbaren Sequenzen in türkis (Y-Achse in Prozent in Relation zu *Key-Pass-Filter-Wells*). Angestrebt wurde ein Anteil von über 20-50 % (hier 55 %). Der Anteil an Mischsequenzen sollte nach Möglichkeit unter 20 % liegen (hier 12 %, Darstellung in braun).

Für die Validierung der Methodik wurden zunächst DNA-Proben von Patienten bzw. elterliche Proben mit bekannten pathogenen Varianten untersucht. Es

4. Ergebnisse

konnten alle Mutationen der zur Validierung verwendeten Proben nachgewiesen werden (Abbildung 4.11). Alle Mutationen konnten bidirektional dargestellt werden. Heterozygote Mutationen wurden mit einer *Coverage* von 44-54 % dargestellt, eine homozygote *JBTS3*-Mutation erwartungsgemäß mit 100 %.

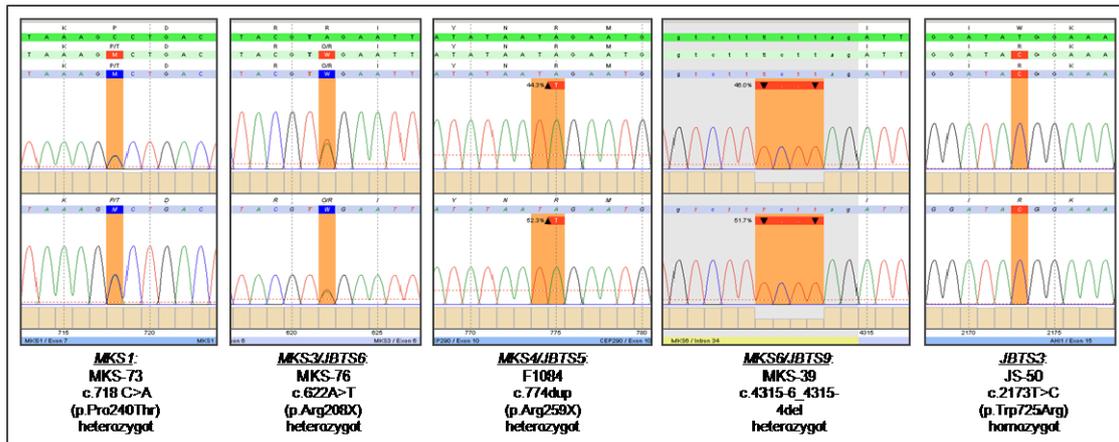


Abbildung 4.11: Validierung des NGS-Verfahrens anhand von Positivkontrollproben mit Mutationen in den Genen *MKS1*, *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5*, *MKS6/JBTS9* und *JBTS3*. Darstellung mittels Seqpilot-Software (Seqnext-Modul).

Homopolymer-Sequenzen können methodisch bedingt mittels auf Pyrosequenzierung basierenden Techniken nicht korrekt aufgetrennt werden. Angaben darüber, ab welcher Anzahl an Basenwiederholungen diese Ungenauigkeit zu beobachten ist, existieren bisher nicht. Um eine effiziente Analytik zu gewährleisten und um Fragmente zu identifizieren, die von der Analytik auszunehmen sind, sollte daher geprüft werden, in welchem Umfang Homopolymer-Sequenzen im eigenen Kollektiv zu Wiederholungen mittels Sanger-Sequenzierung führen. Nach dem gewählten *Cut-off* mussten bei 10,6 % der 161 Exons (171 Amplikons) aufgrund von Homopolymeren bei 25-50 % der Patienten die jeweiligen Bereiche mittels Sanger-Sequenzierung nachanalysiert werden. Bei 11,2 % mussten bei mehr als 50 % der Patienten Wiederholungen durchgeführt werden. Abbildung 4.12 zeigt exemplarisch ein Amplikon, welches ein nicht eindeutig aufgetrenntes Homopolymer (sieben Adenine in Folge) enthält. Insgesamt enthielten 35 der 161 untersuchten Exons (bzw. unmittelbar angrenzende Introns) Basenwiederholungen von mehreren gleichen Basen in Folge. Bei 84,4 % (27 Exons) lagen Homopolymere von

4. Ergebnisse

sechs oder mehr Basenwiederholungen vor. Bei den weiteren 15,6 % (8 Exons) lagen Wiederholungen von 5 Basen vor.

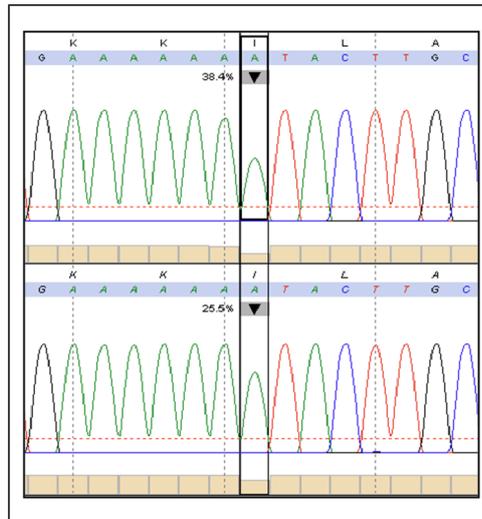


Abbildung 4.12: Exemplarische Darstellung eines Homopolymers (sieben Adenine in Folge) ohne sichere Bestimmung der Basenabfolge mittels Seqpilot-Software (Seqnext-Modul). In 38,4 % der *Forward*-Sequenzen bzw. 25,5% der *Reverse*-Sequenzen wird eine Deletion einer Base angenommen. Eine Nachanalyse mittels Sanger-Sequenzierung ergab die Wildtyp-Sequenz für den analysierten Bereich.

4.3.2. NGS-Daten des eigenen MKS- und JS-Kollektivs

Nach erfolgreicher Durchführung der Validierungsläufe wurde eine Subpopulation von aktuellen – molekulargenetisch bisher nicht abgeklärten – Patienten mittels des *Panel*s untersucht. Es wurden bis dato 21 DNA-Proben: 9 JS-/JSRD- und 11 MKS-Proben (10 MKS-Familien: Tabelle 4.12) sowie eine weitere Ziliopathiefamilie (F1084) mittels der neu etablierten Technik analysiert. Vier Proben dienten dabei der Validierung (Abbildung 4.11). Somit wurden Daten zu 16 Proben (bzw. 15 Familien; 7 MKS-Familien, 8 JS-/JSRD-Familien) mit der Technik erhoben. Für alle Patienten wurden die Gene *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5*, *MKS6/JBTS9* parallel analysiert. Die MKS-Patienten wurden darüber hinaus auf Mutationen des *MKS1*-Gens sowie die JS-/JSRD-Patienten auf Mutationen des *JBTS3*-Gens untersucht. Ein Teil der MKS- und JS-/JSRD-Patienten wurde darüber hinaus parallel für alle genannten Gene untersucht (Kapitel 4.3.2.2).

4. Ergebnisse

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Mutationsanalytik der mittels des entwickelten NGS-Panels untersuchte MKS- und JS-/JSRD-Familien. (d= Deletion, dup= Duplikation, he= heterozygot, mat/pat= maternal/paternal, n= Nonsense-Mutation, n. u.= nicht untersucht, m= Missense-Mutation, s= Spleißmutation, *= zur Validierung verwendete Probe)

Familie	Mutationen	Coverage
MKS-25 (Mutter mittels NGS untersucht)	<u>MKS4/JBTS5:</u> p.Ile556AsnfsX20 _(dup) ^{he(mat/pat)}	F: 38% (118) R: 38% (75)
MKS-39*	<u>MKS6/JBTS9:</u> p.Arg1218X _(n) ^{he} , c.4315-6_4315-4del _(s) ^{he}	n. u., F: 46% (104) R: 52% (122)
MKS-73*	<u>MKS1:</u> p.Pro240Thr _(m) ^{he} , c.1408-34_1408-6del _(s) ^{he}	F: 49% (129) R: 49% (267), n. u.
MKS-76*	<u>MKS3/JBTS6:</u> p.Glu361X _(n) ^{he} , p.Arg208X _(n) ^{he}	n. u., F: 54% (135) R: 53% (69)
MKS-81	-	-
MKS-82	-	-
MKS-84 (Mutter mittels NGS untersucht)	<u>MKS6/JBTS9:</u> p.Pro1563Arg _(m) ^{he(mat/pat)}	F: 45% (122) _(m) R: 49% (98) _(m)
MKS-85	-	-
MKS-86	-	-
MKS-87 (beide Eltern mittels NGS untersucht)	-	-
JS-10	-	-
JS-39	-	-
JS-49	<u>JBTS9/MKS6:</u> p.Val1097PhefsX2 _(d) ^{he} , p.Arg1330Gln _(m) ^{he}	F: 47% (359) R: 46% (180), F: 48% (89) R: 48% (73)
JS-50*	<u>JBTS3:</u> p.Trp725Arg _(m) ^{ho}	F: 100% (1471) R: 100% (1405)
JS-51	<u>JBTS5/MKS4:</u> p.Glu97X _(n) ^{he} , p.Ile2000ValfsX22 _(d) ^{he}	F: 39% (17) R: 46% (71), F: 48% (39) R: 48% (58)
JS-55	-	-
JS-57	<u>MKS1:</u> p.Arg124Gln _(m) ^{he} , c.1408-34_1408-6del _(s) ^{he}	F: 49% (187) R: 54% (177), F: 54% (418) R: 62% (372)
JS-58	-	-
JS-60	-	-

4. Ergebnisse

Bei zwei (28,6 %) der bisher nicht abgeklärten sieben untersuchten MKS-Familien (MKS-25 und MKS-84) und bei drei (37,5 %) der acht bisher nicht abgeklärten JS-/JSRD-Familien (JS-49, JS-51, JS-57) ließ sich somit aller Wahrscheinlichkeit nach die Ursache der Erkrankung aufklären (Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14). Auf Familie JS-57 wird im folgenden Kapitel noch ein Mal detailliert eingegangen, daher ist die Familie hier nicht abgebildet.

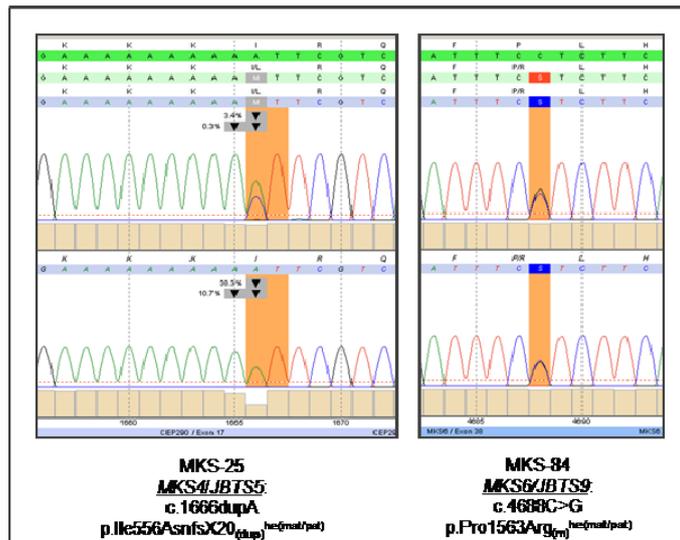


Abbildung 4.13: Darstellung der mittels NGS-Panel detektierten Mutationen der untersuchten MKS-Familien. Für beide Familien stand kein Material der Indexpatienten zur Verfügung, sodass der Mutationsnachweis anhand von elterlichen Proben durchgeführt wurde. (dup= Duplikation, he= heterozygot, mat/pat= maternal/paternal, n= Nonsense-Mutation)

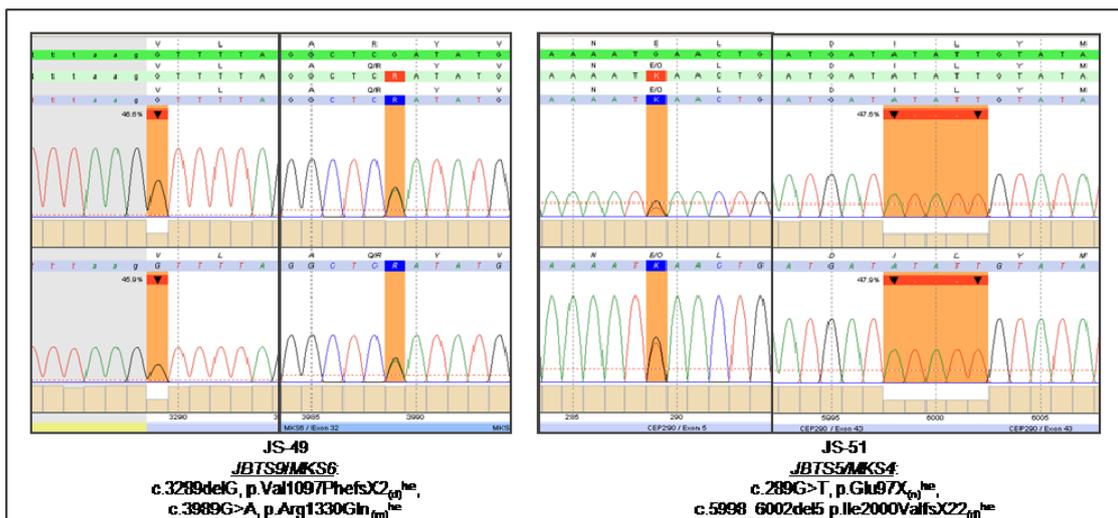


Abbildung 4.14: Darstellung der mittels NGS-Panel detektierten Mutationen der untersuchten JS-Familien. (d= Deletion, he= heterozygot, n= Nonsense-Mutation)

4. Ergebnisse

4.3.2.1. Unklare Varianten im MKS- und JS-NGS-Kollektiv

Für die hier untersuchten Ziliopathien wird zunehmend eine oligogene/triallelische Vererbung diskutiert, daher werden an dieser Stelle die weiteren – neben den o. g. primär mutmaßlich ursächlichen Mutationen – nachgewiesenen Polymorphismen und Varianten von unklarer Relevanz oder klarer pathogenetischer Relevanz (Tabelle 4.13) der mittels des NGS-*Panels* untersuchten Patienten dargestellt.

Tabelle 4.13: Zusätzlich zu pathogenen Mutationen detektierte unklare Varianten der 16 mittels NGS-*Panels* untersuchten MKS- und JS-/JSRD-Familienmitglieder. Berücksichtigt sind Veränderungen des kodierenden Bereichs sowie +/-10 Basen der jeweiligen Introns. Für Varianten mit einer Allelfrequenz von unter 1 % sowie mit Nachweis in homozygoter Form in gesunden Kontrollkollektiven wurde explizit ausgewiesen, bei welchen Familien diese nachgewiesen wurden. (Kontr.= Kontrollen, Lit.= Literatur, Pat.= pathogenetische Relevanz)

Gen	Variante	Anteil	Bemerkung
MKS1	rs3826300 c.858+9A>G MAF: G=44,7%/977	9x homozygot: 3x heterozygot: 6x	Pat.: <u>nicht</u> an Exon-Übergang Lit.: <u>nicht</u> als pathogen berichtet Kontr.: homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS3/ JBTS6	c.511G>A p.Val171Ile	1x homozygot: - heterozygot: 1x (MKS-85)	Pat.: PP2: <u>benigne</u> , <u>nicht</u> an Exon-Übergang Lit.: <u>nicht</u> als pathogen berichtet Kontr.: -
MKS3/ JBTS6	c.579delA p.Gly195ApsfsX27	1x homozygot: - heterozygot: 1x (MKS-84 ^{mat})	Pat.: pathogene Mutation, in mütterlicher DNA nachgewiesen, Vater Wildtyp für MKS3 Lit.: in Literatur berichtet (Otto et al, 2009) Kontr.: -
MKS3/ JBTS6	rs35793208 c.781G>A p.Asp261Asn MAF: A= 1,3%/29	1x homozygot: - heterozygot: 1x	Pat.: PP2: <u>benigne</u> <u>nicht</u> an Exon-Übergang Lit.: neutral im Tierversuch (Leitch et al, 2008) Kontr.: homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS3/ JBTS6	rs3134031 c.1810A>G p.Ile604Val MAF: A=31,0%/678	12x homozygot: 8x heterozygot: 4x	Pat.: PP2: <u>benigne</u> <u>nicht</u> an Exon-Übergang Lit.: <u>nicht</u> als pathogen berichtet Kontr.: homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS3/ JBTS6	rs115563233 c.2241G>A p.Gln747Gln MAF: A=0,1%/1	1x homozygot: - heterozygot: 1x (MKS-87 ^{pat})	Pat.: letzte Base des Exons Lit.: in Literatur als fragliche aggravierende Spleißmutation beschrieben (Leitch et al, 2008) Kontr.: <u>nicht</u> homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS3/ JBTS6	rs117195541 c.2397T>C p.Asp799Asp MAF: C=0,6%/14	1x homozygot: - heterozygot: 1x (JS-55)	Pat.: <u>nicht</u> an Exon-Übergang Lit.: <u>nicht</u> als pathogen berichtet Kontr.: <u>nicht</u> homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS4/ JBTS5	rs45465996 c.2055T>C p.Ala685Ala MAF: C=8,6%/188	6x homozygot: - heterozygot: 6x	Pat.: <u>nicht</u> an Exon-Übergang Lit.: <u>nicht</u> als pathogen berichtet Kontr.: homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS4/ JBTS5	rs2468255 c.2268G>A p.Ser756Ser MAF: T=20,4%/445	4x homozygot: - heterozygot: 4x	Pat.: <u>nicht</u> an Exon-Übergang Lit.: <u>nicht</u> als pathogen berichtet Kontr.: homozygot bei Kontrollen berichtet

4. Ergebnisse

Gen	Variante	Anteil	Bemerkung
MKS4/ JBTS5	rs10717563 c.3574-9del	4x homozygot: 4x heterozygot: -	<i>Pat.:</i> nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> nicht als pathogen berichtet <i>Kontr.:</i> homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS4/ JBTS5	rs183655276 c.4237G>C p.Asp1413His MAF: C=0,3%/6	1x homozygot: - heterozygot: 1x (MKS-87 ^{pat})	<i>Pat.:</i> PP2: benigne, nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> nicht als pathogen berichtet <i>Kontr.:</i> nicht homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS4/ JBTS5	rs61941020 c.5237G>A p.Arg1746Gln MAF: T=0,3%/7	2x homozygot: - heterozygot: 2x (MKS-85, JS-51)	<i>Pat.:</i> PP2: benigne, nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> in Literatur bei 3/264 Kontrollen (Tory et al, 2007) <i>Kontr.:</i> nicht homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS4/ JBTS5	rs117852025 c.6401T>C p.Ile2134Thr MAF: C=0,4%/8	1x homozygot: - heterozygot: 1x (MKS-25)	<i>Pat.:</i> PP2: pathogen, nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> nicht als pathogen berichtet <i>Kontr.:</i> nicht homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS4/ JBTS5	rs183387506 c.7075A>C p.Ile2359Leu MAF: C=0,1%/3	1x homozygot: - heterozygot: 1x (JS-55)	<i>Pat.:</i> PP2: benigne nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> nicht als pathogen berichtet <i>Kontr.:</i> nicht homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS6/ JBTS9	rs112367037 c.685_687delGAA p.Glu229del MAF: --=4,2%/92	2x homozygot: - heterozygot: 2x	<i>Pat.:</i> Teil eines Glutaminsäure-Repeats (AS 221-229) (EEEEGEEEE) <i>Lit.:</i> in Literatur als dritte Veränderung bei zwei nachweislich pathogenen Mutationen (Bachmann-Gagescu et al, 2012), auch als pathogen berichtet (Otto et al, 2011) <i>Kontr.:</i> nicht homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS6/ JBTS9	rs2286976 c.777C>T p.His259His MAF: T=10,9%/238	1x homozygot: - heterozygot: 1x	<i>Pat.:</i> nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> nicht als pathogen berichtet <i>Kontr.:</i> homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS6/ JBTS9	c.1229T>C het p.Ile410Thr	1x homozygot: - heterozygot: 1x (MKS-86)	<i>Pat.:</i> PP2: möglicherweise pathogen, nicht an Exon-Übergang, <i>Lit.:</i> nicht als pathogen berichtet <i>Kontr.:</i> -
MKS6/ JBTS9	rs13121363 c.3183-8T>C	14x homozygot: 11x heterozygot: 3x	<i>Pat.:</i> nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> nicht als pathogen berichtet <i>Kontr.:</i> homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS6/ JBTS9	rs73125627 c.3201G>A p.Ser1067Ser MAF: A=16,3%/356	5x homozygot: 2x heterozygot: 3x	<i>Pat.:</i> nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> nicht als pathogen berichtet <i>Kontr.:</i> homozygot bei Kontrollen berichtet
MKS6/ JBTS9	c.4333C>T p.Arg1445X	1x homozygot: - heterozygot: 1x (MKS-85)	<i>Pat.:</i> pathogene Mutation <i>Lit.:</i> nicht als pathogen berichtet <i>Kontr.:</i> -
JBTS3	rs13312995 c.2488C>T p.Arg830Trp MAF: T=1,4%/31	1x homozygot: - heterozygot: 1x	<i>Pat.:</i> PP2: pathogen, nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> in Literatur als Variante ohne Segregation (Valente et al, 2006a), als aggravierend in Verbindung mit JBTS4-Mutationen beschrieben (Tory et al, 2007) <i>Kontr.:</i> homozygot bei Kontrollen berichtet
JBTS3	rs41288017 c.2505G>A p.Arg835Arg MAF: A=0,2%/4	1x homozygot: - heterozygot: 1x (JS-57)	<i>Pat.:</i> nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> in Literatur als Variante ohne Segregation (Valente et al, 2006a) <i>Kontr.:</i> nicht homozygot bei Kontrollen berichtet
JBTS3	rs41288013 c.2798A>G p.Tyr933Cys MAF: G=0,2%/5	1x homozygot: - heterozygot: 1x (JS-57)	<i>Pat.:</i> PP2: pathogen, nicht an Exon-Übergang <i>Lit.:</i> in Literatur als Variante ohne Segregation (Valente et al, 2006a) <i>Kontr.:</i> nicht homozygot bei Kontrollen berichtet

4. Ergebnisse

Somit wurden bei fünf der sieben (71,4 %) untersuchten MKS-Familien (hiervon zwei Familien mit vermeintlich aufgeklärter Pathogenese (MKS-25, MKS-84)) zusätzliche Varianten von unklarer pathogenetischer Relevanz in den verschiedenen untersuchten *MKS-/JBTS*-Genen detektiert. Des Weiteren wurden bei drei der acht (37,5 %) untersuchten JS-/JSRD-Familien (hiervon zwei Familien mit pathogenen Mutationen (JS-51, JS-57)) unklare Varianten nachgewiesen.

4.3.2.2. Ergänzende Untersuchung des *MKS1*- und *JBTS3*-Gens

Mutationen des *JBTS3*-Gens wurden bei einer Vielzahl von Patienten mit JS und JSRD berichtet. Mutationen des *MKS1*-Gens wurden wiederum in einem großen Anteil bei Patienten mit MKS nachgewiesen. Trotz der klinischen und v. a. genetischen Überlappungen der Syndrome wurden *JBTS3*-Mutationen bisher jedoch nicht bei MKS-Patienten und umgekehrt *MKS1*-Mutationen bisher nicht bei JS/*JBTS*-Patienten beschrieben. Im Rahmen der Entwicklung des *MKS/JS-NGS-Panels* sollte daher für die Patienten ermittelt werden, ob hier Mutationen für das jeweilige andere Syndrom nachgewiesen werden können. Zu diesem Zweck wurden die in Tabelle 4.7 und 4.8 genannten bzw. in den Tabellen A1 und A2 des Anhangs entsprechend markierten Patienten für die Gene *MKS1* bzw. teilweise für das *JBTS3* mit untersucht. Dabei ließen sich bei fünf von acht JS/*JBTS*-Patienten allgemein bisher keine klar pathogenen Mutationen in den bis dato untersuchten Genen nachweisen. Bei einer Patientin (JS-57) mit klinisch zweifelsfrei diagnostiziertem JS ohne Nierenbeteiligung und weitere Auffälligkeiten (Alter zum Zeitpunkt der Einsendung: 34 Monate) wurden *compound*-heterozygote Mutationen des *MKS1*-Gens nachgewiesen. Es konnte die heterozygote *Missense*-Mutation c.371G>A (p.Arg124Gln) in Exon 4 des *MKS1*-Gens nachgewiesen werden. Die Mutation wurde bisher weder in der Literatur als pathogen noch als apathogen beschrieben. Sie ist bisher weder im eigenen Kollektiv noch in den einschlägigen Genomdatenbanken als apathogener Polymorphismus beobachtet worden. Sie betrifft eine evolutionär hochgradig konservierte Aminosäure. Bioinformatisch wird die Veränderung als pathogen eingestuft. Als zweite Mutation wurde die bei MKS-Patienten bereits häufig beobachtete Deletion c.1408-34_1408-6del (p.Gly470fs) des *MKS1*-

4. Ergebnisse

Gens in heterozygoter Form nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.15 dargestellt segregieren die Mutationen in der Familie (paternal: p.Arg124Gln, maternal: p.Gly470fs). Der gesunde Bruder trägt die väterliche Mutation nicht.

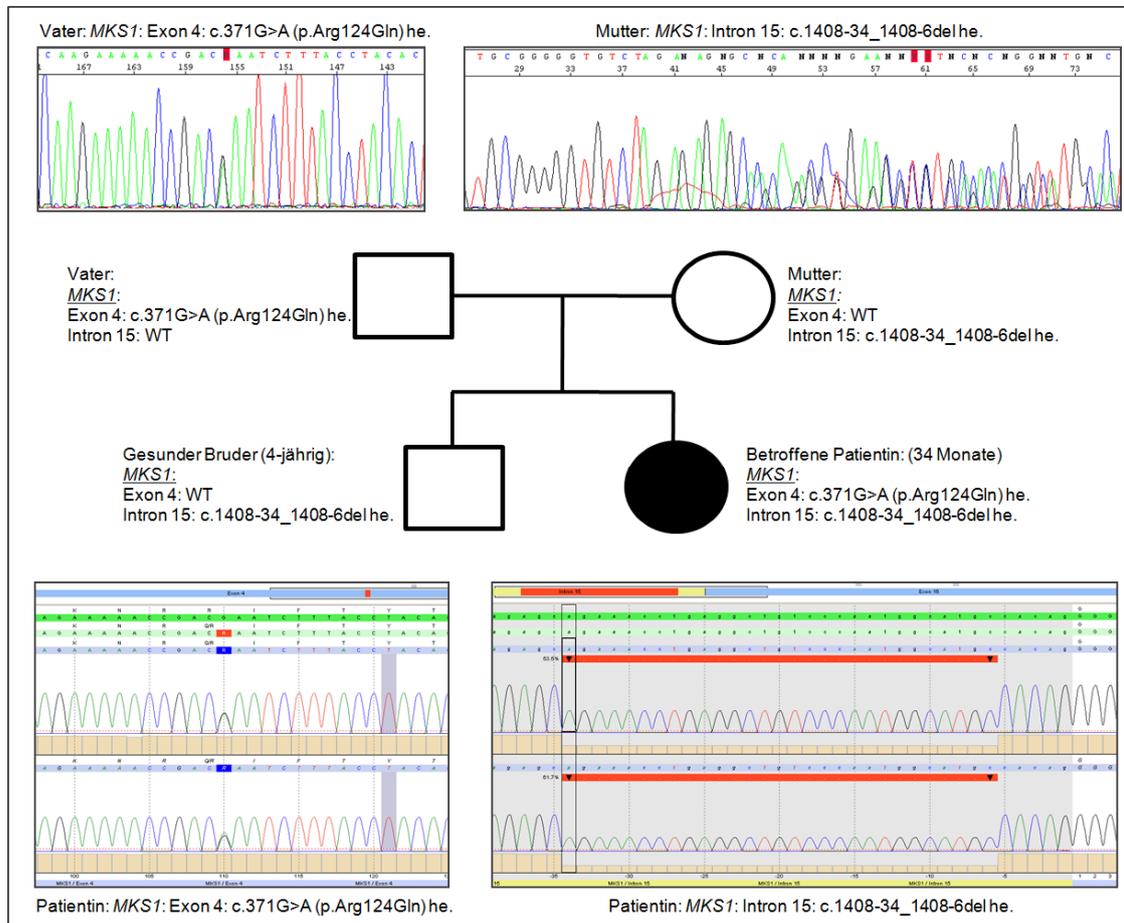


Abbildung 4.15: Stammbaum und Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse der Familie JS-57. Bei der Indexpatientin mit dem klinischen Bild eines JS wurden mittels des etablierten NGS-Panels *compound*-heterozygote Mutationen des *MKS1*-Gens nachgewiesen. Die Segregation sowie die Mutationen der Indexpatientin wurden mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt.

Lediglich zwei MKS-Familien wurden aufgrund der allgemein limitierten DNA-Mengen bisher auf Mutationen im *JBTS3*-Gen untersucht, wobei bei beiden Familien bereits unklare, möglicherweise pathogenetisch relevante Veränderungen in den weiteren im *Panel* enthaltenen Genen nachgewiesen wurden.

4. Ergebnisse

4.4. Weitere molekulargenetische Analysen des eigenen Kollektivs

Die Ergebnisse weiterer durchgeführter molekulargenetischer Analysen neben den oben ausgeführten Ergebnissen der Analytik des längsten offenen Leserahmens sollen an dieser Stelle zusammengefasst werden.

4.4.1. Untersuchungen auf homozygote Deletion des *JBTS4*-Gens

Deletionen des *JBTS4*- (*NPHP1*-) Gens werden bei einem Großteil der Patienten mit Nephronophthuse nachgewiesen (Hildebrandt et al, 1997). Punktmutationen treten deutlich seltener auf. Laut Literatur finden sich im Durchschnitt bei etwa 1-3 % der Patienten mit JS/JSRD Veränderungen des *JBTS4*-Gens (Parisi, 2009). In einer zusammenfassenden Arbeit von E. M. Valente und Arbeitsgruppe wird berichtet, dass bei Patienten mit Nierenbeteiligung bei 2,5-14,3 % (6,7 %) Mutationen im genannten Gen nachgewiesen werden können (Valente et al, 2008). In einer weiteren Arbeit wurde eine Detektionsrate von 8,9 % für JS-Patienten mit Nierenbeteiligung im eigenen Kollektiv ermittelt (Caridi et al, 2006). Um die Häufigkeit im eigenen Kollektiv zu prüfen wurden 24 Patienten mit Verdacht auf JS/JSRD in Hinblick auf die häufigste homozygote Deletion des *JBTS4*-Gens (Größe des deletierten Bereichs: 290 Kb) mittels Multiplex-Deletions-PCR untersucht.

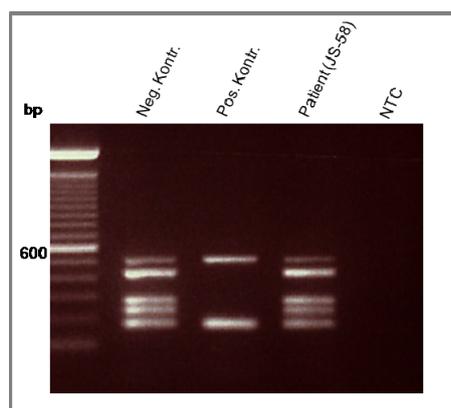


Abbildung 4.16: Exemplarische Darstellung der Untersuchung auf die häufigste *JBTS4*-Gen-Deletion bei Familie JS-58 mit Verdacht auf JS. Bahn 1: Ergebnis der Negativkontrolle (Wildtyp-DNA), Bahn 2: Ergebnis der Positivkontrolle (DNA-Probe eines Nephronophthise-Patienten mit nachgewiesener homozygoter Deletion), Bahn 3: Exemplarische Darstellung der Untersuchung eines Patienten ohne homozygote Deletion, Bahn 4: Leerwert (*No-Template-Control*)

4. Ergebnisse

Bei sieben Patienten lag eine Nierenbeteiligung vor, weitere sieben Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Einsendung keine Nierenbeteiligung. Bei zehn Patienten lagen keine Angaben diesbezüglich vor. Bei keinem der untersuchten Patienten wurde ein Deletion nachgewiesen (Abbildung 4.16). Bei zwei Patienten (ein Patient mit Nierenbeteiligung) wurden in der Folge Mutationen in anderen Genen nachgewiesen. Fünf Patienten mit Nierenbeteiligung und 17 Patienten ohne Angaben oder ohne bekannte Nierenbeteiligung wurden bisher nicht molekulargenetisch aufgeklärt. Welche Patienten im Detail untersucht wurden, ist Tabelle A2 des Anhangs zu entnehmen.

4.4.2. Untersuchungen auf die Spleißmutation c.2991+1655A>G des *MKS4*-/*JBTS5*-Gens

Die Spleißmutation c.2991+1655A>G in Intron 26 des *MKS4*-/*JBTS5*- (*LCA10*-) Gens stellt eine der häufigsten detektierten Mutationen bei Patienten mit Leberscher kongenitaler Amaurose (LCA), einer nicht-syndromalen Ziliopathie, dar. In der Arbeit von A. den Hollander und Arbeitsgruppe wurde sie bei 21 % der LCA-Patienten nachgewiesen (den Hollander et al, 2006). Sie wurde bisher nicht bei Patienten mit JS/JSRD oder MKS beschrieben. Um zu überprüfen inwieweit die Veränderung auch bei den genannten Syndromen eine Rolle spielen könnte, wurden 28 Patient mit Verdacht auf ein MKS (n=15) oder JS/JSRD (n=13) auf diese Mutation untersucht. Weder für die hier untersuchten MKS noch JS-/JSRD-Patienten lagen valide Informationen bezüglich einer Augenbeteiligung vor. Eine konnatale LCA war in keinem Fall beschrieben. Bei keinem Patienten konnte die Spleißmutation c.2991+1655A>G in heterozygoter oder homozygoter Form nachgewiesen werden (Abbildung 4.17). Bei einem JS-Patienten wurden zwei pathogene Mutationen des *MKS4*-/*JBTS5*-Gens nachgewiesen. Drei Patienten zeigten Mutationen in anderen Genen. Bei der Mehrzahl der Patienten (n=9) wurden bisher keine Mutationen in den untersuchten Genen nachgewiesen. Bei den MKS-Patienten wurden in fünf Familien andere pathogene Mutationen des *MKS4*-Gens nachgewiesen, zwei Familien zeigten pathogene Mutationen in anderen Genen. Bei fünf Patienten konnten bisher keine Mutationen nachgewiesen werden oder es wurden Veränderungen von unklarer pathogenetischer Relevanz detektiert. Drei

4. Ergebnisse

Patienten zeigten u. a. eine unklare Veränderung des *MKS4*-Gens. Welche Familien im Detail untersucht wurden, ist den Tabelle A1 und A2 des Anhangs zu entnehmen.

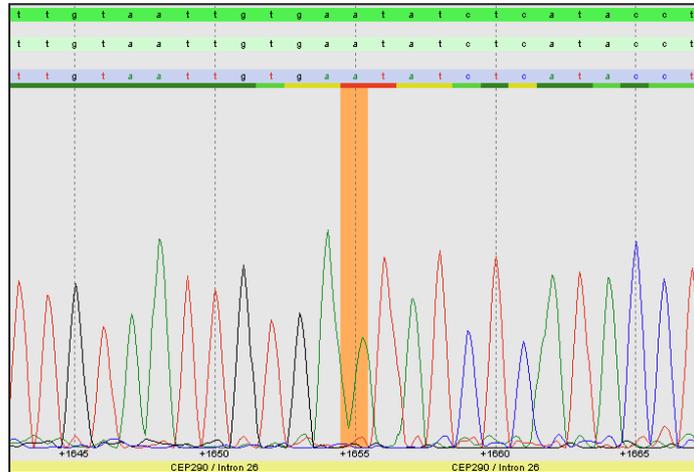


Abbildung 4.17: Exemplarische Darstellung der Untersuchung auf die bei der LCA häufig beschriebene Spleißmutation c.2991+1655A>G in Intron 26 des *MKS4*-/*JBTS5*- (*LCA10*)-Gens bei Patienten mit Verdacht auf JS/JSRD und MKS. Der Patient (JS-55), der bisher ohne Mutationsnachweis in den untersuchten Genen ist (Tabelle A2 des Anhangs), zeigt die Wildtyp-Sequenz für den untersuchten Abschnitt.

4.5. Einzelkasuistiken

Einzelne Familien des eigenen Kollektivs zeigten molekulare Besonderheiten und werden daher an dieser Stelle noch ein Mal detailliert aufgeführt.

Familie BBS-53:

Bei der Indexpatientin der Familie BBS-53 wurde bei klinischem Verdacht auf ein BBS bei bekannter Blutsverwandtschaft der Eltern mittels Homozygotie-Array ein 16,2 Mb großer ROH-Block für den *BBS2*-Locus nachgewiesen, jedoch für kein weiteres der untersuchten o. g. *BBS*-Gene (Tabelle 4.9). Mittels Sequenzierung nach Sanger wurde schließlich die Mutation c.1528G>T (p.Val510Phe) in Exons 13 detektiert. Die Veränderung wurde bis dato weder als apathogene Variante noch als pathogene Mutation beschrieben. Die Segregation wurde anhand der elterlichen Proben bestätigt. Es standen keine weiteren Familienmitglieder für zusätzliche Segregationsanalysen zur Verfügung. Aufgrund der Position der Veränderung (erste Base des Exons 13)

4. Ergebnisse

in Verbindung mit der Art des Austauschs (G>T) unter Berücksichtigung von Konsensus-Sequenzen für Exon/-Intron-Übergänge, wurde ein Effekt im Sinne einer Spleißmutation angenommen. Eine bioinformatische Analytik stützte diese Theorie. Um einen möglichen pathogenen Effekt der Veränderung zu belegen wurde eine Spleißanalyse anhand von aus Blut isolierter RNA der Eltern und der Indexpatientin durchgeführt. Nach Etablierung der erforderlichen cDNA-Primer anhand einer Wildtyp-Kontrolle und Bestätigung der *BBS2*-Expression im Blut wurde die Analytik durchgeführt. Abbildung 4.18 zeigt, dass die erwartete Wildtyp-Transkript-Bande beim heterozygoten Vater in abgeschwächter Form nachweisbar ist (732 bp).

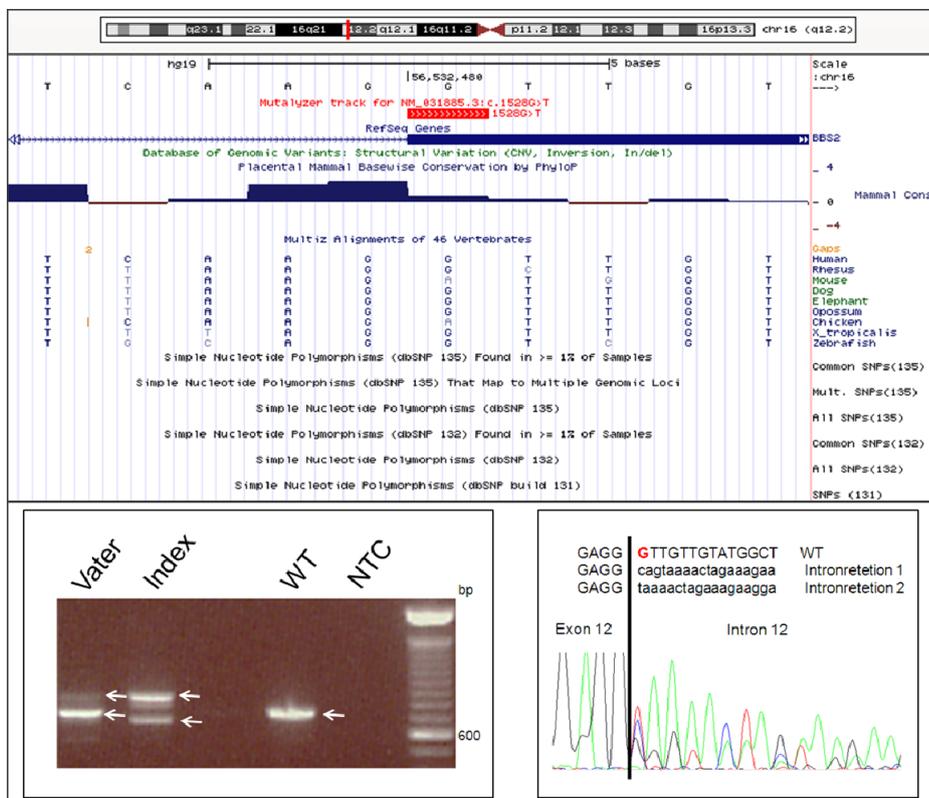


Abbildung 4.18: Analyseergebnisse der Familie BBS-53. Oben: Darstellung der Basenkonservierung der Position c.1528 des *BBS2*-Transkripts NM_031885.3 mittels UCSC für verschiedene Spezies. Links: Gelelektrophoretische Auftrennung der cDNA-PCR der Familie (Vater und Index) sowie einer Wildtyp-Kontrolle. Die erwartete Bandengröße (Produkt Exon 10 bis Exon 14) bei regulärem Spleißen entspricht der Bande der Wildtyp-Kontrolle (732 bp). Die ca. 860 bp große Bande bei Index und Vater entspricht einer partiellen Intronretention des Introns 12. Die zusätzliche kleinere Bande stellt ein Artefakt dar. Rechts: Das Elektropherogramm der Sequenzierung der etwa 860 bp großen Bande der Indexpatientin mittels eines Sequenzier-Primers in Exon 11 des *BBS2*-Gens zeigt die alternative Nutzung zweier kryptischer Spleißstellen in Intron 12.

4. Ergebnisse

Unter Verwendung der RNA/cDNA der Indexpatientin konnte keine Wildtyp-Bande erzeugt werden. Im Gegenzug weist die Indexpatientin jedoch zwei abweichende Banden auf, die beim Vater in abgeschwächter Form ebenfalls nachweisbar sind. Eine durchgeführte Sequenzieranalytik ergab, dass bei der im Vergleich zum Wildtyp größeren Bande von etwa 860 bp eine partielle Intronretention des Introns 12 vorliegt, es wurden zwei kryptische Spleißstellen in Intron 12 genutzt. Bei der zusätzlichen Bande handelt es sich nach Sequenzierung um eine Artefakt-Bande. In der Familie wurde somit der funktionelle Nachweis erbracht, dass es sich bei der Mutation c.1528G>T (p.Val510Phe) des Exons 13 des *BBS2*-Gens tatsächlich um eine Spleißmutation handelt.

Familie BBS-55:

Der Indexpatient der konsanguinen Familie BBS-55 zeigte bei klinischem Verdacht auf ein BBS im Homozygotie-Array ROH für verschiedene *BBS*-Loci (Tabelle 4.9). Für Exon 7 und Exon 8 des untersuchten Transkripts des *BBS4*-Gens (ROH-Block 14,0 Mb) ließ sich schließlich kein PCR-Produkt erzeugen. Obgleich eine größere Deletion des Gens im SNP-Array nicht nachzuweisen war, lag der Verdacht auf eine die genannten Exons umspannende Deletion nahe. Um den Nachweis zu erbringen wurden daher verschiedene *Junction*-Fragment-PCRs etabliert. Die verwendeten Primer wurden in verschiedene Abschnitte des Introns 6 und Intron 8 gelegt. Mittels eines Primer-Paares gelang schließlich die Darstellung der Wildtyp-Bande von 5524 bp anhand einer Kontroll-DNA. Für den Indexpatienten konnte ausschließlich ein deutlich verkürztes Produkt generiert werden (ca. 2700 bp). Bei beiden Eltern konnten wiederum sowohl die Wildtyp-Bande als auch die verkürzte Bande nachgewiesen werden. Die Direkt-Sequenzierung bestätigte schließlich, dass bei dem Patienten Homozygotie für eine 2841 bp große Deletion des *BBS4*-Gens vorliegt (c.406-804_587+175del2841), welche die Exons 7 und 8 sowie Teile der umgebenden Introns beinhaltet (Abbildung 4.19).

4. Ergebnisse

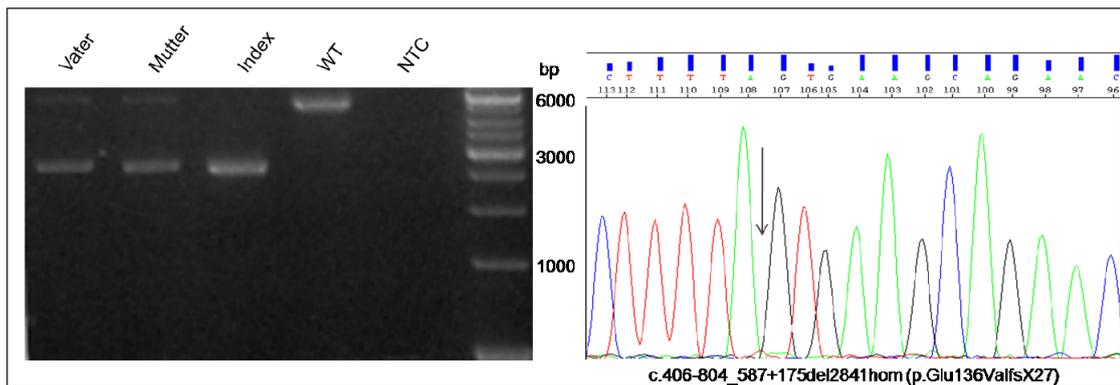


Abbildung 4.19: Analyseergebnisse für das *BBS4*-Gen der Familie BBS-55. Links: Gelelektrophoretische Auftrennung der *Junction*-Fragment-PCR-Produkte der Familie (Vater, Mutter und Index) sowie einer Wildtyp-Kontrolle. Die erwartete Größe der Wildtyp-Bande beträgt 5524bp für die Exon 7 und 8 inklusive des Introns 7 des *BBS4*-Gens sowie Teile der Introns 6 und 8. Diese konnte bei der Kontroll-DNA als auch bei beiden Eltern nachgewiesen werden. Bei dem Indexpatienten konnte ausschließlich eine Bande von ca. 2700 bp nachgewiesen werden. Diese Bande kann ebenfalls bei den Eltern beobachtet werden. Rechts: Im Elektropherogramm der entsprechenden Bande des Indexpatienten zeigt sich die homozygote Deletion c.406-804_587+175del2841hom (p.Glu136ValfsX27).

Familie MKS-39:

Bei Familie MKS-39 wurde bei zwei Feten der Verdacht auf ein MKS geäußert. Material eines gesunden Kindes lag ebenfalls vor. Der Einsender gab an, dass möglicherweise eine Blutsverwandtschaft in der Familie vorliegt. Bei allen drei Kindern konnten mittels SNP-Array mehrere homozygote Bereiche von einer Größe von 5 Mb und größer nachgewiesen werden (Tabelle 4.7). Es konnte jedoch für die Betroffenen keine Homozygotie für die derzeit bekannten *MKS*-Loci (*MKS1-MKS10*) nachgewiesen werden. Aufgrund der Familienkonstellation und Voruntersuchungen wurde auswertig eine Exom-Analyse der DNA eines Feten in Auftrag gegeben: Die Anreicherung erfolgte dort mittels des TruSeq-Exoms (Firma: Illumina). Der Lauf wurde auf einem HiSeq-2000-Sequenzierer (Firma: Illumina) durchgeführt. 90,51 % der *Targets* waren dabei mindestens 30-fach abgedeckt. Die übermittelten Daten beinhalteten sowohl heterozygote als auch homozygote Varianten ausgenommen häufige Polymorphismen (MAF > 1%). Die eigene Auswertung der Daten ergab den Hinweis auf eine Mutation des *MKS6*-Gens (Abbildung 4.20). Eine zweite Mutation des *MKS6*-Gens konnte in den übermittelten Daten jedoch nicht ermittelt werden. Eine Auswertung bezüglich der *Coverage* der einzelnen Exons ergab, dass für alle Exons eine zufriedenstellende *Coverage* vorlag. Lediglich für Exon 5 zeigte

4. Ergebnisse

sich, dass einzelne Bereiche des Exons nicht sequenziert wurden. Eine Nachanalyse erbrachte jedoch auch hier keine Mutation.

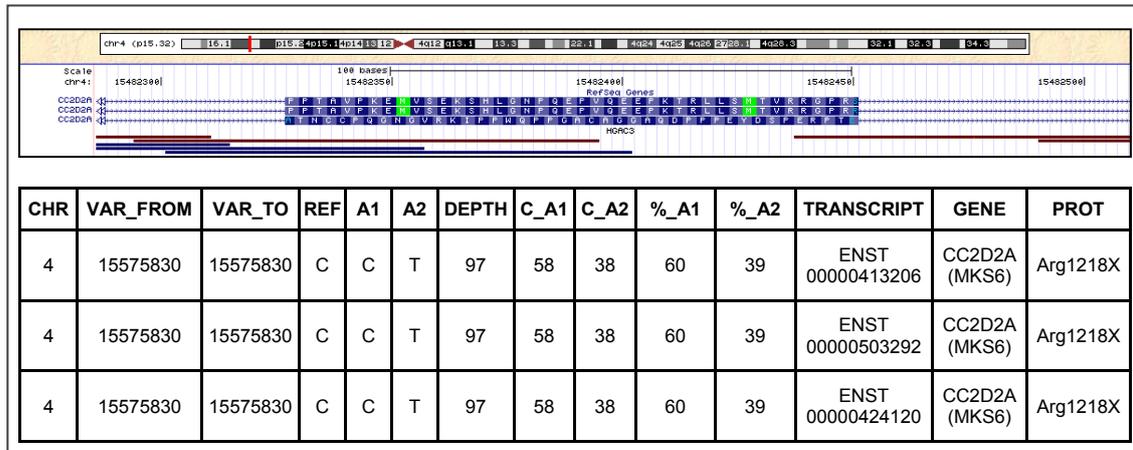


Abbildung 4.20: Auszug der Ergebnisse der Exom-Analyse der Familie MKS-39. Oben: Coverage des Exons 5 des untersuchten betroffenen Feten der Familie im UCSC browser (in blauen und roten Balken dargestellt). Teilbereiche des Exons wurden bei der Analyse nicht abgedeckt. Unten: Auszug der übermittelten Exom-Daten mit Darstellung der Mutation der in der Familie nachgewiesenen Mutation p.Arg1218X des MKS6-Gens (CHR= Chromosom, VAR_FROM/VAR_TO= genomische Basenposition des Chromosoms, REF= Referenzbase, A1/A2= Allel, DEPTH= Gesamt-Reads der Position, C_A1/C_A2 Reads der jeweiligen Base, %_A1/%_A2= Prozentualer Anteil, PROT=Protein)

Eine daraufhin durchgeführte Analytik des weiteren kodierenden Bereichs des MKS6-Gens mittels Sanger-Sequenzierung ergab als zweite Mutation die heterozygote Spleißmutation c.4315-6_4315-4del des Introns 34. Die Mutationen segregieren in der Familie, Auch bei dem zweiten Feten konnten die Mutationen bestätigt werden (Abbildung 4.21)

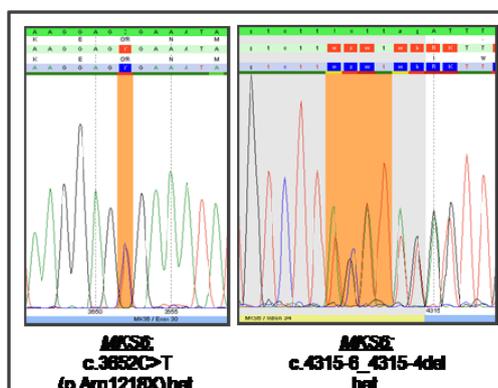


Abbildung 4.21: Mutationen des MKS6-Gens bei Familie MKS-39. Die zweite Mutation konnte schließlich mittels Sanger-Sequenzierung ermittelt werden. Die Mutationen konnten bei beiden Betroffenen nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Zur Erstellung eines rationalen Algorithmus zur Abklärung der Ziliopathie-Syndrome MKS, JS/JSRD und BBS wurden molekulargenetische Daten von 215 Ziliopathie-Familien des eigenen Kollektivs unter Einbeziehung der Literaturdaten ausgewertet. Ergänzend wurde in diesem Zusammenhang der Einsatz aktueller molekulargenetischer Methoden validiert und implementiert. Darüber hinaus sollte auf Basis der Daten des eigenen Kollektivs geprüft werden, ob eine Neudefinition des klinischen Phänotyps möglich ist.

Verfügbare Literaturdaten zu Mutationen in den derzeit bekannten *MKS*- (*MKS1-10*), *JBTS*- (*JBTS1-17*) und *BBS*-Genen (*BBS1-16*) wurden zusammengestellt. Die Kriterien, die zur Erhebung der Daten herangezogen wurden sind ausführlich in Kapitel 4.1 erläutert. Diese Daten wurden mit den Angaben zum eigenen Kollektiv verglichen.

Einschlusskriterium für die vorliegende Studie war primär die klinische Verdachtsdiagnose durch den Einsender. Das Kollektiv umfasste insgesamt 88 Familien mit der Verdachtsdiagnose MKS, 61 Familien mit der Verdachtsdiagnose JS/JSRD und 66 Familien mit Verdacht auf BBS. Diese Art der Erfassung hat naturgemäß einen Einfluss auf die Ergebnisse, da sie von der klinischen Einschätzung durch den Einsender abhängen. So sind durch Fehlen einheitlicher Diagnosekriterien und großzügiger Veranlassung von Analysen entsprechend niedrigere Gesamtdetektionsraten zu erwarten. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass ein *Bias* durch eine subjektive Vorselektion der Einsender vorliegt.

Weiterhin ist bezüglich der Analysen im eigenen Kollektiv folgendes anzumerken. Nicht alle MKS-, JS-/JSRD- und BBS-Familien wurden jeweils für die gleichen Gene untersucht. Es lag i. d. R. ein konkreter analytischer Auftrag vor, daraus ergaben sich Einschränkungen in Hinblick auf die möglichen Untersuchungen. Wurden pathogene Mutationen nachgewiesen, wurden nur in ausgewählten Fällen weitere Analysen durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Analytik einiger Gene (wie etwa die Analyse des *MKS6*-/*JBTS9*-Gens) erst im

Verlauf der Untersuchungen routinemäßig implementiert. Der Fokus der Analysen liegt dabei für das MKS und das/die JS/JSRD auf den aus der Literatur als "häufig von Mutationen betroffen" ermittelten Gene *MKS1*, *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5*, *MKS6/JBTS9*, *JBTS3* bzw. *BBS1*, *BBS2*, *BBS10* und *BBS12* für das BBS.

5.1. Detektionsraten für MKS, JS/JSRD in Abhängigkeit vom klinischen Bild

Für das MKS wurden Literaturdaten (Tabelle A4 des Anhangs) zu drei verschiedenen ethnischen Gruppen mit verschiedenen Mutationsfrequenzen ermittelt. Für die europäisch-kaukasische Kohorten ergab sich eine Gesamtdetektionsrate von 87 % für die Gene *MKS1*, *MKS3*, *MKS4* und *MKS6*. Die höchste Gesamtdetektionsrate wurde für die finnische Kohorte ermittelt. In 90 % der Fälle wurden ursächliche Mutationen beschrieben. Diese verteilen sich hier auf die Gene *MKS1*, *MKS4* und *MKS6*. Darüber hinaus wurden Daten zu multiethnischen Kollektiven inklusive konsanguiner Patienten (Türkei und arabische Länder) erhoben. Hierbei konnte jedoch keine Gesamtdetektionsrate ermittelt werden, da bisher keine validen Daten zu Mutationen des *MKS4*-Gens veröffentlicht wurden. Ein derzeit nicht näher zu ermittelnder Anteil an Mutationen, der 13 % bzw. 10 % der europäischen und finnischen Patienten betrifft, verteilen sich auf die weiteren bekannten Gene *MKS2/JBTS2*, *MKS5/JBTS7*, *MKS7*, *MKS8*, *MKS9*, *MKS10*. Ein Grund hierfür ist, dass bis dato i. d. R. nur Einzelfamilien berichtet wurden oder mehrheitlich einzelne Populationen oder Familienkonstellationen untersucht wurden. Im eigenen unselektierten Kollektiv mit der Indikation "Verdacht auf MKS" wurden bei 37,5 % der Familien zwei pathogene Mutationen in den Genen *MKS1*, *MKS3*, *MKS4* und *MKS6* detektiert. Bei 7,4 % wurde lediglich eine pathogene Mutation oder eine oder mehrere Mutationen von ungeklärter pathogenetischer Relevanz ermittelt. Die relativ niedrige Detektionsrate des eigenen Kollektivs erklärt sich durch die einführung benannten Einschränkungen. Die Detektionsrate des eigenen Kollektivs erhöht sich auf 76,7 %, wenn lediglich die Familien einbezogen werden, bei denen alle vier genannten Gene auch untersucht wurden. Im eigenen Kollektiv konnten keine klar pathogenetisch relevanten

5. Diskussion

Mutationen der Gene *MKS2*, *MKS5* und *MKS7* detektiert werden. Die Gene *MKS8-MKS10* wurden bis dato nicht untersucht.

Für das/die JS/JSRD wurden gleichermaßen die Literaturdaten bezüglich Mutationen der derzeit bekannten *JBTS*-Gene (*JBTS1-17*) gesichtet und ausgewertet (Tabelle A5 des Anhangs). Angaben zur ethnischen Zusammensetzung der Kollektive lagen hier im Detail nicht vor. Es ist von multiethnischen Kollektiven auszugehen. Für das/die JS/JSRD wurde eine eingeschränkte Genotyp-Phänotyp-Korrelation beobachtet, die in Kapitel 5.6 erläutert wird. Die verwendeten Daten beziehen sich soweit ersichtlich auf klinisch und genetisch nicht vorselektierte Kohorten. Es wurde von einer gleichmäßigen Verteilung aller JSRD-Subgruppen ausgegangen. Für die Gene *JBTS3*, *JBTS5*, *JBTS6*, *JBTS9* wurde eine Detektionsrate von 40 % ermittelt, insgesamt wird diese derzeit für alle bekannten Gene auf ca. 50 % geschätzt (Valente et al, 2011). Bei Indikation "Verdacht auf JS/JSRD" wurden im eigenen multiethnischen Kollektiv bei 23,2 % der Patienten pathogene Mutationen nachgewiesen. Bei 3,3 % wurde eine klar pathogenetisch relevante Mutation bzw. unklare Varianten detektiert. Nach Ausschluss der Familie, bei denen nicht alle vier Gene untersucht wurden, erhöht sich diese auf 45,2 %. In keinem der weiteren untersuchten *JBTS*-Gene (*JBTS1*, *JBTS2*, *JBTS4*, *JBTS7* oder *JBTS8*) konnten klar pathogene Mutationen detektiert werden. Die Gene *JBTS10-JBTS17* wurden bis dato nicht untersucht. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass sich die o. g. Detektionsrate aufgrund der aktuell relativ geringen Aufklärungsraten durch die weiteren, jüngst detektierten *JBTS*-Gene erhöht. Für einige Gene wurde bereits nachgewiesen, dass sie in besonderen Bevölkerungsgruppen eine größere Rolle spielen (Edvardson et al, 2010). So sind Mutationen des *JBTS2*-Gens in der aschkenasisch-jüdischen Bevölkerung verbreitet. Auch die Identifizierung weiterer Loci scheint weiterhin wahrscheinlich. Die niedrigeren Detektionsraten könnten auch Ausdruck einer ungenügenden klinischen Zuordnung zum JS-/JSRD-Spektrum sein. Dies wird exemplarisch durch eine Publikation belegt, bei der bei Patienten mit initialem klinischen Verdacht auf JS/JSRD chromosomale Imbalancen nachgewiesen werden konnten (Kapitel 5.5.2).

Während der Nachweis einer pathogenen Mutation in der Literatur kaum berichtet wird, wurde im eigenen Kollektiv bei 7,4 % der MKS-Patienten und 3,3 % der JS-/JSRD-Patienten lediglich eine klar pathogenetisch relevante Mutation in einem der Gene oder eine oder mehrere unklare Varianten beobachtet. Der Nachweis einer pathogenetisch relevanten Veränderung kann verschiedene Ursachen haben. Eine zufällige Anlageträgerschaft einer Mutation kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Bestimmte Mutationen treten dabei nachweislich gehäuft auf. Die Heterozygotenfrequenz für die *MKS1*-Foundermutation (Fin_{major}: c.1408-34_1408-6del) wurde beispielweise für deutsche Familien mit 1:260 ermittelt (Auber et al, 2007). Ein weiteres Beispiel hierfür stellt die in der Literatur beschriebene und im eigenen Kollektiv mehrfach detektierte Mutation c.622A>T (p.Arg208X) des *MKS3*/*JBTS6*-Gens dar. (Consugar et al, 2007), (Tallila et al, 2009). Diese wird in den einschlägigen Polymorphismendatenbanken mit einer Allelfrequenz von 0,022 % in der Normalbevölkerung angegeben. Ähnliches gilt für die Mutation c.1843T>C (p.Cys615Arg), die ebenfalls bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, sowie im eigenen Kollektiv nachgewiesen wurde (Tallila et al, 2009). Im eigenen MKS- und JS-/JSRD-Kollektiv machen beide Mutationen zusammen 2,73 % der mutationstragenden Allele aus. Neben einer erkrankungsunabhängigen Anlageträgerschaft kann nicht ausgeschlossen werden, dass die detektierte Mutation (etwa bei Familie MKS-85) in Verbindung mit einer zweiten nicht detektierten Veränderung ursächlich für den Phänotyp der Patienten ist. Im Wesentlichen gilt es hier zu berücksichtigen, dass derzeit mehrheitlich der kodierende Bereich des längsten offenen Leserahmens und angrenzende Exon-/Intronübergänge auf Punktmutationen untersucht wurden. Weit intronisch gelegene Spleißmutationen werden somit nicht erfasst. Diese wurden in der Literatur bereits für einige Gene beschrieben (Frank et al, 2007).

5.1.1. Mutationsverteilung in den Genen *MKS1*, *MKS3*/*JBTS6*, *MKS4*/*JBTS5*, *MKS6*/*JBTS9* und *JBTS3*

Mutationen der Gene *MKS1*, *MKS3*/*JBTS6*, *MKS4*/*JBTS5*, *MKS6*/*JBTS9* und *JBTS3* sind nach ermittelten Literaturdaten und den im eigenen Kollektiv erhobenen Daten für den Großteil der MKS- und JS-/JSRD-Fälle verantwortlich.

5. Diskussion

Im relativen Vergleich zeigen sich bei 33,3 % der MKS-Fälle des eigenen Kollektivs und 41,4 % der aus der Literatur ermittelten europäischen Patienten Mutationen des *MKS1*-Gens, bei 39,4 % bzw. 26,4 % Mutationen des *MKS3*-Gens, bei 18,2 % bzw. 16,1 % des *MKS4*-Gens und bei 9,1 % bzw. 16,1 % des *MKS6*-Gens. Die niedrigere Detektionsrate für das *MKS6*-Gen im eigenen Kollektiv lässt sich auf die o. g. eingeschränkt durchgeführte Analytik des Gens im eigenen Kollektiv zurückführen. Für die *MKS*-Gene wurde der Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den publizierten Daten des europäischen Kollektivs vorgenommen, da für die multiethnischen Kollektive keine Detektionsraten für alle Gene veröffentlicht wurden. Für das finnische Kollektiv ergaben sich weitere Besonderheiten: Hier wird der Großteil der Mutationen im *MKS1*-Gen detektiert. So wurden neben der intronischen spleißrelevante *MKS1*-Foundermutation Fin_{major}: c.1408-34_1408-6del und der *MKS6*-Spleißmutation c.1762C>T, p.Gln588X bisher lediglich vier weitere Mutationen beschrieben, zusammengefasst tragen diese somit fast ausschließlich zu den hohen Detektionsraten des MKS in Finnland bei (Tallila, 2009).

Für das/die JS/JSRD ergab sich für das *JBTS3*-Gen eine Rate von 28,6 % im eigenen Kollektiv bzw. von 27,5% bei den Patienten aus der Literatur, für das *JBTS5*-Gen ergab sich eine Rate von 14,3 % bzw. 33,4 %, für das *JBTS6*-Gen von 35,7 % bzw. 15,6 % und für das *JBTS9*-Gen von 21,4 % bzw. 23,4 %. Die erhöhte Detektionsrate des *JBTS6*-Gens und erniedrigte Detektionsrate des *JBTS5*-Gens könnten durch den o. g. analytischen *Bias* bedingt sein. Beide Gene zeigen eine gewisse Genotyp-Phänotyp-Korrelation im Zusammenhang mit dem/den JS/JSRD: Mutationen des *JBTS6*-Gens werden gehäuft in Verbindung mit einer JSRD mit Leberbeteiligung berichtet, Mutationen des *JBTS5*-Gens werden vermehrt mit Nieren- und Retinaveränderungen assoziiert (Kapitel 5.6). Denkbar wäre somit auch eine einsendungsbedingte phänotypische Häufung im eigenen Kollektiv.

Zusammenfassend stimmen die ermittelten Mutationsfrequenzen der Gene *MKS1*, *JBTS3*, *JBTS5/MKS4*, *JBTS6/MKS3* und *JBTS9/MKS6* mit den ermittelten Daten der Literatur insgesamt überein. Auffällig ist aber, dass JS-/JSRD-Patienten im eigenen Kollektiv gehäuft Mutationen des *JBTS6*-Gens und

seltener Mutationen des *JBTS5*-Gens tragen. Als relative kumulierte Detektionsraten für die genannten Gene können somit zukünftig für das MKS bzw. JS/JSRD folgende Zahlen als Basis für einen Algorithmus, der auf Mutationshäufigkeiten beruht, angenommen werden:

MKS1: 37,3 %, *MKS3*: 32,9 %, *MKS4*: 17,2 %, *MKS6*: 12,6 %

JBTS3: 28,1 %, *JBTS5*: 23,9 %, *JBTS6*: 25,6 %, *JBTS9*: 22,4 %

5.1.2. Bedeutung ergänzender Analysen für MKS und JS/JSRD

Neben Veränderungen in den o. g. häufig von Mutationen betroffenen *MKS*-, *JBTS*- Genen wurden Veränderungen in zahlreichen weiteren Genen für die hier untersuchten Ziliopathien mit geringeren Mutationsfrequenzen berichtet (Kapitel 4.1). Im eigenen Kollektiv wurde in keinem der weiteren untersuchten *MKS*- und *JBTS*-Gene klar pathogenetisch relevante Mutationen nachgewiesen, wobei in Einzelfällen Varianten von unklarer pathogenetischer Relevanz ermittelt wurden.

Homozygote Deletionen des *JBTS4*- (*NPHP1*-) Gens sind die genetische Hauptursache der autosomal-rezessiven NPH, im Vergleich finden sich Punktmutationen des Gens deutlich seltener (Hildebrandt et al, 1997). Homozygote Deletionen wurden auch bei Patienten mit JS/JSRD berichtet (Parisi et al, 2004). M. Parisi bezifferte den Anteil von *JBTS4*-Mutationen generell auf 1-3 % (Parisi, 2009). In einer Publikation der Arbeitsgruppe um E. M. Valente wurde zusammenfassend berichtet, dass bei 2,5 % aller JSRD-Patienten bzw. bei 6,7-14,3 % der JSRD-Patienten mit Nierenbeteiligung Deletionen des *JBTS4*-Gens nachgewiesen werden können (Valente et al, 2008). In einer weiteren Arbeit wurde eine Detektionsrate von 8,9 % für JS-Patienten mit Nierenbeteiligung angegeben (Caridi et al, 2006). Um die Häufigkeit in der eigenen JSRD-Patientenkohorte zu prüfen wurden 24 Patienten in Hinblick auf das homozygote Auftreten der häufigsten 290 kb großen Deletion des *JBTS4*-Gens mittels Multiplex-Deletions-PCR untersucht. Darüber hinaus wurden sechs weitere Patienten mittels Sanger-Sequenzierung oder SNP-Array untersucht. Hier konnte eine homozygote Deletion ebenfalls sicher ausgeschlossen werden, sodass sich die Anzahl der untersuchten Patienten auf 30 beläuft. Bei neun der untersuchten Patienten wurde eine

5. Diskussion

Nierenbeteiligung durch den Einsender angegeben (30 %). Bei 13 Patienten lagen hierzu keine Informationen vor. Bei acht Patienten wurde eine Nierenbeteiligung zum Zeitpunkt der Einsendung verneint. Bei keinem der untersuchten Patienten konnte eine Deletion des *JBTS4*-Gens nachgewiesen werden. Der Anteil an Patienten mit homozygoten Deletionen des *JBTS4*-Gens in einer unselektierten JS-/JSRD-Kohorte ist – unter der Annahme, dass alle Patienten tatsächlich an einem JS/JSRD leiden – somit unter 3,5 % einzuordnen. Der Anteil bei Patienten mit Nierenbeteiligung ist unter 11,5 % anzusiedeln.

Die bisher nicht im Zusammenhang mit JS/JSRD- oder MKS-Patienten beschriebene Spleißmutation c.2991+1655A>G in Intron 26 des *MKS4*-/*JBTS5*- (*LCA10*-) Gens stellt eine häufig beobachtete Mutationen bei LCA-Patienten dar. Sie wurde beispielsweise bei 21 % der LCA-Patienten in einer Arbeit von A. den Hollander und Arbeitsgruppe nachgewiesen (den Hollander et al, 2006). Mutationen des *MKS4*-/*JBTS5*-Gens finden sich außerdem in einem hohen Anteil bei Patienten mit MKS und JS/JSRD. Sie wurden ebenfalls bereits in Verbindung mit der NPH, dem SLS und dem BBS beschrieben. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation konnte bisher nicht bestätigt werden. Dies wird durch die vermehrte Beobachtung von privaten Mutationen zusätzlich erschwert (Coppieters et al, 2010b). Bisher wurde angenommen, dass die Spleißmutation c.2991+1655A>G ausschließlich mit der LCA assoziiert ist, jüngst wurde sie jedoch bei zwei Patienten mit LCA und einer milden Nierenbeteiligung beschrieben (Coppieters et al, 2010a). Daher sollte nun im eigenen Kollektiv geprüft werden, inwieweit die Mutation bei MKS- und JS/JSRD-Patienten ebenfalls beobachtet werden kann. Bei 28 Patienten mit Verdacht auf ein MKS (n=15) oder JS/JSRD (n=13) wurden Untersuchungen in Hinblick auf die Mutation durchgeführt. Bei keinem der untersuchten Patienten konnte die Spleißmutation c.2991+1655A>G des *MKS4*-/*JBTS5*-Gens in heterozygoter oder homozygoter Form nachgewiesen werden. Dabei ist anzumerken, dass für die hier untersuchten MKS- noch JS-/JSRD-Patienten keine validen Informationen bezüglich einer Augenbeteiligung vorlagen. Im eigenen MKS- und JS-/JSRD-Kollektiv wurde bisher bei keinem Patienten eine heterozygote, eindeutig pathogene Mutation des *MKS4*-/*JBTS5*-Gens ohne den Nachweis

einer zweiten Mutation beobachtet. Im Einklang mit den hier vorliegenden Ergebnissen wurde dies auch in der Literatur bisher nicht gehäuft berichtet. Somit ergab sich insgesamt durch die hier durchgeführten Untersuchungen in Verbindung mit den Literaturdaten kein Hinweis, dass die Spleißmutation c.2991+1655A>G des *MKS4*/*JBTS5*-Gens eine hohe Relevanz für die Genese des MKS und des/der JSRD hat.

5.2. Detektionsraten für das BBS in Abhängigkeit vom klinischen Bild und Mutationsverteilung

Das BBS grenzt sich in der klassischen Ausprägung klinisch zu den weiteren hier näher untersuchen Ziliopathien MKS und JS/JSRD ab. Die klinischen Kriterien wurden ausführlich in der Literatur thematisiert (Beales et al, 1999). Lediglich pränatale Manifestationen zeigen klinische Überlappungen zum MKS (Karmous-Benailly et al, 2005). Genetisch zeigen sich bisher ebenfalls lediglich partielle Überschneidungen mit den ursächlichen Genen für MKS, JS/JSRD. So wurden Mutationen der Gene *MKS1/BBS13* und *MKS4/JBTS5/BBS14* auch im Zusammenhang mit einem BBS berichtet (Leitch et al, 2008). Eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation ergab sich in mehreren großen Studien bisher nicht, beispielhaft sei die Studie von C. Deveault und Arbeitsgruppe genannt (Deveault et al, 2011). Somit war ein auf Mutationshäufigkeiten basierender molekulargenetischer Algorithmus bisher der einzig sinnvolle Angang. In der Literatur wurden die Mutationshäufigkeiten der einzelnen Gene für verschiedene multiethnische Kollektive bereits ausführlich berichtet (Tabelle A6 des Anhangs).

Bei der Indikation "Verdacht auf BBS" wurden im eigenen multiethnischen Kollektiv bei 39,4 % der Patienten zwei klar pathogenetisch relevante Mutationen mehrheitlich in den Genen *BBS1*, *BBS2*, *BBS10* und *BBS12* identifiziert. Bei 3 % der aufgeklärten Patienten wurden Mutationen im *BBS4*- und bei jeweils 1,5 % der Patienten wurden Mutationen im *BBS7*- und *BBS8*-Gen detektiert. Die im Vergleich zur Literatur (82,5 %) niedrige Aufklärungsrate liegt wahrscheinlich wie für das MKS und JS/JSRD in der klinischen Zusammenstellung der eigenen Patienten in Verbindung mit dem eingangs thematisierten analytischen *Bias* begründet. Die erstgenannte Annahme wird

5. Diskussion

auch in der Literatur diskutiert. (Redin et al, 2012): Die Arbeitsgruppe mutmaßt, dass die Gesamtdetektionsrate für das BBS aktuell niedriger angesetzt wird als sie mit den bekannten Genen erreicht werden kann. Sie begründet dies mit der Zusammensetzung der Kohorten, die retrospektiv betrachtet die klinischen Kriterien eines BBS nicht immer vollständig erfüllen.

Im eigenen Kollektiv wurden bei relativer Betrachtung 84,8 % der Mutation in den Genen *BBS1*, *BBS2*, *BBS10* und *BBS12* detektiert, in der Literatur traf dies durchschnittlich für 77,7 % der Fälle zu. In den Literaturkollektiven wurden außerdem 15,8 % der Mutationen in den Genen *BBS3*, *BBS5*, *BBS6*, *BBS9*, *BBS11*, *BBS13*, *BBS14*, *BBS15* beobachtet. Im eigenen Kollektiv konnten hier bisher keine Mutationen beobachtet werden. Dabei ist anzumerken, dass in der eigenen Patientenkohorte die genannten Gene nur vereinzelt analysiert wurden. Das *BBS15*- sowie das *SDCCAG8*-Gen wurden im eigenen Kollektiv bisher nicht untersucht. Die Tatsache, dass bei den eigenen Patienten im Vergleich zur Literatur häufiger Mutationen im *BBS10*-Gen (42,4 % vs. 28,0 %) nachgewiesen wurden, spricht ebenfalls am ehesten für einen *Bias* aufgrund des eingeschränkten diagnostischen Auftrags für andere *BBS*-Gene. Das *BBS10*-Gen wurde im eigenen Kollektiv mit Abstand am häufigsten untersucht. Es wurde bei 89,4 % der BBS-Familien mittels verschiedener Methoden direkt oder indirekt analysiert. Das *BBS1*-Gen wurde bei 86,4 % der Patienten analysiert, wobei die Analytik jedoch bei 31,8 % der Patienten auf die häufige Mutation p.Met390Arg beschränkt blieb. Zusammenfassend wurden somit lediglich 54,6 % der Patienten vollständig auf Mutationen des *BBS1*-Gens untersucht. Dies könnte somit auch den im Vergleich zur Literatur geringeren Anteil an *BBS1*-Mutationen im eigenen Kollektiv erklären (19,3 % vs. 31,2 %). Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass Mutationen in verschiedenen *BBS*-Genen oder spezifische Mutationen wie etwa die zwei häufigen rekurrenten Mutationen der Gene *BBS1* (p.Met390Arg) und *BBS10* (p.Cys91LeufsX5) bereits im Vorfeld der eigenen Analysen in anderen Einrichtungen ausgeschlossen wurden. Die beiden genannten Mutationen sind in der europäischen Population für einen Großteil der BBS-Fälle verantwortlich. Sie machten beispielsweise in einer Studie von J. Muller und Arbeitsgruppe bei 73,4 % bzw. 48,3 % der Mutationen aus. (Muller et al, 2010). In der eigenen Kohorte stellen sie 40 % bzw. 31,8 % der Mutations-Allele dar. Diese

5. Diskussion

Abweichung spricht entweder für die o. g. nicht auszuschließende Vorselektion aufgrund von Voruntersuchungen oder sie ist in der Zusammensetzung des eigenen Kollektivs begründet. Wenngleich keine genauen Daten zu Mutationsfrequenzen der einzelnen Genen in den verschiedenen Ethnien aus der Literatur zu entnehmen waren, könnten hier naturgemäß Unterschiede bestehen. Beispielsweise konnten in einer Studie bei 42,6 % der saudi-arabischen Patienten Mutationen des *BBS3*-Gens nachgewiesen werden (Abu Safieh et al, 2010). Nach der einbezogenen Literatur ist in multiethnischen Kollektiven ein Anteil von 0,3 % zu erwarten. Als mögliche Erklärung ist anzumerken, dass in der genannten Arbeit wenige und ausnahmslos blutsverwandte Familien untersucht wurden. Als weiterer Beleg für einen möglichen ethnischen Einfluss wurden in einer weiteren Publikation neben privaten Mutationen insgesamt 13 rekurrente Mutationen für mehrheitlich europäische Patienten beschrieben (Billingsley et al, 2010). Bei den eigenen Patienten wurde neben den o. g. mehrfach detektierten Mutationen lediglich die Spleißmutation c.48-1G>A des *BBS1*-Gens bei zwei Patienten (1 x türkisch, 1 x Ethnie unbekannt) und somit wiederholt beobachtet. Sie wurde ebenfalls bereits in der Literatur bei einer saudi-arabischen Familie berichtet (Harville et al, 2010).

Zusammenfassend bestätigen somit die Ergebnisse des eigenen Kollektivs unter den o. g. Einschränkungen bezüglich der Mutationsverteilung weitgehend die bereits in der Literatur vorhandenen Daten zu Mutationshäufigkeiten der *BBS*-Gene.

5.2.1. Pränatale Manifestation des BBS

Pränatale Manifestationen des BBS wurden in der Literatur bereits beschrieben (Karmous-Benailly et al, 2005), (Putoux et al, 2010). Die hier beschriebenen Patienten zeigten pränatal eine multizystische Nierendysplasie, (soweit untersucht) eine hepatische Fibrose sowie eine Polydaktylie (*Meckel-Like*). Es wurde jedoch keine okzipitale Enzephalozele beobachtet. Ein Patient litt an einer Dandy-Walker-Malformation, die ebenfalls im Rahmen des MKS auftritt. In der erstgenannten Arbeit wurden bei 13 Patienten mit fraglicher pränataler

Manifestation eines *BBS/Meckel-Like*-Phänotyp bei drei Feten Mutationen des *BBS2*-Gens, bei zwei Patienten des *BBS4*-Gens und bei einem Patienten des *BBS6*-Gens ermittelt. In der zweiten erwähnten Arbeit wurden Mutationen des *BBS10*-Gens bei pränataler Manifestation bei vier von 20 Feten mit multizystischer Nierendysplasie und Polydaktylie ohne Gallengangsdysplasie berichtet. Ein Fet zeigte außerdem einen Situs ambiguus. Das eigene Kollektiv umfasst sechs Familien mit einer pränatalen BBS-Manifestation mit zystischer Nierendysplasie. In allen Fällen konnten Mutationen nachgewiesen werden. Dabei wurden bei einer Familie Mutationen im *BBS1*-Gen nachgewiesen (BBS-21), bei zwei Familien Mutationen des *BBS10*-Gens (BBS-20, BBS-31) und bei drei Familien Mutationen des *BBS12*-Gens (BBS-22, BBS-47, BBS-51) ermittelt.

Somit konnte durch die Untersuchungen im eigenen Kollektiv das Spektrum an Genen (*BBS1* und *BBS12*) erweitert werden, welche mit einer pränatalen BBS-Manifestation assoziiert werden müssen. Eine Analytik der genannten Gene sollte zukünftig bei Patienten mit einem *Meckel-Like*-Phänotyp durchgeführt werden. Auch scheint naheliegend, dass die weiteren *BBS*-Gene ebenfalls mit pränatalen Manifestationen assoziiert sein könnten. Weitere Studien diesbezüglich sind daher in Zukunft angezeigt.

5.3. Bedeutung neuer Sequenziertechnologien für die molekulare Diagnostik des MKS, JS/JSRD und BBS

Vor dem Hintergrund der extremen Heterogenie der syndromalen Ziliopathien stellen die neuen Sequenziertechnologien mit der Möglichkeit zur parallelen Amplifikation mehrerer Gene bis hin zur parallelen Vervielfältigung des kompletten Exoms und/oder Genoms eine attraktive Methodik dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher diese Technik an einem *Benchtop*-Gerät etabliert und ein *Gen-Panel* zur parallelen Amplifikation der häufig von Mutationen betroffenen MKS- und JS-/JSRD-Gene *MKS1*, *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5*, *MKS6/JBTS9*, *JBTS3* implementiert werden. Insgesamt wurden 21 Fälle (u. a. 9 JS-/JSRD- und 11 MKS-Fälle) mittels der neu etablierten Technik analysiert. Bei 28,6 % der untersuchten MKS-Familien und 37,5 % der JS-/JSRD-Familien

5. Diskussion

ließ sich die Ursache der Erkrankung aufklären. Die hier ermittelten Detektionsraten stimmen in etwa mit den mittels Sanger-Sequenzierung erzielten Detektionsraten überein. Diese relativ niedrigen Aufklärungsraten lassen sich durch die eingangs thematisierten klinischen Besonderheiten des eigenen Kollektivs erklären. Alle Mutationen konnten in der NGS-Auswertung dargestellt werden. Somit ergibt sich für die hier etablierte NGS-Anwendung eine mit der Sequenzierung nach Sanger vergleichbare Sensitivität der Methode. Diese kann jedoch je nach angewandeter NGS-Methodik deutlich unter der Sequenzierung nach Sanger liegen. Beispielsweise wurde in einer Publikation zur NGS-basierten Untersuchung von BBS-Patienten eine Detektionsrate von lediglich 28 % berichtet. (Janssen et al, 2011). Mit konventionellen Analysemethoden wird durchschnittliche eine Raten von 82,7 % erzielt. In der genannten Arbeit wurden 12 *BBS*-Gene (132 kodierende Exons) PCR-basiert amplifiziert und die Amplikons mit einem Illumina Genome Analyzer II sequenziert. Es wurden gepoolte Patientenproben untersucht. Die Autoren mutmaßen, dass neben der Zusammensetzung des Kollektivs und der Selektion durch Voruntersuchungen die Ursache der niedrigen Aufklärungsrate durch die angewendete Technik bedingt sein könnte. In einer weiteren Arbeit wurden 30 *BBS*- und *NPHP*-Gene sowie das *ALMS1*-Gen vorangereichert und parallel sequenziert. Bei 68 % der Patienten wurden Mutationen nachgewiesen (Redin et al, 2012).

Die Analyse des kompletten Exoms hält ebenfalls zunehmend Einzug in die Routinediagnostik. Dennoch zeigt die *Gen-Panel*-basierte Anreicherung im Vergleich zur Analyse des kompletten Exoms derzeit eine höhere Sensitivität, da durch die aktuell zum Einsatz kommenden Exom-Anreicherungsverfahren mitunter nicht für alle Abschnitte des kodierenden Bereichs zuverlässig die erforderliche *Coverage* erreicht werden kann (Wooderchak-Donahue et al, 2012). Auch die Daten der mittels dieser Technik untersuchten Familie MKS-39 des eigenen Kollektivs belegen dies. Hier wurde lediglich eine pathogene Mutation des *MKS6*-Gens in der in Auftrag gegebenen Exomanalyse ermittelt, für Exon 5 des Gens lag keine vollständige Abdeckung vor. Aus den Literaturdaten in Verbindung mit den erhobenen Daten des eigenen Kollektivs

lässt sich ableiten, dass für genspezifische Anreicherungsverfahren derzeit eine höhere Sensitivität erreicht wird.

5.4. Oligogenie und seltene Varianten bei MKS, JS/JSRD und BBS

Neben der klassischen autosomal-rezessiven Vererbung werden zunehmend modifizierende Gene mit Einfluss auf die phänotypische Ausprägung, z. B. für die NPH diskutiert (Tory et al, 2007). Eine tri-/multiallelische/oligogene Vererbung wurde für das BBS beschrieben (Katsanis et al, 2001), (Beales et al, 2003). Die Gesamtheit aller Veränderungen, die den Phänotyp beeinflussen, stellt damit den *Mutational-Load* dar (Zaghloul & Katsanis, 2010). Daher sollte für im eigenen Kollektiv untersuchte Patienten ermittelt werden, in welchem Ausmaß unklare Varianten mit einem möglichen Einfluss auf den Phänotyp detektiert werden können.

Insgesamt wurden bei 71,4 % der mittels NGS-*Panel* untersuchten MKS-Familien (hiervon zwei Familien mit vermeintlich aufgeklärter Pathogenese (MKS-25, MKS-84)) und 37,5 % der untersuchten JS-/JSRD-Familien (hiervon zwei Familien mit pathogenen Mutationen (JS-51, JS-57)) zusätzliche Varianten von unklarer pathogenetischer Relevanz mit einer Frequenz von < 1 % in der Normalbevölkerung in den verschiedenen untersuchten *MKS-/JBTS*-Genen detektiert. Die Daten des eigenen Kollektivs belegen das Ausmaß der genetischen Variabilität der Ziliopathien MKS und JS-/JSRD. Ein Zusammenhang zum Phänotyp kann bei Familie MKS-85 nicht ausgeschlossen werden. Hier wurde neben der heterozygoten, pathogenen Variante c.4333C>T (p.Arg1445X) des *MKS6-/JBTS9*-Gens keine zweite Mutation des Gens nachgewiesen. Es wurden jedoch die bisher nicht beschriebene *Missense*-Mutation c.511G>A (p.Val171Ile) des *MKS3-/JBTS6*-Gens sowie neben anderen häufigeren Varianten die seltene Veränderung c.5237G>A (p.Arg1746Gln) des *MKS4-/JBTS5*-Gens (MAF: 0,3 %) in heterozygoter Form beobachtet. Die Mutation wurde bei JS-/JSRD-Patienten in Kombination mit pathogenen Mutationen des *JBTS4-/INPHP1*-Gens berichtet. Im Gegensatz zu anderen dort untersuchten Varianten zeigte sich kein gehäuftes Auftreten bei Patienten mit schwereren neurologischen Symptomen (Tory et al, 2007). Eine

5. Diskussion

digenische oder triallelische Vererbung kann diskutiert werden. Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang ergeben sich aus Tierversuchen zum *Mutational-Load*: So führte bei *C. elegans* erst der gemeinsame *Knock-out* von *mks3/jbts6* und *mks4/jbts5* zu einer klaren Deformität der primären Zilien (Williams et al, 2010). Bei der blutsverwandten Familie MKS-25 konnte bei beiden Elternteilen eine zu einem Rasterschub führende heterozygote Duplikation des *MKS4-/JBTS5*-Gens nachgewiesen werden (p.Ile556AsnfsX20). Darüber hinaus fand sich die heterozygote *Missense*-Variante c.6401T>C (p.Ile2134Thr), die bisher nicht in der Literatur berichtet wurde. Im Vorfeld wurde außerdem mittels Sanger-Sequenzierung die heterozygote *Missense*-Variante c.1525T>C (p.Tyr509His) des *MKS7*-Gens bei beiden Elternteilen nachgewiesen. Sie betrifft die erste Base des Exons und könnte somit im Sinne einer Spleißmutation wirken. Sie wurde bisher nicht in der Literatur oder als Polymorphismus berichtet. Außerdem wurde bei der Mutter die bereits im Zusammenhang mit der NPH als modifizierende Mutation diskutierte Variante (c.154G>A) p.Ala52Thr des *MKS7*-Gens in heterozygoter Form (rs145643112; MAF 0,6 %) (Hoefele et al, 2007) detektiert. Material der betroffenen Feten stand jedoch nur eingeschränkt zur Verfügung, sodass eine Überprüfung der fetalen Genotypen nicht möglich war. Für die konventionell durchgeführten Analysen ergab sich für unklare Varianten ein Anteil von 7,4 % für die MKS-Patienten und 3,3 % für die JS-/JSRD-Patienten.

Für das BBS wird der Anteil der Familien mit einer triallelischen/oligogenen Vererbung derzeit auf < 10 % der Fälle geschätzt (Katsanis et al, 2001), (Beales et al, 2003), (Waters & Beales, 1993 [updated 2011]). Beispielsweise wurden bei BBS-Patienten mit zusätzlichen phänotypischen Besonderheiten wie etwa Krampfanfällen zusätzliche hypomorphe Varianten in anderen Ziliopathie-Genen (*MKS1/BBS13*, *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5/BBS14*) nachgewiesen, die nach Tierversuchen für den veränderten Phänotyp verantwortlich sein könnten (Leitch et al, 2008). Eine auffällige Häufung von heterozygoten Mutationen der *BBS*-Gene über das statistisch zu erwartende Maß wurde ebenfalls berichtet (Laurier et al, 2006). Andere Studien fanden keine konkreten Hinweise auf oligogene Vererbungsmuster mit phänotypischem Einfluss von hypomorphen Mutationen (Deveault et al, 2011), (Abu-Safieh et al,

2012). Im Einklang mit den letztgenannten Studien fanden sich im eigenen Kollektiv hierfür ebenfalls keine Hinweise. Dabei ist jedoch kritisch anzumerken, dass wie oben ausführlich thematisiert, in der eigenen Kohorte nur einzelne Gene analysiert wurden. Darüber hinaus ist von der Identifizierung weiterer – derzeit unbekannter – Gene auszugehen, sodass die bis dato diesbezüglich erhobenen Ergebnisse eine begrenzte Aussagekraft besitzen.

Zusammenfassend verdeutlichen die NGS-*Panel*-Untersuchungen der eigenen MKS- und JS-/JSRD-Kollektive das Ausmaß der zukünftig zu erwartenden Komplexität genetischer Befunde für diese extrem heterogenen Syndrome. Inwieweit bei den eigenen Patienten eine signifikante Anhäufung von Varianten vorliegt, kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht beurteilt werden, da bis dato keine Vergleichsdaten erhoben wurden. Ein direkter phänotypischer Zusammenhang kann ohnehin schwer abgeleitet werden. Zum einen wurden bei einigen Patienten (wie etwa bei Familie MKS-25) elterliche Proben untersucht, der fetale Genotyp bleibt somit unklar. Zum anderen kann ein Beleg eines pathogenen Einflusses der Veränderungen ohne weitere funktionelle Analysen schwer erbracht werden. Nur eine exakte phänotypische Charakterisierung der Patienten und Familien mit *Follow-up* sowie eine systematische Untersuchung aller Gene mit Hochdurchsatz-Methoden unter Einbeziehung von tierexperimentellen Ergebnissen wird in Zukunft eine Aussage bezüglich der Relevanz unklarer Varianten ermöglichen. In diesem Zusammenhang ist außerdem zunehmend die Erfassung und Charakterisierung aller nachgewiesenen Varianten in entsprechenden Datenbanken von essenzieller Bedeutung.

5.5. Bedeutung der SNP-Array-Analytik für die molekulargenetische Aufklärung von MKS, JS/JSRD und BBS

Mikro-Arrays werden zunehmend zum Nachweis submikroskopischer chromosomaler Imbalancen wie Deletionen und Duplikationen verwendet, da diese eine höhere Auflösung als die konventionelle Zytogenetik ermöglichen (Fodor et al, 1991). SNP-Arrays ermöglichen außerdem eine Genotypisierung im untersuchten Genom und werden daher z. B. für genomweite

Assoziationsuntersuchungen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden sie zur Ermittlung homozygoter Bereiche in blutsverwandten Familien eingesetzt: *A priori* sind bei elterlicher Konsanguinität bei autosomal-rezessiven Krankheiten homozygote Haplotypen für den erkrankungsrelevanten Genort bei dem Patienten anzunehmen. Es sollte daher im eigenen Kollektiv geprüft werden wie effizient in blutsverwandten Familien SNP-Arrays, durch Einbeziehung von ROH und anschließender gezielter Mutationsanalytik, zur Aufklärung der hier untersuchten Ziliopathien eingesetzt werden können. Darüber hinaus sollte ermittelt werden in welchem Umfang pathogene Kopienzahlvarianten zu den Krankheitsbildern beitragen.

5.5.1. Homozygotie-Screening in blutsverwandten Familien

Konsanguine Verbindungen sind in einigen Regionen der Welt traditionell sehr verbreitet (Abbildung 5.1). In den entsprechenden Bevölkerungsgruppen ist aus diesem Grunde das Risiko beispielsweise für Kinder einer Verbindung von erstgradigen Cousins und Cousinen für angeborene Fehlbildungen um 4,4 % höher als in nicht blutsverwandten Partnerschaften (Bittles, 2001). Autosomal-rezessive Erkrankungen – wie etwa die hier näher untersuchten Ziliopathien MKS, JS/JSRD, BBS – kommen entsprechend häufiger vor. So tritt beispielsweise in Kuwait das MKS mit einer Inzidenz von 1:3.000 auf, während es in Südengland mit einer Häufigkeit von 1:140.000 vorkommt. Im eigenen Kollektiv haben blutsverwandte Familien einen Anteil von 26,5 % (57 von 215 Familien), wobei es sich hierbei um die Fälle mit explizierter Angabe einer bestehenden Konsanguinität handelt. Es ist davon auszugehen, dass weitere blutsverwandte Patienten im Kollektiv enthalten sind. Bei unklarem Verdacht auf eine Konsanguinität ist deren Nachweis mittels SNP-Array komplex und sollte außerdem ausschließlich unter Berücksichtigung von ethischen Gesichtspunkten erfolgen (Schaaf et al, 2011).

5. Diskussion

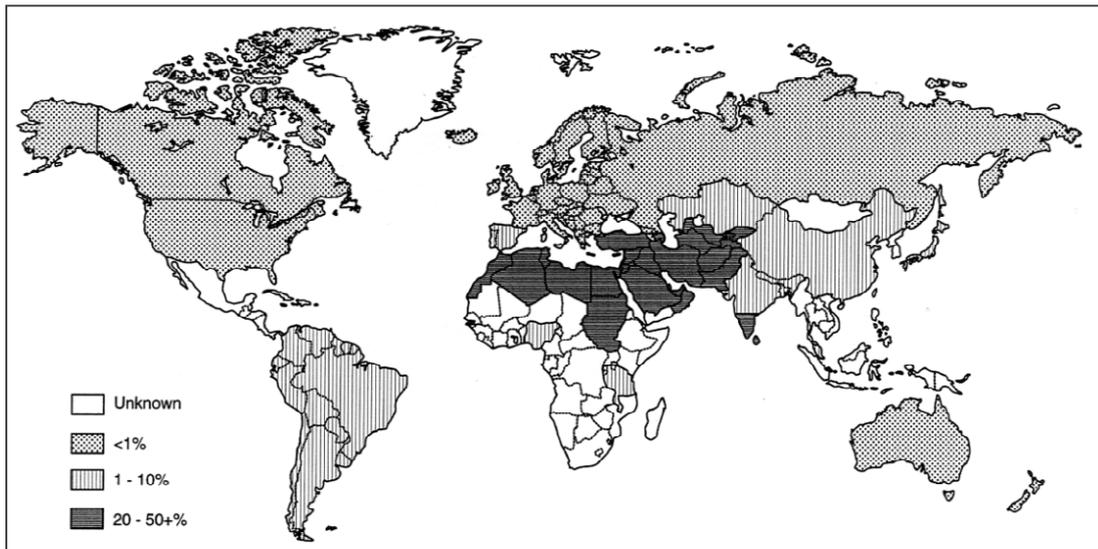


Abbildung 5.1: Zeigt die weltweite Häufigkeit blutsverwandter Verbindungen in der Bevölkerung (Bittles, 2001).

Im eigenen Kollektiv war für den Großteil der mittels dieser Technik analysierten Familien das Bestehen einer Blutsverwandtschaft jedoch i. d. R. den ratsuchenden Eltern selbst bekannt und entsprechend wurde diese mitgeteilt. Kriterien für den sicheren Nachweis einer Blutsverwandtschaft mittels SNP-Array existieren bis dato nicht. Der Umfang und die Größe der homozygoten Bereiche im Genom sind abhängig von der regionalen Herkunft. Weiterhin können Ethnie sowie der Verwandtschaftsgrad der Vorfahren generell in der Population stark variieren. Auch ist die Größe der ROH durch die Größe des jeweiligen Chromosoms limitiert (Referenzgenom GRCh37/hg19: Chromosom 1: 218 Mb, Chromosom 22: 34 Mb). Darüber hinaus existieren für bestimmte Bereiche des Genoms ROH-*Hotspots*, wie es beispielsweise für den Bereich um das *MKS4-/-JBTS5*-Gen nachgewiesen werden konnte (Pemberton et al, 2012).

Aufgrund der geschilderten komplexen populationsgenetischen Aspekte, der begrenzten Anzahl analysierter Patienten im eigenen Kollektiv, der ethnischen Heterogenität und den unterschiedlichen Verwandtschaftsverhältnissen, können im Rahmen dieser Arbeit keine allgemeingültigen Parameter bezüglich des sicheren Nachweises einer Konsanguinität ermittelt werden. Als Einschlusskriterium für Folgeanalysen basierend auf einer Homozygotie der jeweiligen Syndrom-Loci galt das (mögliche) Vorliegen einer Konsanguinität. Dennoch sollte als Beitrag zu der Thematik in der eigenen Array-Kohorte

5. Diskussion

geprüft werden, inwieweit sich der Verdacht auf eine Blutsverwandtschaft unter Auswertung der ermittelten ROH-Daten mit den Daten der einschlägigen Literatur deckt. Daher wurden die ROH-Daten (Anzahl und Größe) der eigenen blutsverwandten, fraglich blutsverwandten und vermeintlich nicht blutsverwandten Patienten erfasst. Als Vergleichsgrundlage wurden die Daten der Arbeitsgruppe um R. McQuillan hinzugezogen. Die Gruppe beschrieb u. a. ROH in der vermeintlich nicht blutsverwandten europäisch-stämmigen CEU-Kontrollpopulation (McQuillan et al, 2008). Basierend auf diesen Daten wurden ROH des eigenen Kollektivs ab einer Größe von 5 Mb erfasst. Bei 29 konsanguinen Individuen des eigenen Kollektivs wurden im Durchschnitt 12 ROH von 5 Mb und größer bzw. 7 ROH von 10 Mb und größer ermittelt. Bei drei Familien lag nach Einsenderangaben keine Blutsverwandtschaft vor. Bei keiner dieser Familien wurde ein ROH-Block > 10 Mb nachgewiesen, zwei der drei Patienten zeigten ROH von 5-10 Mb. Zusammenfassend wurden somit bei 100 % der untersuchten blutsverwandten Individuen (n=29) ROH von 5-10 Mb detektiert, im Vergleich kommen diese bei vermeintlich nicht verwandten CEU-Individuen bei etwa 5 % der Individuen vor. ROH > 10 Mb wurden bei etwa 1 % der CEU-Population in der Arbeit um die Gruppe von R. McQuillan beobachtet, diese traten im eigenen konsanguinen Kollektiv bei 96,6 % der Individuen auf. Ohne Berücksichtigung von Verwandtschaftsgrad und Ethnie konnte im eigenen Kollektiv ermittelt werden, dass der Nachweis von ROH von 5-10 bzw. > 10 Mb somit ein starkes Indiz für das Vorliegen einer vermutlich näheren Blutsverwandtschaft ist. Umgekehrt macht das Fehlen von ROH von 5-10 bzw. > 10 Mb eine nähergradige Konsanguinität unwahrscheinlich. Basierend auf diesen Daten ist somit für die zwei fraglich blutsverwandten Familien (MKS-39, MKS-58) eine Konsanguinität wahrscheinlich.

Um das Ausmaß erforderlicher Folgeanalysen bis zur Diagnosefindung quantifizieren zu können, sollte die Korrelation zwischen detektierter ROH-Größe und Mutationsfrequenzen im eigenen Kollektiv untersucht werden.

Generell ermittelte die Arbeitsgruppe um G. Woods, dass im Durchschnitt bei 38 Kindern, deren Eltern Cousin und Cousine 1. Grades (mehrheitlich pakistanischer und arabischer Abstammung) waren, der ursächliche Locus für eine rezessive Erkrankung eine Größe von etwa 26 Mb aufwies (Woods et al,

5. Diskussion

2006). Im eigenen Kollektiv ergab sich für die hier untersuchten Krankheiten eine ähnliche durchschnittliche Größe von 23,4 Mb für die Mutations-ROH. Bei 33,3 % fanden sich diese im insgesamt größten ROH-Block. Gezielt wurden die MKS-Familien schließlich in Hinblick auf 10 Loci (*MKS1-10*), die JS-/JSRD-Patienten auf 16 Loci (*JBTS1-9,11-17*) und die BBS-Patienten auf 16 Loci (*BBS1-16*) bezüglich Homozygotie und ROH-Block-Größe ausgewertet. Es konnten in 14 Familien (18 Patienten) der untersuchten 23 blutsverwandten Familien sowie in einer der drei fraglich blutsverwandten Familien in den mittels SNP-Array ermittelten bekannten Loci in den Folgeanalysen ursächliche Mutationen nachgewiesen werden. Ohne Berücksichtigung gemeinsamer Daten von Geschwisterschaften wurden bei Priorisierung der Folgesequenzierung auf der Basis der ROH-Block-Größe Mutationen bei 72,2 % der Patienten im ersten untersuchten Gen nachgewiesen. Bei einer Priorisierung nach bekannten Mutationsfrequenzen wären im eigenen Kollektiv bei 83,3 %, der Patienten Mutationen im ersten untersuchten Gen nachgewiesen worden. Im Durchschnitt wurde für zwei der untersuchten Syndrom-Loci eine Homozygotie > 2 Mb ermittelt. Es mussten maximal drei Gene analysiert werden um die ursächlichen Mutationen zu ermitteln.

Die detektierten Mutationen für MKS und JS/JSRD wurden ausnahmslos in den häufig von Mutationen betroffenen Genen *MKS1*, *JBTS3*, *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5* und *MKS6/JBTS9* detektiert. Es ist jedoch anzumerken, dass aufgrund des eingeschränkten diagnostischen Auftrags z. T. nicht in allen Familien die kompatiblen Gene untersucht werden konnten, entsprechend können Mutationen in diesen Bereichen nicht ausgeschlossen werden. Bei den BBS-Patienten wurden bei 42,9 % der mittels Array-Analytik aufgeklärten Patienten Mutationen in den i. d. R. seltener betroffenen Genen *BBS4* (Literatur: Durchschnittlich 2,4 %) und *BBS7* (Literatur: Durchschnittlich 1,8 %) nachgewiesen. Bei 57,1 % der Familien wurden Mutationen in den häufig betroffenen Genen *BBS1*, *BBS2*, *BBS10* und *BBS12* Veränderungen nachgewiesen. Dies könnte entweder aufgrund des bereits in Kapitel 5.2 thematisierten Selektions-Bias durch die Einsender bedingt sein oder eine zufällige Akkumulation aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Patienten darstellen. Denkbar wäre auch ein Zusammenhang mit der Ethnie, wie

5. Diskussion

beispielsweise von der Gruppe um L. Abu Safieh für das *BBS3*-Gen in der saudi-arabischen Population vermutet (Abu Safieh et al, 2010).

Bei den nicht aufgeklärten blutsverwandten Familien ohne Nachweis einer (gemeinsamen) Homozygotie für die bekannten Syndrom-assoziierten Loci, kann der fehlende Nachweis verschiedene Ursachen haben. Er deutet entweder auf die Existenz weiterer Loci hin, welche aufgrund der o. g. Gesamtdetektionsraten v. a. für das/die JS/JSRD anzunehmen ist, oder aber auf eine fehlerhafte klinische Einordnung der Familien. Grundsätzlich ist bei Ausschluss der unterschiedlichen Loci durch Einbeziehung von Daten zu mehreren Betroffenen einer Familie zu bedenken, dass auch unterschiedliche rezessive Grunderkrankungen vorliegen könnten. Auch rezessive Mutationen in verschiedenen Genen bei gleicher Grunderkrankung können aufgrund der Heterogenie nicht ausgeschlossen werden (Laurier et al, 2006). Für die MKS-Familien ohne Mutation scheint eine fehlerhafte klinische Einordnung wahrscheinlich, da für beide Familien ohne Homozygotie für die bekannten Loci Nierenveränderungen – welche das Hauptkriterium für das MKS darstellen – klinisch nicht sicher bestätigt werden konnten. Dies verdeutlicht einen weiteren Vorteil der angewandten Methodik: Bei unklarer klinischer Diagnosestellung kann die Erkrankung in konsanguinen Familien mit dieser Methodik zumindest für das MKS und BBS aufgrund der hohen Gesamtdetektionsraten mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Darüber hinaus können die Array-Daten in Hinblick auf Homozygotie für differenzialdiagnostisch in Erwägung zu ziehende rezessive Erkrankungen ausgewertet werden. Dies belegt beispielsweise Familie MKS-78: Hier war bei bekannter Konsanguinität der Eltern initial bei dem ersten betroffenen Feten der Verdacht auf eine ARPKD geäußert worden, da weder ZNS-Veränderungen noch eine Polydaktylie im pränatalen Ultraschall dargestellt werden konnten. Im Array zeigte sich eine Homozygotie für das *MKS4*-Gen. Durch Sequenzierung konnte eine homozygote *Frameshift*-Mutation nachgewiesen werden, ein zweiter betroffener Fet der Familie mit dem gleichen Genotyp zeigte schließlich ZNS-Fehlbildungen. Generell ist anzumerken, dass auch für konsanguine Familien ein Risiko für *compound*-heterozygote Veränderungen bei Betroffenen wie in der Normalbevölkerung besteht. Dies verdeutlichen die molekulargenetischen Befunde bei Familie MKS-39: Die Angabe einer möglichen Konsanguinität

durch den Einsender in Verbindung mit dem Nachweis von ROH bis über 20 Mb macht eine Blutsverwandtschaft sehr wahrscheinlich. Dennoch wurden in der Folge klar pathogene *compound*-heterozygote Mutationen des *MKS6*-Gens identifiziert.

Der statistische Nachweis von LOD-Scores in blutsverwandten Familien, wie er beispielsweise zur Identifizierung neuer Kandidatengene eingesetzt wird, ist komplex und für die klinische Routine kaum nutzbar. Zunehmend wird jedoch versucht die Information über homozygote Bereiche im Genom bei blutsverwandten Familien mit Verdacht auf autosomal-rezessive Erkrankungen praxistauglich in die Aufklärung der Erkrankung mit einzubeziehen (Alkuraya, 2010), (Papić et al, 2011), (Fischer et al, 2012). Für die syndromalen Ziliopathien wurde dies bisher lediglich für das BBS von L. Abu Safieh und Arbeitsgruppe erfolgreich berichtet, wobei hier stets Geschwisterschaften untersucht wurden (Abu Safieh et al, 2010). Dabei scheint die Anwendung gerade für das MKS und das/die JS/JSRD aufgrund der extremen Heterogenie und klinischen Überlappungen sinnvoll. Die Ergebnisse der im eigenen Kollektiv durchgeführten Untersuchungen belegen am Beispiel der syndromalen Ziliopathien MKS, JS/JSRD und BBS den Nutzen und die Effizienz des Einsatzes von SNP-Arrays bei konsanguinen Patienten zur Diagnosefindung basierend auf ROH. Bei 60,9 % der Patienten konnten in der Folge Mutationen nachgewiesen werden. Die Auswertung der ROH bestätigt anhand des eigenen Kollektivs, dass der Nachweis von ROH von 5-10 Mb bzw. > 10 Mb mit hoher Sensitivität und Spezifität eine Blutsverwandtschaft vorhersagt. Basierend auf den eigenen Daten lassen sich ursächliche Mutationen bei Priorisierung der Folgeanalytik nach ROH-Block-Größe bei 72,2 % der Patienten im ersten untersuchten Gen nachgewiesen.

5.5.2. SNP-Array-gestützte Kopienzahlanalysen

Aufgrund der multiplen Organbeteiligungen stellen chromosomale Imbalancen eine wichtige Differenzialdiagnose zu den hier untersuchten syndromalen Ziliopathien dar. Dies wird auch durch Literaturdaten untermauert (Kroes et al, 2011). In der genannten Arbeit wurden bei zwei Patienten mit initialer klinischer

5. Diskussion

Verdachtsdiagnose auf ein JS letztendlich zwei chromosomale Imbalancen (4,8 Mb-Deletion 1q44, bzw. 15,5 Mb-Duplikation Xq27.2-qter) als Ursache für den Phänotyp identifiziert. Beide Patienten zeigten eine schwere Entwicklungsverzögerung sowie eine Hypotonie und eine Atemregulationsstörung, die auch beim/bei JS/JSRD zu beobachten sind.

Im eigenen Kollektiv wurden 29 Familien mittels SNP-Array analysiert. Bei 17 mehrheitlich blutsverwandten Familien wurden Mutationen in den untersuchten Syndrom-Loci nachgewiesen. Somit wurde bei zwölf der mittels SNP-Array analysierten Familien die Erkrankungsursache bisher nicht aufgeklärt (neun konsanguine Familien). Hier wurden unklare Kopienzahlvarianten bei vier Familien nachgewiesen. Bei zwei Familien konnten diese als Ursache der Veränderungen aufgrund von Segregationsanalysen annähernd ausgeschlossen werden. Bei den beiden weiteren Familien konnten die unklaren CNVs als Ursache der Veränderungen bisher nicht sicher bestätigt oder ausgeschlossen werden (MKS-81, JS-6), da elterliche Proben bisher nicht zur Verfügung standen.

Familie JS-6 zeigt eine heterozygote 507 kb Deletion auf Chromosom 1q21.2, die einige Gene ohne phänotypische Charakterisierung enthält. Sie überlappt nur partiell mit bekannten apathogenen Varianten. Die Variante überlappt nicht mit dem bekannten 1q21.1-Mikrodeletionssyndrom.

Die bei Familie MKS-81 detektierte 352 kb Duplikation (1q44) überlappt mit der deletierten Region eines vermeintlichen JS-Patienten in der genannten Publikation von H. Y. Kroes und Arbeitsgruppe. Die Region enthält neben dem *SMYD3*-Gen das *KIF26B*-Gen, welches am ziliären Transport beteiligt ist. Darüber hinaus wurden weitere Patienten mit phänotypischen Überlappungen zum/zu den JS/JSRD mit Deletionen für die Region um das *KIF26B*-Gen beschrieben (Caliebe et al, 2010). Duplikationen wurden allerdings bisher nicht in einen phänotypischen Zusammenhang gebracht.

Für den Bereich der außerdem bei Familie MKS-81 detektierten Deletion auf Chromosom 3q25.1 (424 kb) wurde bereits ein neues Mikrodeletionssyndrom vorgeschlagen (Rea et al, 2010), (Moortgat et al, 2011): Es wurden mehrere Patienten publiziert, bei denen aber meist größere Deletionen nachgewiesen wurden. Dennoch überlappt das Syndrom mit der in Familie MKS-81 detektierten Variante. Klinisch zeigen sich ebenfalls Überlappungen zwischen

5. Diskussion

den in der Literatur berichteten Fällen mit den Ziliopathien: Bei einem Patienten wurde beispielweise eine Dandy-Walker-Malformation beschrieben (Sudha et al, 2001). Im eigenen Kollektiv konnte somit bei keinem Patienten mit initialer klinischer Verdachtsdiagnose eines MKS, JS/JSRD oder BBS ein nachweislich pathogener CNV identifiziert werden. Dabei ist anzumerken, dass bisher aufgrund des eingeschränkten diagnostischen Auftrags nur ein Teil der Patienten mittels SNP-Array untersucht werden konnte (13,5 %). Des Weiteren lag bei 75 % der Patienten ohne Mutationsnachweis eine Blutsverwandtschaft vor, daher ist als Erkrankungsursache eine autosomal-rezessive Genese insgesamt als wahrscheinlicher einzuordnen.

Bei zwei Patienten wurden CNVs von unklarer klinischer Relevanz nachgewiesen. Vor allem für Familie MKS-81 ist nach Literaturrecherche ein Zusammenhang zum Phänotyp nicht auszuschließen. Auffällig ist, dass hier bei „Verdacht auf MKS“ neben klassischen Merkmalen eines MKS (pränatal manifeste multizystische Nierendysplasie und postaxiale Polydaktylie) zusätzliche Fehlbildungen vorlagen (Spina bifida, sakraler Arnold-Chiari-Symptomkomplex, singuläre Nabelschnurarterie). Für die eingangs genannten mutmaßlichen JS-Patienten der Literatur mit nachgewiesenen Mikrodeletionen/-duplikationen ergab eine retrospektive Betrachtung der klinischen Daten Zweifel an der Diagnose (Kroes et al, 2011). Neben den typischen klinischen Auffälligkeiten waren die charakteristischen Auffälligkeiten der zerebralen Bildgebung nur bedingt nachvollziehbar.

Die Beobachtungen im eigenen Kollektiv in Verbindung mit den Daten der Literatur machen deutlich, dass pathogene und unklare CNVs in Familien mit Verdacht auf eine syndromale Ziliopathie nachgewiesen werden können. Chromosomale Imbalancen stellen somit eine wichtige und oft schwer abgrenzbare Differenzialdiagnose der syndromalen Ziliopathien dar. Die vorliegenden Daten rechtfertigen daher, dass bei Patienten mit Verdacht auf eine der syndromalen Ziliopathien MKS, JS/JSRD oder BBS ein SNP-Array durchgeführt werden kann. Dies gilt insbesondere (1) bei fehlender zweifelsfreier klinischer und pathoanatomischer Diagnosesicherung (MKS, schwer betroffene BBS-/JS-Fälle), (2) bei eingeschränkter pränataler Beurteilbarkeit von Veränderungen z. B. bei MKS durch den bestehenden Fruchtwassermangel, (3) bei fehlender kranialer Bildgebung (JS) sowie (4) bei

5. Diskussion

fehlenden zytogenetischen Untersuchungsergebnissen – insbesondere bei verstorbenen Feten.

Größere Deletionen einzelner Exone sind mittels konventioneller PCR und Sanger-Sequenzierung zumindest in heterozygoter Form i. d. R. nicht nachweisbar. Sie wurden neben der 290 kb großen, vor allem bei der NPH zu beobachtenden *JBTS4*-Gen-Deletion beispielsweise bereits für die Gene *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5*, *MKS6/JBTS9*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7* und *BBS9* in einzelnen Fällen in der Literatur berichtet (Waters & Beales, 1993 [updated 2011]), (Khaddour et al, 2007), (Mougou-Zerelli et al, 2009), (Travaglini et al, 2009). Mit welcher Häufigkeit diese Multi-Exon-Deletionen aber auftreten, ist bisher unklar.

Alle mittels SNP-Array untersuchten Patienten wurden daher ebenfalls auf Deletionen/Duplikationen < 200 kb in den bekannten Syndrom-Loci untersucht. Bei keiner der 29 untersuchten Familien konnte eine entsprechende Deletion oder Duplikation nachgewiesen werden. Bei Familie BBS-55 ergab sich mittels anderer Methoden der Verdacht auf eine homozygote Deletion der Exons 7 und 8 sowie umliegender intronischer Bereiche des *BBS4*-Gens. Diese konnte schließlich mittels *Junction*-Fragment-PCR bestätigt werden. Die Darstellung mit SNP-Array gelang jedoch nicht, da die Kopienzahlmarkerabdeckung für den Bereich insgesamt als zu niedrig einzuordnen ist (i. d. R. maximal ein bis zwei Marker je Exon). Die hier durchgeführten Untersuchungen belegen somit, dass Deletionen/Duplikationen kleinerer Abschnitte der zu untersuchenden Ziliopathie-Gene in Abhängigkeit der Markerabdeckung mittels SNP-Array nicht sicher auszuschließen sind. Diese spielen jedoch im eigenen Kollektiv in Einklang mit der Literatur bei der Genese der hier untersuchten Ziliopathien durchaus eine Rolle. Somit stellt die Etablierung von Methoden zum Nachweis kleinerer Deletionen/Duplikationen wie etwa hochauflösenderer SNP-Arrays, quantitativer PCRs, MLPA-Anwendungen oder quantitativer NGS-Verfahren für die Ziliopathie-Gene einen Ansatzpunkt zur weiteren Verbesserung der molekulargenetischen Aufklärungsraten dar.

5.6. Genotyp-Phänotyp-Korrelation und Neudefinition/Modifikation des klinischen Phänotyps

Mutationen in vielen der derzeit bekannten *MKS*-Gene (*MKS1-MKS10*) wurden ebenfalls bereits mit dem/den *JS/JSRD* assoziiert (*MKS2/JBTS2*, *MKS3/JBTS6*, *MKS4/JBTS5*, *MKS5/JBTS7*, *MKS6/JBTS9*). Darüber hinaus wurden einzelne Gene auch in Verbindung mit einem *BBS* berichtet (*MKS1/BBS13*, *MKS4/JBTS5/BBS14*). Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation gelang bisher nur bedingt, dies wird insbesondere durch die zahlreichen privaten Mutationen in den Familien erschwert.

Ein Zusammenhang zwischen Schweregrad des Phänotyps und Lokalisation der Mutationen wurde für das *MKS3-/JBTS6*-Gen berichtet. *Missense*-Mutationen finden sich demnach gehäuft bei letalen *MKS*-Phänotypen in den Exon 8 bis 15 (8 der 28 kodierenden Exons), vor allem in Kombination mit trunkierenden Veränderungen (Iannicelli et al, 2010). Darüber hinaus wurde eine starke Assoziation zu einer Leberbeteiligung (Fibrose) mehrfach berichtet (Brancati et al, 2009). So wurden bei 73 % der Patienten mit *COACH*-Syndrom Mutationen im *MKS3-/JBTS6*-Gen beobachtet. Außerdem wurden hypomorphe (*Missense*-)Mutationen des *MKS3-/JBTS6*-Gens jüngst mit der *NPH* in Verbindung mit Leberbeteiligung (*NPHP11*) und mit einem *ARPKD*-artigen Phänotyp berichtet (Gunay-Aygun et al, 2009), (Otto et al, 2009). Im eigenen Kollektiv fand sich bei allen *JS/JSRD*-Patienten mit Mutationen im genannten Gen ausnahmslos zumindest eine *Missense*-Mutation. Für die *MKS*-Familien ergab sich, dass entweder eine schwere Mutation mit einer *Missense*-Mutation oder zwei schwere Mutationen zu beobachten waren. Eine Ausnahme bildet Familie *MKS-1* bei welcher bei zwei betroffenen Feten zwei *Missense*-Mutationen (außerhalb von Exon 8-15) nachgewiesen wurden. Dabei lagen zu der Familie wenige klinische Informationen vor, ein Hinweis auf eine *ZNS*-Beteiligung wurde nicht erwähnt, als Differenzialdiagnose wurde *ARPKD* angegeben.

Für das *MKS4-/JBTS5-/BBS14*-Gen, welches bisher das breiteste phänotypische Spektrum zeigt, konnte bis dato keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation festgestellt werden. Trunkierende Mutationen mit Verteilung über

5. Diskussion

das gesamte Gen finden sich sowohl bei den MKS-Patienten als auch bei den JS/JSRD-Patienten und der LCA, dem SLS und BBS (Coppieters et al, 2010b). Dies bestätigte sich auch im eigenen Kollektiv: Sowohl bei den MKS-Familien als auch bei den JS-/JSRD-Familien (JS-35, JS-51) mit Mutationen im *MKS4-/JBTS5-/BBS14*-Gen wurden zwei trunkierende Veränderungen nachgewiesen. Mutationen des genannten Gens werden bei etwa 50 % der JSRD-Patienten mit CORS (mit renaler sowie zerebraler und Augenbeteiligung) berichtet (Brancati et al, 2007), (Valente et al, 2008). Im eigenen JS-/JSRD-Kollektiv wurde bei Familie JS-35 mit Mutationen des *JBTS5-/MKS4*-Gens perinatal keine Nierenbeteiligung angegeben. Das Ausmaß der Überlappungen kann auch anhand der Daten zu Familie MKS-78 verdeutlicht werden. Hier war bei dem ersten betroffenen Feten aufgrund des Fehlens von ZNS-Veränderungen und einer Polydaktylie bei vergrößerten Zystennieren im pränatalen Ultraschall zunächst der Verdacht auf eine APRKD geäußert. Erst der zweite betroffene Fet zeigte eine Dandy-Walker-Malformation mit Zyste im Bereich der hinteren Schädelgrube, sodass die Verdachtsdiagnose MKS gestellt wurde. Es wurden Mutationen im *MKS4-/JBTS5*-Gen nachgewiesen. Auch in der Literatur wurden Mutationen im *MKS4-/JBTS5-/BBS14*-Gen gehäuft bei Patienten mit einem *Meckel-Like*-Phänotyp beschrieben (Baala et al, 2007a).

Für das *MKS6-/JBTS9*-Gen wurde ebenfalls der Versuch unternommen eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu erstellen (Mougou-Zerelli et al, 2009). Hiernach werden bei den MKS-Patienten ausschließlich trunkierende Mutationen beobachtet, während JS-/JSRD-Patienten zumindest eine *Missense*-Mutation tragen. Allerdings räumen die Autoren ein, dass bei zwei der bis zum Zeitpunkt der Publikation berichteten JS-/JSRD-Patienten zwei trunkierende Mutationen im *MKS6-/JBTS9*-Gen nachgewiesen wurden. Im eigenen Kollektiv wurde bei den JS-/JSRD-Patienten ebenfalls mindestens eine *Missense*-Mutation detektiert. Bei den MKS-Patienten wurde entgegen den Literaturangaben bei einer blutsverwandten Familie eine *Missense*-Mutation des Gens detektiert (MKS-84). Dabei muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass lediglich elterliches Probenmaterial zur Verfügung stand, sodass der Phänotyp des Kindes nicht sicher bestimmt werden konnte. Bei einem Elternteil wurde zusätzlich eine trunkierende *MKS3-/JBTS6*-Mutation beobachtet, die jedoch bei dem Partner nicht nachgewiesen werden konnte. Es

5. Diskussion

konnte auch keine weitere Mutation des *MKS3-/JBTS6*-Gens ermittelt werden, sodass angesichts der bestehenden Konsanguinität die *MKS6*-Mutation als Ursache wahrscheinlich bleibt.

Mutationen des *JBTS3*-Gens wurden lediglich in Verbindung mit dem/den JS/JSRD berichtet, sie wurden bisher nicht in Verbindung mit einem MKS beschrieben. Eine eingeschränkte Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurde auch hier postuliert. 20 % der Patienten mit *JBTS3*-Mutationen zeigten ein JS mit Retinabeteiligung, allerdings wurde auch eine Nierenbeteiligung beschrieben (Valente et al, 2006a), (Parisi et al, 2006), (Valente et al, 2008). Im eigenen Kollektiv wurden bei JS-/JSRD-Patienten mit *JBTS3*-Gen-Mutationen keine Nierenbeteiligungen beschrieben, auch eine Retinabeteiligung wurden nicht explizit durch die Einsender angegeben. Es bleibt unklar inwieweit eine Untersuchung des Augenhintergrundes durchgeführt wurde. Für einen Patienten wurde eine unklare Sehstörung berichtet (JS-50). Untersuchungen von MKS-Patienten auf *JBTS3*-Mutationen wurde bisher nicht berichtet. Im eigenen NGS-Kollektiv konnten bei zwei Familien keine Mutationen identifiziert werden.

Auch für das MKS wurde partiell für einzelne Gene der Versuch unternommen eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation abzuleiten. Eine postaxiale Polydaktylie wurde beispielsweise in den Kohorten zweier Arbeitsgruppen gehäuft bei *MKS1*-Mutationen beobachtet. Mildere ZNS-Symptome (wie etwa eine Dandy-Walker-Malformation) traten nur in Verbindung mit *MKS3*-Mutationen auf (Consugar et al, 2007). Darüber hinaus wurden Skelettanomalien, eine Gaumenspalte und ein Situs inversus ausschließlich in Verbindung mit *MKS1*-Mutationen beobachtet (Khaddour et al, 2007). Im eigenen Kollektiv wurden jedoch bei einem Feten mit Hydrozephalus ohne okzipitale Enzephalozele *MKS1*-Mutationen (MKS-20) detektiert.

Mutationen des *MKS1*-Gens konnten bisher nicht bei Patienten mit einem/einer JS/JSRD beobachtet werden. L. Baala und Arbeitsgruppe postulierten daher, dass *MKS1*-Mutationen nur mit dem MKS-Phänotyp assoziiert sind (Baala et al, 2007b). Im Rahmen der Entwicklung des MKS/JS-NGS-*Panels* sollte für die eigenen JS-Patienten ermittelt werden, inwieweit dies zutrifft. Hier konnte bei einer Patientin (JS-57) mit klinisch zweifelsfrei diagnostiziertem JS ohne Nierenbeteiligung und ohne weitere Auffälligkeiten eine *Compound-*

5. Diskussion

Heterozygotie für die bisher nicht beschriebene *Missense*-Mutation c.371G>A (p.Arg124Gln) und die häufige Mutation c.1408-34_1408-6del (p.Gly470fs) des *MKS1*-Gens nachgewiesen werden. Die Mutationen segregierten bei den Eltern, bei dem gesunden Bruder wurden beide Mutationen nicht nachgewiesen. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig bestätigt werden, dass Mutationen des *MKS1*-Gens zukünftig auch als Ursache des/der JS/JSRD berücksichtigt werden müssen.

Bezüglich des eigenen Kollektivs sind quantitative Aussagen in Hinblick auf die Häufigkeiten einzelner klinischer Assoziationen der verschiedenen Formen, Mutationsverteilungen und Qualität der Mutationen aufgrund der jeweils geringen Fallzahlen nur eingeschränkt möglich. Dennoch lassen die o. g. Beispiele der eigenen Mutationsanalysen in Verbindung mit den ermittelten klinischen Daten und den zitierten Literaturdaten keinen Zweifel daran, dass keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation für die häufig von Mutationen betroffenen *MKS*-/*JBTS*-Gene existiert. Für die molekulargenetische Aufklärung der Patienten scheint eine phänotypbasierte Priorisierung der zu analysierenden Gene, wie sie vor allem für das/die JS/JSRD derzeit in der Literatur propagiert wird nicht mehr zeitgemäß (Parisi & Glass, 2003 [updated 2012]). Die Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit erstmalig Mutationen des *MKS1*-Gens als Ursache für das/die JS/JSRD nachgewiesen werden konnten, belegt dies. In der routinediagnostischen Laborpraxis sind darüber hinaus klinische Daten der Patienten zum einen nur bedingt verfügbar, zum anderen treten klinische Symptome mitunter erst im Verlauf der Erkrankung auf bzw. werden erst im Anschluss an die molekulargenetischen Analysen diagnostiziert. Als Beispiel seien hier vor allem Retinaveränderungen genannt, die bei 93 % der *BBS*-Patienten beschrieben wurden. Im eigenen Kollektiv wurden Retinaveränderungen jedoch lediglich bei 26,9 % der mutationstragenden *BBS*-Patienten angegeben. Ein rationaler Untersuchungsalgorithmus sollte diese Faktoren berücksichtigen

5.7. Algorithmus zur molekulargenetischen Aufklärung der Ziliopathien MKS, JS/JSRD und BBS

Das klassisch ausgeprägte BBS grenzt sich klinisch zu den Ziliopathien MKS und JS/JSRD ab. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation wird nicht beobachtet. Für eine pränatale Manifestation von Nierendysplasien ohne okzipitale Enzephalozele zeigen sich jedoch klinische Überlappungen zum MKS (*Meckel-Like*). Die Untersuchungen des eigenen Kollektivs belegen, dass neben den MKS-Genen und den bereits mit pränatalen Manifestationen beschriebenen Genen *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS10* auch die insgesamt ebenfalls häufig von Mutationen betroffenen Gene *BBS1* und *BBS12* analysiert werden müssen. Darüber hinaus wurden Mutationen des *MKS7*-Gens mit einem *Meckel-Like*-Phänotyp assoziiert (Bergmann et al, 2008).

Die bisher in der Literatur vor allem für das/die JS/JSRD postulierten Algorithmen zur molekulargenetischen Abklärung (Abbildung 5.2) auf der Basis klinischer Merkmale sollte durch ein zeitgemäßes Prozedere ersetzt werden.

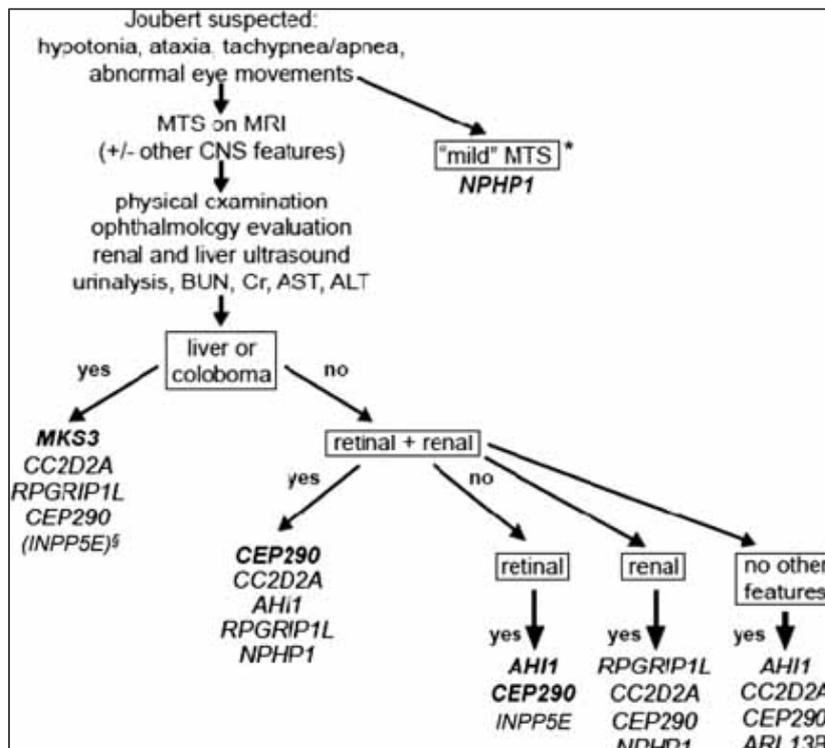


Abbildung 5.2: Aktuell in der Literatur vorgeschlagener molekulargenetischer Algorithmus für die Abklärung bei JS/JSRD nach klinischen Merkmalen (Parisi, 2009). (AHI1= JBTS3, ARL13B= JBTS8, CC2D2A= JBTS9, CEP290= JBTS5, INPP5E= JBTS1, NPHP1= JBTS4, RPGRIP1L= JBTS7)

5. Diskussion

Dies gilt vor allem vor dem Hintergrund:

- (1) der Entwicklung neuer Methoden zur parallelen Untersuchung von Genen (z.B. NGS), wie sie in dieser Arbeit zur Anwendung gekommen sind,
- (2) des Nachweises, dass etwa 40 % der JS-/JSRD-Patienten unabhängig vom klinischen Bild Mutationen in den vier Genen *JBTS3*, *JBTS5/MKS4*, *JBTS6/MKS3*, *JBTS9/MKS6* aufweisen, bei einer angenommenen Gesamtdetektionsrate von 50% für alle bisher bekannten Gene,
- (3) der praktischen Erfahrungen, dass im klinischen und labordiagnostischen Alltag nicht immer zeitgerecht die für ein phänotypbasiertes Vorgehen kritischen klinischen Informationen und Laborparameter zu einem Patienten zur Verfügung stehen,
- (4) der mitunter bestehenden Diskrepanz zwischen Zeitpunkt der Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen und Manifestationszeitpunkt zusätzlicher Symptome (Leberbeteiligung, Nierenbeteiligung, Retinabeteiligung),
- (5) der hier thematisierten zunehmend beschriebenen Abweichungen zur bis dato angenommenen Genotyp-Phänotyp-Korrelation.

Die klinische Charakterisierung der einbezogenen Patienten, die Effizienz und Sensitivität der eingesetzten Methoden sowie die ermittelten Daten zu Mutations-Häufigkeiten der bekannten Gene und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beeinflussen dabei als wesentlichen Faktoren die Validität des entsprechenden Algorithmus. Aus den eigenen Ergebnissen und den Literaturdaten lässt sich ableiten, dass durch Hochdurchsatz-Sequenzieretechnologien über genspezifische Anreicherungsverfahren derzeit eine höhere Sensitivität erreicht wird als durch Analysen des kompletten Exoms (Wooderchak-Donahue et al, 2012). Daher sind diese aktuell zunächst einer Gesamt-Exom-Analyse vorzuziehen, um Mutationen in den bekannten, häufig von Mutationen betroffenen Genen mit größtmöglicher Sicherheit auszuschließen.

Die im eigenen Kollektiv ermittelten SNP-Array-Daten lassen einen anderen Schluss bezüglich des diagnostischen Vorgehens bei blutsverwandten Patienten zu als der publizierte Vorschlag von F. S. Alkuraya. Hiernach sollte zunächst ein SNP-Array im Vorfeld weiterer Analysen durchgeführt werden um

5. Diskussion

Folgeuntersuchungen zu minimieren (Alkuraya, 2010). Die Daten des eigenen konsanguinen Kollektivs belegen, dass für das MKS und das/die JS/JSRD aufgrund der hohen Detektionsraten zunächst Mutationen in den häufig von Mutationen betroffenen Genen ausgeschlossen werden sollten, anschließend ist zumindest bei konsanguinen Familien eine SNP-Array-Analytik indiziert. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund des zunehmenden Einsatzes von neuen Sequenziertechnologien und der daraus resultierenden parallelisierten Gen-Analytik.

Der Stellenwert des kombinierten Einsatzes von SNP-Arrays und Hochdurchsatz-Technologien (bei blutsverwandten Familien) wird in Zukunft für die Diagnosefindung bei rezessiven Erkrankungen zunehmen. Dies gilt u. a. vor dem Hintergrund der zunehmend komplexeren genetischen Befunde aufgrund der Detektion zahlreicher Varianten von unklarer pathogenetischer Relevanz, wie sie beispielsweise bei Exom-Analysen auftreten. Die Einbeziehung von ROH-Daten in Verbindung mit Segregationsanalysen, bioinformatischen Validierungen und Datenbankinformationen erhöhen die Aussagekraft bezüglich der Pathogenität der Veränderungen. Darüber hinaus werden mit den derzeit angewendeten NGS-Verfahren und weiteren konventionellen Verfahren i. d. R. lediglich die kodierenden Bereiche der Gene untersucht, sodass weit intronisch gelegene Spleißmutationen nicht detektiert werden können (den Hollander et al, 2006). RNA-/cDNA-Analysen, die mitunter einen Nachweis von Spleißmutationen ermöglichen, sind jedoch aufwendig und können daher auch vor dem Hintergrund der Anzahl der zu analysierenden Gene nur schwer in die diagnostische Routine implementiert werden. In zwei Publikationen wurden Patienten berichtet, bei denen erst der Hinweis aus SNP-Array-Analysen auf größere ROH für bestimmte Loci und eine gezielte cDNA-Analytik in der Folge den Nachweis einer weit intronisch lokalisierten Spleißmutation ergab (Abu Safieh et al, 2010), (Alkuraya, 2010). Somit ermöglicht die Einbeziehung von SNP-Array-Daten in blutsverwandten Familien eine Erhöhung der Gesamtdetektionsraten.

Einen weiteren wesentlichen Vorteil des Einsatzes der neuen Sequenziertechnologien verdeutlichen ebenfalls die Daten des eigenen Kollektivs: Wie der Nachweis von *MKS1*-Mutationen bei JS/JSRD-Patienten zeigt, erlauben die neuen Technologien neue Hinweise auf Genotyp-Phänotyp-

5. Diskussion

Korrelationen. Darüber hinaus wird bei inkorrekt klinischer Verdachtsdiagnose oder bisher nicht beschriebenen phänotypischen Ausprägungen einer Erkrankung in Zukunft aufgrund der hypothesefreien Aussagekraft der Technologien eine molekulargenetische Aufklärung möglich (Nelen & Veltman, 2012). Abbildung 5.3 zeigt den Vorschlag eines Algorithmus zur Abklärung der syndromalen Ziliopathien MKS und JS/JSRD.

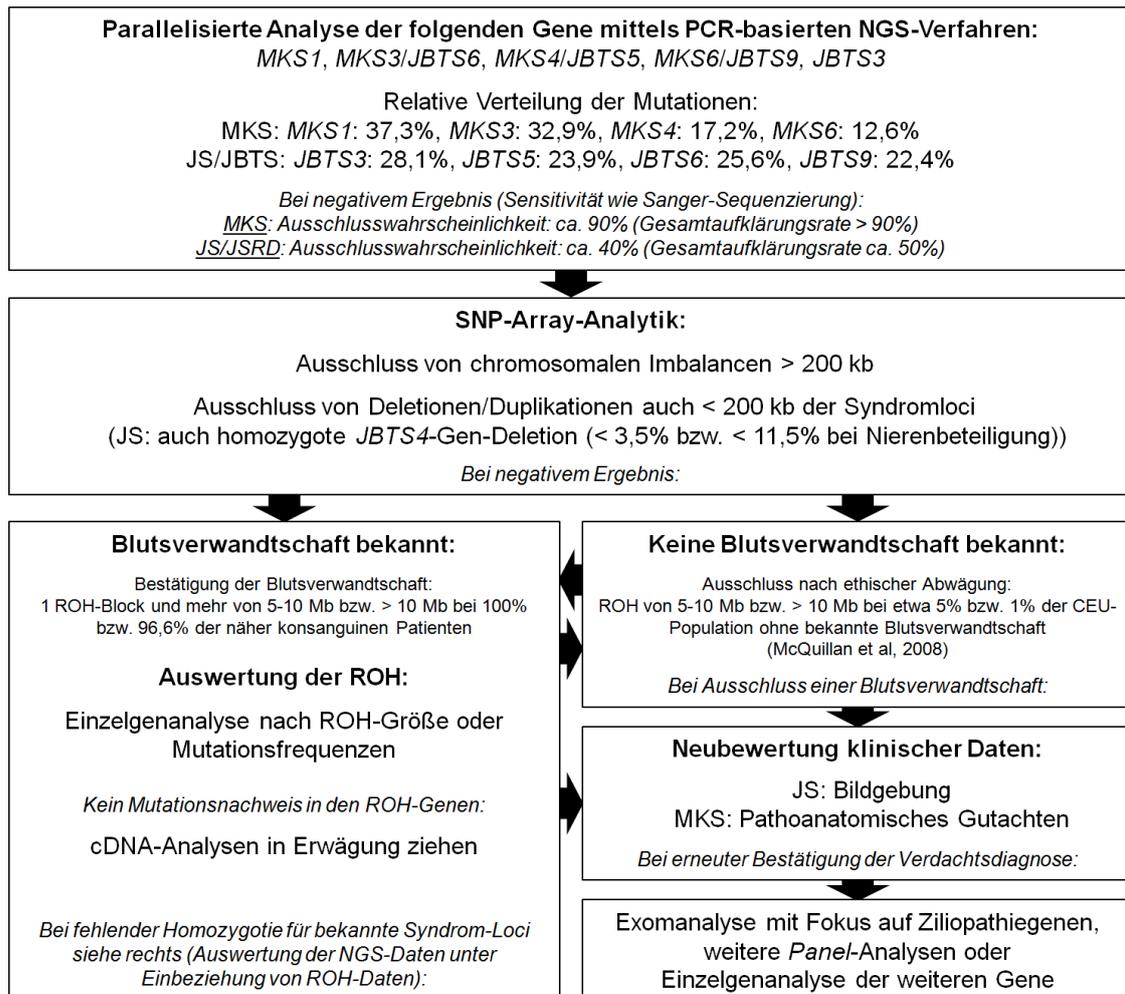


Abbildung 5.3: Vorschlag eines zeitgemäßen Algorithmus zur Abklärung der syndromalen Ziliopathien MKS und JS/JSRD. (ROH= mittels SNP-Array ermittelter Homozygotie-Block)

6. Zusammenfassung

Die autosomal-rezessiv erblichen Ziliopathien Meckel-Gruber-Syndrom (MKS), Joubert-Syndrom und assoziierte Erkrankungen (JS/JSRD) sowie das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) rücken aufgrund ihrer komplexen Genetik zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Allen gemein ist das Vorkommen der Genprodukte in den primären Zilien. Sowohl genetisch als auch klinisch zeigen die Erkrankungen Überlappungen, die die syndromale Einordnung erschweren. Vor dem Hintergrund eines optimierten Therapiemanagements der Patienten sowie der möglichen Option einer Pränataldiagnostik ist eine effiziente molekulargenetische Aufklärung von hoher Relevanz.

Die Entwicklung hochauflösender molekulargenetischer Verfahren sollte die Entwicklung eines zeitgemäßen molekularen Algorithmus zur Aufklärung der genannten Ziliopathien und der genetischen Syndromzuordnung ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die klinischen und molekulargenetischen Daten von 215 eigenen Ziliopathie-Familien erfasst und mit Literaturdaten verglichen.

Als Basis für einen diagnostischen Algorithmus wurden genspezifische Detektionsraten und Gesamtdetektionsraten zusammengestellt.

Vor dem Hintergrund der Heterogenie der Ziliopathie-Syndrome und dem gehäuften Vorkommen von blutsverwandten Familien wurde der Einsatz von (a) Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien (NGS) sowie von (b) SNP-Arrays zur Aufklärung der Erkrankungen etabliert bzw. validiert. Auf der Basis dieser Daten konnte ein komprimierter Algorithmus entwickelt werden.

Darüber hinaus sollte geprüft werden inwieweit die eigenen Kollektivdaten zu einer Neudefinition/Modifikation des klinischen Phänotyps der Syndrome beitragen können. Aufgrund der Seltenheit der einzelnen Entitäten sind quantitative Aussagen in Hinblick auf die Häufigkeiten einzelner klinischer Assoziationen der verschiedenen Formen und Mutationsverteilungen zwar nur eingeschränkt möglich, aber die Daten belegen, dass das Spektrum an Genen, welche mit einer pränatalen BBS-Manifestation (als *Meckel-Like* bezeichnet) assoziiert ist, um die Gene *BBS1* und *BBS12* erweitert werden muss. Darüber hinaus konnten durch die Untersuchung von JS-/JSRD-Patienten auf Mutationen des *MKS1*-Gens erstmalig für das/die JS/JSRD Mutationen in dem bis dato ausschließlich mit dem MKS assoziierten Gen nachgewiesen werden.

7. Literatur, alphabetisch

Abu Safieh L, Aldahmesh MA, Shamseldin H, Hashem M, Shaheen R, Alkuraya H, Al Hazzaa SA, Al-Rajhi A, Alkuraya FS (2010) Clinical and molecular characterisation of Bardet-Biedl syndrome in consanguineous populations: the power of homozygosity mapping. *J Med Genet* **47**: 236-241

Abu-Safieh L, Al-Anazi S, Al-Abdi L, Hashem M, Alkuraya H, Alamr M, Sirelkhatim MO, Al-Hassnan Z, Alkuraya B, Mohamed JY, Al-Salem A, Alrashed M, Fageih E, Softah A, Al-Hashem A, Wali S, Rahbeeni Z, Alsayed M, Khan AO, Al-Gazali L, Taschner PE, Al-Hazzaa S, Alkuraya FS (2012) In search of triallelism in Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* **20**: 420-427

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**: 248-249

Alkuraya FS (2010) Homozygosity mapping: one more tool in the clinical geneticist's toolbox. *Genet Med* **12**: 236-239

Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Kim JC, Ross AJ, Eichers ER, Teslovich TM, Mah AK, Johnsen RC, Cavender JC, Lewis RA, Leroux MR, Beales PL, Katsanis N (2003) Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* **425**: 628-633

Auber B, Burfeind P, Herold S, Schoner K, Simson G, Rauskolb R, Rehder H (2007) A disease causing deletion of 29 base pairs in intron 15 in the MKS1 gene is highly associated with the campomelic variant of the Meckel-Gruber syndrome. *Clin Genet* **72**: 454-459

Baala L, Audollent S, Martinovic J, Ozilou C, Babron MC, Sivanandamoorthy S, Saunier S, Salomon R, Gonzales M, Rattenberry E, Esculpavit C, Toutain A, Moraine C, Parent P, Marcocelles P, Dauge MC, Roume J, Le Merrer M, Meiner V, Meir K, Menez F, Beaufrère AM, Francannet C, Tantau J, Sinico M, Dumez Y, MacDonald F, Munnich A, Lyonnet S, Gubler MC, Génin E, Johnson CA, Vekemans M, Encha-Razavi F, Attié-Bitach T (2007a) Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* **81**: 170-179

Baala L, Romano S, Khaddour R, Saunier S, Smith UM, Audollent S, Ozilou C, Faivre L, Laurent N, Foliguet B, Munnich A, Lyonnet S, Salomon R, Encha-Razavi F, Gubler MC, Boddaert N, de Lonlay P, Johnson CA, Vekemans M, Antignac C, Attie-Bitach T (2007b) The Meckel-Gruber syndrome gene, MKS3, is mutated in Joubert syndrome. *Am J Hum Genet* **80**: 186-194

Bachmann-Gagescu R, Ishak GE, Dempsey JC, Adkins J, O'Day D, Phelps IG, Gunay-Aygun M, Kline AD, Szczaluba K, Martorell L, Alswaid A, Alrasheed S, Pai S, Izatt L, Ronan A, Parisi MA, Mefford H, Glass I, Doherty D (2012) Genotype-phenotype correlation in CC2D2A-related Joubert syndrome reveals an association with ventriculomegaly and seizures. *J Med Genet* **49**: 126-137

7. Literatur

Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006) The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 125-148

Bardet G (1920) Sur un syndrome d'obesite infantile a Sur un syndrome d'obesite infantile avec polydactylie et retinite pigmentaire (contribution a l'etude des formes cliniques de l'obesite hypophysaire). Paris

Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, Mein CA, Froguel P, Scambler PJ, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N (2003) Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* **72**: 1187-1199

Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flintner FA (1999) New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* **36**: 437-446

Bergmann C, Fliegau M, Bröchle NO, Frank V, Olbrich H, Kirschner J, Schermer B, Schmedding I, Kispert A, Kränzlin B, Nürnberg G, Becker C, Grimm T, Girschick G, Lynch SA, Kelehan P, Senderek J, Neuhaus TJ, Stallmach T, Zentgraf H, Nürnberg P, Gretz N, Lo C, Lienkamp S, Schäfer T, Walz G, Benzing T, Zerres K, Omran H (2008) Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am J Hum Genet* **82**: 959-970

Biedl A (1922) Ein Geschwisterpaar mit adiposo-genitaler Dystrophie. *Dtsch Med Wschr* **48**: 1630

Billingsley G, Bin J, Fieggen KJ, Duncan JL, Gerth C, Ogata K, Wodak SS, Traboulsi EI, Fishman GA, Paterson A, Chitayat D, Knueppel T, Millán JM, Mitchell GA, Deveault C, Héon E (2010) Mutations in chaperonin-like BBS genes are a major contributor to disease development in a multiethnic Bardet-Biedl syndrome patient population. *J Med Genet* **47**: 453-463

Bittles A (2001) Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clin Genet* **60**: 89-98

Bluett NH, Chantler C, Singer JD, Saxton HM (1977) Congenital renal abnormalities in the Laurence-Moon-Biedl syndrome. *Arch Dis Child* **52**: 968-970

Boltshauser E, Isler W (1977) Joubert syndrome: episodic hyperpnea, abnormal eye movements, retardation and ataxia, associated with dysplasia of the cerebellar vermis. *Neuropadiatrie* **8**: 57-66

Boycott KM, Parboosingh JS, Scott JN, McLeod DR, Greenberg CR, Fujiwara TM, Mah JK, Midgley J, Wade A, Bernier FP, Chodirker BN, Bunge M, Innes AM (2007) Meckel syndrome in the Hutterite population is actually a Joubert-related cerebello-oculo-renal syndrome. *Am J Med Genet A* **143A**: 1715-1725

7. Literatur

Brancati F, Barrano G, Silhavy JL, Marsh SE, Travaglini L, Bielas SL, Amorini M, Zablocka D, Kayserili H, Al-Gazali L, Bertini E, Boltshauser E, D'Hooghe M, Fazzi E, Fenerci EY, Hennekam RC, Kiss A, Lees MM, Marco E, Phadke SR, Rigoli L, Romano S, Salpietro CD, Sherr EH, Signorini S, Stromme P, Stuart B, Sztriha L, Viskochil DH, Yuksel A, Dallapiccola B, Valente EM, Gleeson JG, Group IJS (2007) CEP290 mutations are frequently identified in the oculo-renal form of Joubert syndrome-related disorders. *Am J Hum Genet* **81**: 104-113

Brancati F, Iannicelli M, Travaglini L, Mazzotta A, Bertini E, Boltshauser E, D'Arrigo S, Emma F, Fazzi E, Gallizzi R, Gentile M, Loncarevic D, Mejaski-Bosnjak V, Pantaleoni C, Rigoli L, Salpietro CD, Signorini S, Stringini GR, Verloes A, Zablocka D, Dallapiccola B, Gleeson JG, Valente EM, Group IJS (2009) MKS3/TMEM67 mutations are a major cause of COACH Syndrome, a Joubert Syndrome related disorder with liver involvement. *Hum Mutat* **30**: E432-442

Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S (1991) Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol* **220**: 49-65

Caliebe A, Kroes HY, van der Smagt JJ, Martin-Subero JI, Tönnies H, van 't Slot R, Nievelstein RA, Muhle H, Stephani U, Alfke K, Stefanova I, Hellenbroich Y, Gillissen-Kaesbach G, Hochstenbach R, Siebert R, Poot M (2010) Four patients with speech delay, seizures and variable corpus callosum thickness sharing a 0.440 Mb deletion in region 1q44 containing the HNRPU gene. *Eur J Med Genet* **53**: 179-185

Caridi G, Dagnino M, Rossi A, Valente EM, Bertini E, Fazzi E, Emma F, Murer L, Verrina E, Ghiggeri GM (2006) Nephronophthisis type 1 deletion syndrome with neurological symptoms: prevalence and significance of the association. *Kidney Int* **70**: 1342-1347

Chance PF, Cavalier L, Satran D, Pellegrino JE, Koenig M, Dobyns WB (1999) Clinical nosologic and genetic aspects of Joubert and related syndromes. *J Child Neurol* **14**: 660-666; discussion 669-672

Consugar MB, Kubly VJ, Lager DJ, Hommerding CJ, Wong WC, Bakker E, Gattone VH, Torres VE, Breuning MH, Harris PC (2007) Molecular diagnostics of Meckel-Gruber syndrome highlights phenotypic differences between MKS1 and MKS3. *Hum Genet* **121**: 591-599

Coppieters F, Casteels I, Meire F, De Jaegere S, Hooghe S, van Regemorter N, Van Esch H, Matuleviciene A, Nunes L, Meersschaut V, Walraedt S, Standaert L, Coucke P, Hoeben H, Kroes HY, Vande Walle J, de Ravel T, Leroy BP, De Baere E (2010a) Genetic screening of LCA in Belgium: predominance of CEP290 and identification of potential modifier alleles in AH11 of CEP290-related phenotypes. *Hum Mutat* **31**: E1709-1766

Coppieters F, Lefever S, Leroy BP, De Baere E (2010b) CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. *Hum Mutat* **31**: 1097-1108

7. Literatur

De Haene A (1955) Partial familial agenesis of the vermis cerebelli. *Acta Neurol Psychiatr Belg* **55**: 622-628

den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voeselek KE, Zonneveld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van den Born LI, Rohrschneider K, Cremers FP (2006) Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* **79**: 556-561

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* **37**: e67

Deveault C, Billingsley G, Duncan JL, Bin J, Theal R, Vincent A, Fieggen KJ, Gerth C, Noordeh N, Traboulsi EI, Fishman GA, Chitayat D, Knueppel T, Millán JM, Munier FL, Kennedy D, Jacobson SG, Innes AM, Mitchell GA, Boycott K, Héon E (2011) BBS genotype-phenotype assessment of a multiethnic patient cohort calls for a revision of the disease definition. *Hum Mutat* **32**: 610-619

Dutcher SK (1995) Flagellar assembly in two hundred and fifty easy-to-follow steps. *Trends Genet* **11**: 398-404

Edvardson S, Shaag A, Zenvirt S, Erlich Y, Hannon GJ, Shanske AL, Gomori JM, Ekstein J, Elpeleg O (2010) Joubert syndrome 2 (JBTS2) in Ashkenazi Jews is associated with a TMEM216 mutation. *Am J Hum Genet* **86**: 93-97

Fischer C, Trajanoski S, Papić L, Windpassinger C, Bernert G, Freilinger M, Schabhüttl M, Arslan-Kirchner M, Javaher-Haghighi P, Plecko B, Senderek J, Rauscher C, Löscher WN, Pieber TR, Janecke AR, Auer-Grumbach M (2012) SNP array-based whole genome homozygosity mapping as the first step to a molecular diagnosis in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol* **259**: 515-523

Fiskerstrand T, Houge G, Sund S, Scheie D, Leh S, Boman H, Knappskog PM (2010) Identification of a gene for renal-hepatic-pancreatic dysplasia by microarray-based homozygosity mapping. *J Mol Diagn* **12**: 125-131

Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**: 767-773

Frank V, den Hollander AI, Brüchele NO, Zonneveld MN, Nürnberg G, Becker C, Du Bois G, Kendziorra H, Roosing S, Senderek J, Nürnberg P, Cremers FP, Zerres K, Bergmann C (2008) Mutations of the CEP290 gene encoding a centrosomal protein cause Meckel-Gruber syndrome. *Hum Mutat* **29**: 45-52

Frank V, Ortiz Brüchele N, Mager S, Frints SG, Bohring A, du Bois G, Debatin I, Seidel H, Senderek J, Besbas N, Todt U, Kubisch C, Grimm T, Teksen F, Balci S, Zerres K, Bergmann C (2007) Aberrant splicing is a common mutational mechanism in MKS1, a key player in Meckel-Gruber syndrome. *Hum Mutat* **28**: 638-639

7. Literatur

Fraser FC, Lytwyn A (1981) Spectrum of anomalies in the Meckel syndrome, or: "Maybe there is a malformation syndrome with at least one constant anomaly". *Am J Med Genet* **9**: 67-73

Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N (2009) The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* **137**: 32-45

Goetz SC, Anderson KV (2010) The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* **11**: 331-344

Gruber GB (1934) Beitrage zur Frage "gekoppelter" Missbildungen (Akrocephalosyndaktylie und Dysencephalia splanchnocystica). *Beitr path Anat* **93**: 459-476

Gunay-Aygun M, Parisi MA, Doherty D, Tuchman M, Tsilou E, Kleiner DE, Huizing M, Turkbey B, Choyke P, Guay-Woodford L, Heller T, Szymanska K, Johnson CA, Glass I, Gahl WA (2009) MKS3-related ciliopathy with features of autosomal recessive polycystic kidney disease, nephronophthisis, and Joubert Syndrome. *J Pediatr* **155**: 386-392.e381

Haider NB, Carmi R, Shalev H, Sheffield VC, Landau D (1998) A Bedouin kindred with infantile nephronophthisis demonstrates linkage to chromosome 9 by homozygosity mapping. *Am J Hum Genet* **63**: 1404-1410

Hakverdi S, Güzelmansur I, Sayar H, Arif G, Hakverdi AU, Toprakli S (2010) MECKEL-GRUBER SYNDROME: A Report of Three Cases. *Perinatal Journal* **18**: 59-63

Harville HM, Held S, Diaz-Font A, Davis EE, Diplas BH, Lewis RA, Borochowitz ZU, Zhou W, Chaki M, MacDonald J, Kayserili H, Beales PL, Katsanis N, Otto E, Hildebrandt F (2010) Identification of 11 novel mutations in eight BBS genes by high-resolution homozygosity mapping. *J Med Genet* **47**: 262-267

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**: 1026-1030

Hildebrandt F, Otto E, Rensing C, Nothwang HG, Vollmer M, Adolphs J, Hanusch H, Brandis M (1997) A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat Genet* **17**: 149-153

Hoefele J, Wolf MT, O'Toole JF, Otto EA, Schultheiss U, Dêschenes G, Attanasio M, Utsch B, Antignac C, Hildebrandt F (2007) Evidence of oligogenic inheritance in nephronophthisis. *J Am Soc Nephrol* **18**: 2789-2795

Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, Huang BQ, Leontovich AA, Beito TG, Madden BJ, Charlesworth MC, Torres VE, LaRusso NF, Harris PC, Ward CJ (2009) Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *J Am Soc Nephrol* **20**: 278-288

7. Literatur

Hou X, Mrug M, Yoder BK, Lefkowitz EJ, Kremmidiotis G, D'Eustachio P, Beier DR, Guay-Woodford LM (2002) Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest* **109**: 533-540

Iannicelli M, Brancati F, Mougou-Zerelli S, Mazzotta A, Thomas S, Elkhartoufi N, Travaglini L, Gomes C, Ardissino GL, Bertini E, Boltshauser E, Castorina P, D'Arrigo S, Fischetto R, Leroy B, Loget P, Bonnière M, Starck L, Tantau J, Gentilin B, Majore S, Swistun D, Flori E, Lalatta F, Pantaleoni C, Penzien J, Grammatico P, Dallapiccola B, Gleeson JG, Attie-Bitach T, Valente EM, Group IJS (2010) Novel TMEM67 mutations and genotype-phenotype correlates in meckelin-related ciliopathies. *Hum Mutat* **31**: E1319-1331

Ivemark BI, Oldfelt V, Zetterstrom R (1959) Familial dysplasia of kidneys, liver and pancreas: a probably genetically determined syndrome. *Acta Paediatr* **48**: 1-11

Janssen S, Ramaswami G, Davis EE, Hurd T, Airik R, Kasanuki JM, Van Der Kraak L, Allen SJ, Beales PL, Katsanis N, Otto EA, Hildebrandt F (2011) Mutation analysis in Bardet-Biedl syndrome by DNA pooling and massively parallel resequencing in 105 individuals. *Hum Genet* **129**: 79-90

Joubert M, Eisenring JJ, Robb JP, Andermann F (1969) Familial agenesis of the cerebellar vermis. A syndrome of episodic hyperpnea, abnormal eye movements, ataxia, and retardation. *Neurology* **19**: 813-825

Karmous-Benailly H, Martinovic J, Gubler MC, Sirot Y, Clech L, Ozilou C, Auge J, Brahimi N, Etchevers H, Detrait E, Esculpavit C, Audollent S, Goudefroye G, Gonzales M, Tantau J, Loget P, Joubert M, Gaillard D, Jeanne-Pasquier C, Delezoide AL, Peter MO, Plessis G, Simon-Bouy B, Dollfus H, Le Merrer M, Munnich A, Encha-Razavi F, Vekemans M, Attié-Bitach T (2005) Antenatal presentation of Bardet-Biedl syndrome may mimic Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* **76**: 493-504

Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR (2001) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* **293**: 2256-2259

Katsanis N, Beales PL, Woods MO, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Ansley SJ, Davidson WS, Lupski JR (2000) Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* **26**: 67-70

Keeler LC, Marsh SE, Leeflang EP, Woods CG, Sztriha L, Al-Gazali L, Gururaj A, Gleeson JG (2003) Linkage analysis in families with Joubert syndrome plus oculo-renal involvement identifies the CORS2 locus on chromosome 11p12-q13.3. *Am J Hum Genet* **73**: 656-662

Khaddour R, Smith U, Baala L, Martinovic J, Clavering D, Shaffiq R, Ozilou C, Cullinane A, Kyttälä M, Shalev S, Audollent S, d'Humières C, Kadhom N,

7. Literatur

Esculpavit C, Viot G, Boone C, Oien C, Encha-Razavi F, Batman PA, Bennett CP, Woods CG, Roume J, Lyonnet S, Génin E, Le Merrer M, Munnich A, Gubler MC, Cox P, Macdonald F, Vekemans M, Johnson CA, Attié-Bitach T, Foetopathologie) SSFd (2007) Spectrum of MKS1 and MKS3 mutations in Meckel syndrome: a genotype-phenotype correlation. Mutation in brief #960. Online. *Hum Mutat* **28**: 523-524

Kroes HY, Hochstenbach R, Nievelstein RA, Den Hollander AI, Lugtenberg DT, Van Nieuwenhuizen O, Lindhout D, Poot M (2011) Chromosomal abnormalities resembling Joubert syndrome: two cases illustrating the diagnostic pitfalls. *Clin Dysmorphol* **20**: 136-142

Kumar S, Mahajan BB, Mittal J (2012) Bardet-Biedl syndrome: a rare case report from North India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **78**: 228

Kwitek-Black AE, Carmi R, Duyk GM, Buetow KH, Elbedour K, Parvari R, Yandava CN, Stone EM, Sheffield VC (1993) Linkage of Bardet-Biedl syndrome to chromosome 16q and evidence for non-allelic genetic heterogeneity. *Nat Genet* **5**: 392-396

Kyttälä M, Tallila J, Salonen R, Kopra O, Kohlschmidt N, Paavola-Sakki P, Peltonen L, Kestilä M (2006) MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel syndrome. *Nat Genet* **38**: 155-157

Laurence J, Moon R (1866) Four cases of retinitis pigmentosa occurring in the same family accompanied by general imperfection of development. *Ophthalmol Rev* **2**: 32-41

Laurier V, Stoetzel C, Muller J, Thibault C, Corbani S, Jalkh N, Salem N, Chouery E, Poch O, Licaire S, Danse JM, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Mégarbané A, Mandel JL, Dollfus H (2006) Pitfalls of homozygosity mapping: an extended consanguineous Bardet-Biedl syndrome family with two mutant genes (BBS2, BBS10), three mutations, but no triallelism. *Eur J Hum Genet* **14**: 1195-1203

Leitch CC, Zaghloul NA, Davis EE, Stoetzel C, Diaz-Font A, Rix S, Alfadhel M, Al-Fadhel M, Lewis RA, Eyaid W, Banin E, Dollfus H, Beales PL, Badano JL, Katsanis N (2008) Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* **40**: 443-448

Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* **30**: 434-439

Mardis ER (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* **24**: 133-141

Maria BL, Hoang KB, Tusa RJ, Mancuso AA, Hamed LM, Quisling RG, Hove MT, Fennell EB, Booth-Jones M, Ringdahl DM, Yachnis AT, Creel G, Frerking B

7. Literatur

(1997) "Joubert syndrome" revisited: key ocular motor signs with magnetic resonance imaging correlation. *J Child Neurol* **12**: 423-430

McQuillan R, Leutenegger AL, Abdel-Rahman R, Franklin CS, Pericic M, Barac-Lauc L, Smolej-Narancic N, Janicijevic B, Polasek O, Tenesa A, Macleod AK, Farrington SM, Rudan P, Hayward C, Vitart V, Rudan I, Wild SH, Dunlop MG, Wright AF, Campbell H, Wilson JF (2008) Runs of homozygosity in European populations. *Am J Hum Genet* **83**: 359-372

Meckel F (1822) Beschreibung zweier, durch sehr aehnliche Bildungsabweichungen entstellter Geschwister. *Dtsch Arch Physiol* **7**: 99-172

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215

Moore SJ, Green JS, Fan Y, Bhogal AK, Dicks E, Fernandez BA, Stefanelli M, Murphy C, Cramer BC, Dean JC, Beales PL, Katsanis N, Bassett AS, Davidson WS, Parfrey PS (2005) Clinical and genetic epidemiology of Bardet-Biedl syndrome in Newfoundland: a 22-year prospective, population-based, cohort study. *Am J Med Genet A* **132**: 352-360

Moortgat S, Verellen-Dumoulin C, Maystadt I, Parmentier B, Grisart B, Hennecker JL, Destree A (2011) Developmental delay and facial dysmorphism in a child with an 8.9 Mb de novo interstitial deletion of 3q25.1-q25.32: Genotype-phenotype correlations of chromosome 3q25 deletion syndrome. *Eur J Med Genet* **54**: 177-180

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**: 954-958, 960, 962

Mougou-Zerelli S, Thomas S, Szenker E, Audollent S, Elkhartoufi N, Babarit C, Romano S, Salomon R, Amiel J, Esculpavit C, Gonzales M, Escudier E, Leheup B, Loget P, Odent S, Roume J, Gérard M, Delezoide AL, Khung S, Patrier S, Cordier MP, Bouvier R, Martinovic J, Gubler MC, Boddaert N, Munnich A, Encha-Razavi F, Valente EM, Saad A, Saunier S, Vekemans M, Attié-Bitach T (2009) CC2D2A mutations in Meckel and Joubert syndromes indicate a genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat* **30**: 1574-1582

Muller J, Stoetzel C, Vincent MC, Leitch CC, Laurier V, Danse JM, Hellé S, Marion V, Bennouna-Greene V, Vicaire S, Megarbane A, Kaplan J, Drouin-Garraud V, Hamdani M, Sigaudy S, Francannet C, Roume J, Bitoun P, Goldenberg A, Philip N, Odent S, Green J, Cossée M, Davis EE, Katsanis N, Bonneau D, Verloes A, Poch O, Mandel JL, Dollfus H (2010) Identification of 28 novel mutations in the Bardet-Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease. *Hum Genet* **127**: 583-593

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273

7. Literatur

Nelen M, Veltman JA (2012) Genome and exome sequencing in the clinic: unbiased genomic approaches with a high diagnostic yield. *Pharmacogenomics* **13**: 511-514

Opitz J, Howe J (1969) The Meckel syndrome (dysencephalia splanchnocystica, the Gruber syndrome). *Birth Defects* **2**: 167–179

Otto EA, Helou J, Allen SJ, O'Toole JF, Wise EL, Ashraf S, Attanasio M, Zhou W, Wolf MT, Hildebrandt F (2008) Mutation analysis in nephronophthisis using a combined approach of homozygosity mapping, CEL I endonuclease cleavage, and direct sequencing. *Hum Mutat* **29**: 418-426

Otto EA, Ramaswami G, Janssen S, Chaki M, Allen SJ, Zhou W, Airik R, Hurd TW, Ghosh AK, Wolf MT, Hoppe B, Neuhaus TJ, Bockenhauer D, Milford DV, Soliman NA, Antignac C, Saunier S, Johnson CA, Hildebrandt F, Group GS (2011) Mutation analysis of 18 nephronophthisis associated ciliopathy disease genes using a DNA pooling and next generation sequencing strategy. *J Med Genet* **48**: 105-116

Otto EA, Tory K, Attanasio M, Zhou W, Chaki M, Paruchuri Y, Wise EL, Wolf MT, Utsch B, Becker C, Nürnberg G, Nürnberg P, Nayir A, Saunier S, Antignac C, Hildebrandt F (2009) Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11). *J Med Genet* **46**: 663-670

Paavola P, Salonen R, Baumer A, Schinzel A, Boyd PA, Gould S, Meusburger H, Tenconi R, Barnicoat A, Winter R, Peltonen L (1997) Clinical and genetic heterogeneity in Meckel syndrome. *Hum Genet* **101**: 88-92

Paavola P, Salonen R, Weissenbach J, Peltonen L (1995) The locus for Meckel syndrome with multiple congenital anomalies maps to chromosome 17q21-q24. *Nat Genet* **11**: 213-215

Papić L, Fischer D, Trajanoski S, Höftberger R, Fischer C, Ströbel T, Schmidt WM, Bittner RE, Schabhüttl M, Gruber K, Pieber TR, Janecke AR, Auer-Grumbach M (2011) SNP-array based whole genome homozygosity mapping: a quick and powerful tool to achieve an accurate diagnosis in LGMD2 patients. *Eur J Med Genet* **54**: 214-219

Parisi M, Glass I (2003 [updated 2012]) Joubert Syndrome and Related Disorders. In *GeneReviews*, Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP (eds). Seattle WA: University of Washington, Seattle

Parisi MA (2009) Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **151C**: 326-340

Parisi MA, Bennett CL, Eckert ML, Dobyys WB, Gleeson JG, Shaw DW, McDonald R, Eddy A, Chance PF, Glass IA (2004) The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. *Am J Hum Genet* **75**: 82-91

7. Literatur

Parisi MA, Doherty D, Chance PF, Glass IA (2007) Joubert syndrome (and related disorders) (OMIM 213300). *Eur J Hum Genet* **15**: 511-521

Parisi MA, Doherty D, Eckert ML, Shaw DW, Ozyurek H, Aysun S, Giray O, Al Swaid A, Al Shahwan S, Dohayan N, Bakhsh E, Indridason OS, Dobyns WB, Bennett CL, Chance PF, Glass IA (2006) AHI1 mutations cause both retinal dystrophy and renal cystic disease in Joubert syndrome. *J Med Genet* **43**: 334-339

Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seeley ES, Rosenbaum JL, Witman GB, Cole DG (2000) Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* **151**: 709-718

Pemberton TJ, Absher D, Feldman MW, Myers RM, Rosenberg NA, Li JZ (2012) Genomic patterns of homozygosity in worldwide human populations. *Am J Hum Genet* **91**: 275-292

Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1985) Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues: a cellular cybernetic probe? *Cell Motil* **5**: 175-193

Putoux A, Mougou-Zerelli S, Thomas S, Elkhartoufi N, Audollent S, Le Merrer M, Lachmeijer A, Sigaudy S, Buenerd A, Fernandez C, Delezoide AL, Gubler MC, Salomon R, Saad A, Cordier MP, Vekemans M, Bouvier R, Attie-Bitach T (2010) BBS10 mutations are common in 'Meckel'-type cystic kidneys. *J Med Genet* **47**: 848-852

Rea G, McCullough S, McNerlan S, Craig B, Morrison PJ (2010) Delineation of a recognisable phenotype of interstitial deletion 3 (q22.3q25.1) in a case with previously unreported truncus arteriosus. *Eur J Med Genet* **53**: 162-167

Redin C, Le Gras S, Mhamdi O, Geoffroy V, Stoetzel C, Vincent MC, Chiurazzi P, Lacombe D, Ouertani I, Petit F, Till M, Verloes A, Jost B, Chaabouni HB, Dollfus H, Mandel JL, Muller J (2012) Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alström syndromes. *J Med Genet* **49**: 502-512

Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D (1997) Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* **4**: 311-323

Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**: 363, 365

Rosenbaum JL, Witman GB (2002) Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 813-825

Saar K, Al-Gazali L, Sztriha L, Rueschendorf F, Nur-E-Kamal M, Reis A, Bayoumi R (1999) Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* **65**: 1666-1671

7. Literatur

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491

Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **94**: 441-448

Schaaf CP, Scott DA, Wiszniewska J, Beaudet AL (2011) Identification of incestuous parental relationships by SNP-based DNA microarrays. *Lancet* **377**: 555-556

Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D (2010) MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* **7**: 575-576

Slavotinek AM, Stone EM, Mykytyn K, Heckenlively JR, Green JS, Heon E, Musarella MA, Parfrey PS, Sheffield VC, Biesecker LG (2000) Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* **26**: 15-16

Solis-Cohen S, Weiss E (1925) Dystrophia adopogenitalis with atypical retinitis pigmentosa and mental deficiency: the Laurence-Biedl syndrome a report of four cases in one family. *Am J Med Sci* **169**: 489-505

Sorokin SP (1968) Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci* **3**: 207-230

Sudha T, Dawson AJ, Prasad AN, Konkin D, de Groot GW, Prasad C (2001) De novo interstitial long arm deletion of chromosome 3 with facial dysmorphism, Dandy-Walker variant malformation and hydrocephalus. *Clin Dysmorphol* **10**: 193-196

Tallila J (2009) Molecular Genetics Of Meckel Syndrome - Ciliary Genes Are Defective In MKS. Helsinki

Tallila J, Salonen R, Kohlschmidt N, Peltonen L, Kestilä M (2009) Mutation spectrum of Meckel syndrome genes: one group of syndromes or several distinct groups? *Hum Mutat* **30**: E813-830

Taulman PD, Haycraft CJ, Balkovetz DF, Yoder BK (2001) Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* **12**: 589-599

Tory K, Lacoste T, Burglen L, Morinière V, Boddaert N, Macher MA, Llanas B, Nivet H, Bensman A, Niaudet P, Antignac C, Salomon R, Saunier S (2007) High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations. *J Am Soc Nephrol* **18**: 1566-1575

Travaglini L, Brancati F, Attie-Bitach T, Audollent S, Bertini E, Kaplan J, Perrault I, Iannicelli M, Mancuso B, Rigoli L, Rozet JM, Swistun D, Tolentino J,

7. Literatur

Dallapiccola B, Gleeson JG, Valente EM, Zankl A, Leventer R, Grattan-Smith P, Janecke A, D'Hooghe M, Sznajer Y, Van Coster R, Demerleir L, Dias K, Moco C, Moreira A, Kim CA, Maegawa G, Petkovic D, Abdel-Salam GM, Abdel-Aleem A, Zaki MS, Marti I, Quijano-Roy S, Sigaudy S, de Lonlay P, Romano S, Touraine R, Koenig M, Lagier-Tourenne C, Messer J, Collignon P, Wolf N, Philippi H, Kitsiou Tzeli S, Halldorsson S, Johannsdottir J, Ludvigsson P, Phadke SR, Udani V, Stuart B, Magee A, Lev D, Michelson M, Ben-Zeev B, Fischetto R, Benedicenti F, Stanzial F, Borgatti R, Accorsi P, Battaglia S, Fazzi E, Giordano L, Pinelli L, Boccone L, Bigoni S, Ferlini A, Donati MA, Caridi G, Divizia MT, Faravelli F, Ghiggeri G, Pessagno A, Briguglio M, Briuglia S, Salpietro CD, Tortorella G, Adami A, Castorina P, Lalatta F, Marra G, Riva D, Scelsa B, Spaccini L, Uziel G, Del Giudice E, Laverda AM, Ludwig K, Permunion A, Suppiej A, Signorini S, Uggetti C, Battini R, Di Giacomo M, Cilio MR, Di Sabato ML, Leuzzi V, Parisi P, Pollazzon M, Silengo M, De Vescovi R, Greco D, Romano C, Cazzagon M, Simonati A, Al-Tawari AA, Bastaki L, Mégarbané A, Sabolic Avramovska V, de Jong MM, Stromme P, Koul R, Rajab A, Azam M, Barbot C, Martorell Sampol L, Rodriguez B, Pascual-Castroviejo I, Teber S, Anlar B, Comu S, Karaca E, Kayserili H, Yüksel A, Akcakus M, Al Gazali L, Sztriha L, Nicholl D, Woods CG, Bennett C, Hurst J, Sheridan E, Barnicoat A, Hennekam R, Lees M, Blair E, Bernes S, Sanchez H, Clark AE, DeMarco E, Donahue C, Sherr E, Hahn J, Sanger TD, Gallager TE, Dobyns WB, Daugherty C, Krishnamoorthy KS, Sarco D, Walsh CA, McKanna T, Milisa J, Chung WK, De Vivo DC, Raynes H, Schubert R, Seward A, Brooks DG, Goldstein A, Caldwell J, Finsecke E, Maria BL, Holden K, Cruse RP, Swoboda KJ, Viskochil D, Group IJS (2009) Expanding CEP290 mutational spectrum in ciliopathies. *Am J Med Genet A* **149A**: 2173-2180

Valente EM, Brancati F, Boltshauser E, Dallapiccola B (2011) Clinical utility gene card for: Joubert syndrome. *Eur J Hum Genet* **19**

Valente EM, Brancati F, Dallapiccola B (2008) Genotypes and phenotypes of Joubert syndrome and related disorders. *Eur J Med Genet* **51**: 1-23

Valente EM, Brancati F, Silhavy JL, Castori M, Marsh SE, Barrano G, Bertini E, Boltshauser E, Zaki MS, Abdel-Aleem A, Abdel-Salam GM, Bellacchio E, Battini R, Cruse RP, Dobyns WB, Krishnamoorthy KS, Lagier-Tourenne C, Magee A, Pascual-Castroviejo I, Salpietro CD, Sarco D, Dallapiccola B, Gleeson JG, Group IJS (2006a) AHI1 gene mutations cause specific forms of Joubert syndrome-related disorders. *Ann Neurol* **59**: 527-534

Valente EM, Salpietro DC, Brancati F, Bertini E, Galluccio T, Tortorella G, Briuglia S, Dallapiccola B (2003) Description, nomenclature, and mapping of a novel cerebello-renal syndrome with the molar tooth malformation. *Am J Hum Genet* **73**: 663-670

Valente EM, Silhavy JL, Brancati F, Barrano G, Krishnaswami SR, Castori M, Lancaster MA, Boltshauser E, Boccone L, Al-Gazali L, Fazzi E, Signorini S, Louie CM, Bellacchio E, Bertini E, Dallapiccola B, Gleeson JG, Group IJSRDS (2006b) Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet* **38**: 623-625

7. Literatur

- van Reeuwijk J, Arts HH, Roepman R (2011) Scrutinizing ciliopathies by unraveling ciliary interaction networks. *Hum Mol Genet* **20**: R149-157
- Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashthiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE, Harris PC (2003) Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* **12**: 2703-2710
- Waters AM, Beales PL (1993) Bardet-Biedl Syndrome. In *GeneReviews*, Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP (eds). Seattle WA: University of Washington, Seattle
- Waters AM, Beales PL (1993 [updated 2011]) Bardet-Biedl Syndrome. In *GeneReviews*, Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP (eds). Seattle WA: University of Washington, Seattle
- Weis JH, Tan SS, Martin BK, Wittwer CT (1992) Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet* **8**: 263-264
- Williams CL, Masyukova SV, Yoder BK (2010) Normal ciliogenesis requires synergy between the cystic kidney disease genes MKS-3 and NPHP-4. *J Am Soc Nephrol* **21**: 782-793
- Wooderchak-Donahue WL, O'Fallon BD, Furtado LV, Durtschi JD, Plant P, Ridge PG, Rope AF, Yetman AT, Bayrak-Toydemir P (2012) A direct comparison of next generation sequencing enrichment methods using an aortopathy gene panel- clinical diagnostics perspective. *BMC Med Genomics* **5**: 50
- Woods CG, Cox J, Springell K, Hampshire DJ, Mohamed MD, McKibbin M, Stern R, Raymond FL, Sandford R, Malik Sharif S, Karbani G, Ahmed M, Bond J, Clayton D, Inglehearn CF (2006) Quantification of homozygosity in consanguineous individuals with autosomal recessive disease. *Am J Hum Genet* **78**: 889-896
- Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM (2002) The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* **13**: 2508-2516
- Zaghloul NA, Katsanis N (2010) Functional modules, mutational load and human genetic disease. *Trends Genet* **26**: 168-176
- Zhang MZ, Mai W, Li C, Cho SY, Hao C, Moeckel G, Zhao R, Kim I, Wang J, Xiong H, Wang H, Sato Y, Wu Y, Nakanuma Y, Lilova M, Pei Y, Harris RC, Li S, Coffey RJ, Sun L, Wu D, Chen XZ, Breyer MD, Zhao ZJ, McKanna JA, Wu G (2004) PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2311-2316

8. Anhang

Tabelle A1: Klinische Daten der MKS-Kollektiv-Patienten (Indikation: Klinischer Verdacht auf MKS).

(KI)= Keine Information vorhanden, A= Abbruch oder Abort, ASZA= Andere assoziierte zerebrale Anomalien, C/C= Cousin und Cousine, Chrom. Befund= Chromosomaler Befund, CNV= Kopienzahavarante, Del= Deletion, Dup= Duplikation, DWM= Dandy-Walker-Malformation, Inv= Inversion, Ko.= Konsanguinität, DPM= Duktalplattenmalformation, li.= links, LTX= Lebertransplantation, m= Männlich, mat= maternal, NA= Nierenagenese, NTX= Nierentransplantation, OB= Ohne pathologischen Befund, OE= Okzipitale Enzephalozele, pat= paternal, re.= rechts, VA= Verdacht auf, VSD= Ventrikelseptumdefekt, ZND= Zystische Nierendysplasie, 1G/2G= 1. bzw. 2.Grades, ^A= SNP-Array Analytik, ^E= Exom-Analyse, ^{ho}= homozygot, ^N= NGS-Panel, ^s= Sanger-Sequenzierung, st= Untersuchung auf MKS4-Spleißmutation c.2991+1655A>G, = Kopplungsanalytik (vergleichend: Mehrere Betroffene und gesunde Familienmitglieder und Betroffene oder bezüglich Homozygotie bei bekannter Blutsverwandtschaft), (d)= Deletion, (dup)= Duplikation, (i)= Insertion, (m)= Missense-Mutation, (mat) bzw. (pat)= maternale oder paternale DNA untersucht, (n)= Nonsense-Mutation, (s)= Spleißmutation)

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analyisierte Gene	Befund
MKS-1	1	KI	KI	KI	+	KI	KI	KI	-	-	MKS1* MKS3* ^s MKS7* ^s	MKS3: p.Cys615Arg(m) ^{he} p.Arg213Cys(m)
	1	KI	KI	KI	+	KI	KI	KI	-	-	MKS1* ^s MKS2* ^s MKS3* ^s MKS4* ^s MKS7* ^s	-
MKS-2	1	Türkisch	A	ASZA (Anenzephalus)	+	KI	KI	Spina bifida	-	C/C 2G	MKS1: MKS3* ^s MKS5* ^s	-
	1	Türkisch	A	OE, ASZA (Mikrozephalie)	+	+	+	-	OB	C/C 1G	MKS1: c.1407+206(e) ^{ho}	-
MKS-3	1	A	A	OE	+	KI	+	-	-	-	MKS1* ^s MKS2* ^s MKS3* ^s MKS5* ^s	MKS6: p.Val1097PhefsX2(d) ^{he} p.Ile1155AAsn(m)
	1	Deutsch	A	OE	+	KI	+	-	-	-	MKS1: MKS3* ^s MKS5* ^s MKS7* ^s	-
MKS-4	1	Deutsch	A	OE	+	+	+	-	-	-	MKS1: MKS5* ^s	c.1408-34_1408-6del(e) ^{he} p.Glu139Glu(e)
MKS-5	1	Deutsch	A	OE	+	+	+	-	-	-	MKS1: MKS3* ^s MKS5* ^s	MKS3: c.1288+1G>A(e) ^{he} p.Met252Thr(m)
MKS-6	1	Deutsch	Perinatal verstorben	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	MKS1: MKS3* ^s MKS5* ^s MKS7* ^s	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-7	1 (eineilige Zwillinge)	Dänisch	A	KI	+	KI	+	KI	-	-	MKS1 ^s , MKS2 ^s , MKS3 ^s , MKS4 ^s , MKS7 ^s	-
	1 (eineilige Zwillinge)		A	KI	+	KI	+	KI	-	-	MKS1 ^s , MKS3 ^s , MKS7 ^s	-
MKS-8	1	Kuwaitisch	A	OE	+	KI	+	-	-	C/C 1G	MKS1 ^s , MKS3 ^s , MKS7 ^s	MKS1: c.515+1G>A ^{ho}
MKS-9	1	Arabisch	KI	ASZA (DWM)	+	KI	KI	KI	-	-	MKS1 ^s	-
	1		KI	-	+	KI	KI	KI	-	-	MKS1 ^s	-
MKS-10	1	KI	KI	OE	+	KI	-	-	OB	-	MKS1 ^s , MKS3 ^s , MKS4 ^s , MKS7 ^s	-
MKS-11	1	Kosovarisch	A	OE, ASZA (Mikrozephalie)	+	+	+	-	SNP- Array: Keine Kopien- zahl- analyse	unklar	MKS1 ^s , MKS2 ^(A) , MKS3 ^s , MKS4 ^s , MKS5 ^(A) , MKS6 ^(A) , MKS7 ^(A) , MKS8 ^(A) , MKS9 ^(A) , MKS10 ^(A)	MKS4: p.Ala1832ProfsX19 ^{ho}
	1		A	ASZA (Dolichocephalus, Mikrozephalie)	+	+	+	-	-	-	-	MKS1 ^s , MKS3 ^s , MKS4 ^s , MKS7 ^s
MKS-12	1	Türkisch	A	OE	+	KI	+	+	-	-	MKS1 ^s , MKS3 ^s , MKS4 ^s , MKS7 ^s	-
	1		A	OE	+	KI	+	+	-	-	-	MKS1 ^s , MKS2 ^s , MKS3 ^s , MKS5 ^s , MKS7 ^s
MKS-13	1	Russisch	A	OE	+	+	+	Mikromelie aller Extremitäten, generalisierter Hydrops, Pankreasfibrose	OB	C/C 2G	MKS1 ^s , MKS2 ^s , MKS3 ^s , MKS4 ^s , MKS5 ^s , MKS7 ^s	-
MKS-14	1	Dänisch	A	OE	+	KI	+	KI	-	-	MKS1 ^s , MKS3 ^s , MKS4 ^s , MKS5 ^s , MKS7 ^s	(MKS3: p.Pro414Arg ^{he})
	1		A	OE	+	KI	+	KI	-	-	-	(MKS3: p.Pro414Arg ^{he})
MKS-15	1	Norwegisch	A	OE	+	+	+	KI	-	-	MKS1 ^s , MKS4 ^s , MKS5 ^s , MKS6 ^s , MKS7 ^s	MKS3: p.Gly195IlefsX13 ^{he} , p.Asp430ValifsX9 ^{he}

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-16	1	Kuwaitisch	A	ASZA (Hydrozephalus, Ventrikulomegalie)	+	KI	-	-	-	C/C 1G	MKS1 ^{*S} , MKS3 ^{*S} , MKS4 ^S	-
	1		A	OE	+ (fragl. nur linke Niere)	KI	+	Magen nicht darstellbar	-	-	-	-
MKS-17	1	Dänisch	A	OE	+	KI	+	Omphalozele	-	-	MKS1 ^{*S} , MKS3 ^{*S} , MKS5 ^S , MKS7 ^S	MKS1: c.1408-34_1408-6del ^(s) _{ho}
	1		A	OE	+	KI	+	-	-	-	-	-
MKS-18	1	Kanadisch	Perinatal verstorben	OE	+	KI	+	Gesichtsdysmorphien, komplexe kardiale Fehlbildungen, Urogenitaltrakt- anomalie	-	-	MKS1 ^S , MKS3 ^S , MKS4 ^S , MKS5 ^S	-
MKS-19	1	Hindu- ranisch/ französisch- kanadisch	A	OE	+	KI	+	Lippen-Kiefer- Gaumenspalte	OB	-	MKS1 ^{*S} , MKS3 ^S , MKS4 ^S , MKS5 ^S	-
MKS-20	1	Schottisch	Perinatal verstorben	ASZA (Hydrozephalus)	+	KI	-	Gaumenspalte	-	-	MKS1 ^S , MKS3 ^S , MKS4 ^S , MKS5 ^S , MKS7 ^S	MKS1: c.1408-34_1408-6del ^(s) _{he} , p.Glu139Glu ^(e) _{he}
	1		A	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	-	-
MKS-21	1	Deutsch	Perinatal verstorben	OE, ASZA (Hydrozephalus internus)	+	KI	-	Glockenförmiger Thorax	-	-	MKS1 ^S , MKS3 ^S , MKS4 ^S , MKS5 ^S , MKS7 ^S	MKS3: p.Thr317Arg ^(m) _{he} , p.Tyr727LysfsX6 ^(l) _{he}
	1		A	(DWM, erweiterte Ventrikel)	+	+	+	-	-	-	-	-
MKS-22	1	Türkisch	A	OE	+	+	-	-	-	+	MKS1 ^S , MKS3 ^S , MKS5 ^S , MKS7 ^S	MKS3: c.651+5G>C ^(s) _{ho}
	1		A	OE	+	+	+	-	-	-	-	-
MKS-23	1	Kanadisch (finnisch- schwedisch/ norwegisch- irisch)	A	OE	+	KI	KI	-	-	-	MKS1 ^{*S} , MKS3 ^{*S} , MKS5 ^S , MKS7 ^S	MKS1: c.1408-34_1408-6del ^(s) _{ho}
MKS-24	1	Deutsch	A	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	MKS1 ^{*S} , MKS3 ^{*S}	-
	1		A	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	-	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-25	1	Türkisch	A	OE	+	-	-	-			MKS4: p.Ile556Asn ^{he(matpat)} fsX20 ^(matpat) (MKS4: p.Ile2134Thr ^{he(matpat)} (rs117852025<1%) MKS6 ^N , MKS7 ^S	
	1		A	OE	+	-	-	-		C/C 2G	MKS1 ^S , MKS3 ^S , MKS4 ^{K(S)} , MKS6 ^N , MKS7 ^S	
MKS-26	1	Deutsch	A	OE	+	KI	-	KI			MKS1 ^S , MKS5 ^S , MKS7 ^S	MKS1: p.Pro20ArgfsX35 ⁽⁰⁾ ^{he} p.Glu378SerfsX54 ⁽⁰⁾
	1		A	OE	+	KI	-	KI		-		
MKS-27	1	Deutsch	A	OE	+	+	-	-			(MKS1 ^S : Ausschluss: c.1408- 34_1408- 6del ho)	-
MKS-28	1	Israelisch	A	KI	KI	KI	KI	KI			MKS1*, MKS3*, MKS4*, MKS5*, MKS7*	-
	1		A	KI	KI	KI	KI	KI				
	1		A	KI	KI	KI	KI	KI				
MKS-29	1	Dänisch	A	OE	+	KI	-	Analatresie			MKS1*, MKS3*, MKS5 ^S , MKS7 ^S	MKS3: p.Ser210Pro ^(m) ^{he} c.1930+21>C ^(s)
	1		A	OE	+	KI	-	-				
MKS-30	1	Deutsch	A	OE, ASZA (Hydrozephalus)	+	-	-	Nackenhygrom, Nasenbeinhyppoplasie, Herzfehlbildung (Ebstein-Anomalie)	OB		MKS1 ^S	-
MKS-31	1	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI			MKS1*, MKS3*, MKS4*, MKS5*, MKS7*	(MKS4 kompatibel, keine Sequenzanalytik)
	1		KI	KI	KI	KI	KI	KI				
MKS-32	1	Portugiesisch	A	KI	KI	KI	KI	KI			MKS1*, MKS3*, MKS4*, MKS5*, MKS7*	-
MKS-33	1	KI	A	KI	KI	KI	KI	KI			MKS1*, MKS3*	-
	1		A	KI	KI	KI	KI	KI				

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-34	1	KI	A	ASZA (Ventrikulomegalie und Hydrozephalus, erweiterte Cisterna magna)	+	KI	-	KI	SNP- Array: Keine Kopien- zahl- analyse		<u>MKS1</u> ^{*,(A)} , <u>MKS2</u> ^A , <u>MKS3</u> ^{*,S,(A)} , <u>MKS4</u> ^(A) , <u>MKS5</u> ^{*,(A)} , <u>MKS6</u> ^(A) , <u>MKS7</u> ^(A) , <u>MKS8</u> ^(A) , <u>MKS9</u> ^(A) , <u>MKS10</u> ^(A) , PKHD1 ^S	<u>MKS3</u> : p.Gly195IlefsX13, ^{ho} _(d)
	1		A	ASZA (Kleinhirnwurm- hypoplasie, Erweiterung des Foramen magnum)	+	+	-	Vorhofseptumdefekt		+		
MKS-35	1	KI	A	OE, ASZA (DWM)	+	KI	+	KI	OB	-	<u>MKS1</u> [*] , <u>MKS3</u> [*] , <u>MKS4</u> [*] , <u>MKS5</u> ^S , <u>MKS7</u> ^S	(MKS1 und MKS4 kompatibel, keine Sequenzanalytik)
MKS-36	1	KI	Perinatal verstorben	ASZA (DWM)	+	KI	+	Hypogonitalismus	OB	-	<u>MKS1</u> ^S , <u>MKS3</u> ^S	-
MKS-37	1	KI	A	KI	KI	KI	KI	KI	Vater und Feten inv(9) (p24q 31.2)		<u>MKS1</u> ^{*,S} , <u>MKS3</u> ^{*,S} , <u>MKS4</u> ^{*,S} , <u>MKS5</u> ^{*,S} , <u>MKS6</u> ^{*,S} , <u>MKS7</u> ^{*,S} , JBTS3 ^S , JBTS8 ^S	-
	1		A									
MKS-38	1	Islandisch	A	OE, ASZA (Mikrozephalie, Kleinhirnenbildung, Meningomyelozele)	+	+	-	Lippen-Kiefer- Gaumenspalte, Ornphalozele	-	+/- 7-8G	<u>MKS1</u> ^S , <u>MKS3</u> ^S	-
MKS-39	1	Arabisch	A	OE	+	KI	+	-			<u>MKS1</u> ^{,A,E} , <u>MKS2</u> ^{A,E} , <u>MKS3</u> ^{A,E} , <u>MKS4</u> ^{A,E} , <u>MKS5</u> ^{A,E} , <u>MKS6</u> ^{A,E,S,(N)} , <u>MKS7</u> ^{A,E} , <u>MKS8</u> ^{A,E} , <u>MKS9</u> ^{A,E} , <u>MKS10</u> ^{A,E}	<u>MKS6</u> : p.Arg1218X, ^{he} c.4315-6_4315-4de ^(e) , ^{he}
	1		A	ASZA (Kopf nicht darstellbar)	+	KI	+	Lumbosacrale Meningozele	SNP- Array: OB	unklar		
MKS-40	1	Deutsch	A	OE	+	+	+		-	-	<u>MKS1</u> ^S , <u>MKS3</u> ^S	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-41	1	KI	A	OE	+ (re. NA)	-	+ (auch Syn- daktylie)	Beidseitige Nebennieren- agenesie, angedeutete Zwei-Lappung der Lungen	-	-	MKS1 ^S MKS3 ^S	-
MKS-42	1	Englisch	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	MKS1 ^S , MKS3 ^S	-
MKS-43	1	KI	KI	OE, ASZA (Kleinhirnwurmagenesie, VA lobuläre Holo-prosenzephalie)	+ (fraglich nur li. Niere)	KI	-	Lippenspalte, VSD mit Aortenisthmus- stenose, VA Ösophagusatresie, Polyhydramnion, Beugehaltung der Gelenke, asymmetrische Wachstums- retardierung, Mikrotie beidseits	-	-	MKS1 ^S	-
MKS-44	1	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	MKS1 ^S	MKS1: p.Leu137TrpfsX8 ^(g) _{1,he} p.Thr376AsnfsX56 ^(dup) _{1,he}
MKS-45	1	Deutsch	A	OE	+ (fraglich nur li. Niere)	KI	-	-	OB	-	MKS1 ^S , MKS3 ^S	-
MKS-46	1	Englisch	Verstorben	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	MKS1 ^S	MKS1: p.Glu139Glu ^(g) _{1,he} , p.Val320Ile ^(s) _{1,he}
MKS-47	1	Schwedisch	A	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	MKS1 ^S , MKS3 ^S	-
MKS-48	1	Tschechisch	A	OE	+	KI	KI	Gaumenspalte	OB	-	MKS1 ^S , MKS3 ^S , MKS4 ^S , MKS5 ^S , MKS6 ^S , MKS7 ^S	(MKS1, MKS6, MKS7 kompatibel, keine Sequenzanalytik)
	1		A	ASZA (Meningomyelozele)	+	KI	+	Gaumenspalte				
MKS-49	1	Türkisch	A	OE	Fragl. Megavesika	KI	+	KI	OB	C/C 3-4	MKS1 ^S , MKS3 ^S , MKS4 ^S , MKS5 ^S , MKS6 ^S , MKS7 ^S	(MKS4 kompatibel, keine Sequenzanalytik)

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-50	1	Türkisch	A	KI	KI	KI	KI	KI	OB	-	<u>MKS1^s</u> <u>MKS3^s</u>	-
	1		A	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	<u>MKS1^s</u> <u>MKS3^s</u>	-
MKS-51	1	Deutsch	A	OE, ASZA (Hydrozephalus, auffällige hintere Schädelgrube)	+	KI	-	Herzfehler, generalisiertes Hautödem, Wachstums- retardierung	-	-	<u>MKS1^s</u> <u>MKS3^s</u>	-
MKS-52	1	Griechisch	Perinatal verstorben	(Kleinhirnwurmagenesie, Dolichocephalus, vergrößerte Cisterna magna, hypoplastische Kleinhirn- hemisphären, DW- Zyste/okzipitale Zyste)	+ (re. NA)	-	+	Dilatierter Aortenstamm, singuläre Nabelschnurarterie, Gelenkkontrakturen, Ohrringhänge	46,XX bei m Genitale	-	<u>MKS1^s</u> <u>MKS3^s</u> <u>MKS7^s</u>	-
MKS-53	1	Schweize- risch	Perinatales Überleben, dann KI	OE ASZA (hypoplastisches Kleinhirn, fehlender Verschluss des 4. Ventrikels, kleine hintere Schädelgrube)	+	KI	-	Kleiner offener hämodynamisch irrelevanter Ductus	OB	-	<u>MKS1^s</u> <u>MKS3^s</u> <u>MKS6^s</u>	-
MKS-54	1	Türkisch	Totgeburt	KI	KI	KI	KI	KI	OB	-	<u>MKS1^s</u> <u>MKS3^s</u>	-
	1		A	KI	KI	KI	KI	KI	OB	-	<u>MKS1^s</u> <u>MKS3^s</u>	-
MKS-55	1	Deutsch/ Ukrainisch	A	OE	+	-	-	Beidseitige Lippen- Kiefer-Gaumenspalte, fehlend abgrenzbare Nase	Aus- schluss Trisomie 13, 21	-	<u>MKS1^s</u> <u>MKS3^s</u>	-
MKS-56	1	Türkisch	A	OE, ASZA (Corpus callosum-Agenesie, Dolichocephalus)	+/- (unklar)	-	-	-	-	-	<u>MKS1^s</u> <u>MKS2^a</u> <u>MKS3^{a,s}</u> <u>MKS4^a</u> <u>MKS5^a</u> <u>MKS6^a</u> <u>MKS7^a</u> <u>MKS8^a</u> <u>MKS9^a</u> <u>MKS10^a</u> <u>BBS4^s</u>	-
	1		A	KI	+/- (unklar)	-	-	-	SNP- Array: OB	unklar	-	-
	1		A	ASZA (DWM)	+/- (unklar)	-	-	-	-	-	-	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-57	1	Arabisch	KI	KI	+	KI	KI	KI	-	C/C 1G	<u>MKS1*</u> , <u>MKS2*</u> , <u>MKS3*</u> , <u>MKS4*^S</u> , <u>MKS5*</u> , <u>MKS6*</u> , <u>MKS7*</u> , JBTS3 ^S , JBTS8 ^S	MKS4: p.Gln65X ⁽ⁿ⁾ ^{ho}
MKS-58	1	Arabisch	Perinatal verstorben	OE	+	KI	+	KI	-	-	<u>MKS1^S</u>	-
MKS-59	1	Nieder- ländisch	A	OE	+	KI	+	-	OB (auch Sub- telomer)	-	<u>MKS1^S</u>	-
MKS-60	1	KI	A	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	<u>MKS1^S</u>	-
MKS-61	1	Dänisch	A	-	+	KI	+	Zwei linke Lungen, Polysplenie	-	-	<u>MKS1*</u> , <u>MKS2*</u> , <u>MKS3*</u> , <u>MKS4*</u> , <u>MKS5*^S</u> , <u>MKS7*</u>	-
MKS-62	1	KI	A	OE, ASZA (Mikrozephalie)	+	KI	KI	KI	-	-	-	-
MKS-63	1	Pakistanisch	A	KI	KI	KI	KI	KI	-	+	<u>MKS3*</u>	(MKS3 kompatibel, keine Sequenzanalytik)
MKS-64	1	Arabisch	A	KI	+	KI	KI	KI	-	+	<u>MKS1*</u> , <u>MKS2*</u> , <u>MKS3*</u> , <u>MKS4*</u> , <u>MKS5*</u> , <u>MKS6*</u> , <u>MKS7*</u>	(MKS4 kompatibel, keine Sequenzanalytik)
MKS-65	1	Deutsch	A	OE	+	+	+	Klumpfüße, angedeutete Gaumenspalte, Gesichtsdysmorphien	-	-	<u>MKS1^S</u>	<u>MKS1</u> : c.958+5G>A ^{he} , c.1408-34_1408-6del ^(s) ^{he}
MKS-66	1	Deutsch	A	ASZA (DWM, vergrößerte Cisterna magna)	+	KI	-	Klumpfüße, Magen nicht darstellbar, VA Herzfehler, milde Skelettdysplasie (Ulnardeviation)	-	-	<u>MKS1^S</u> , <u>MKS3^S</u>	MKS3: c.1960+2T>C ^(e) ^{he} , p.Cys615Arg ^(m)

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-67	1	Deutsch	A	-	+/- (unklar, Megavesika)	KI	-	Singuläre Nabelschnurarterie, Megathorax	-	-	MKS1 ^S MKS3 ^S	-
	1		A	ASZA (DWM, Exenzephalus, fehlende Schädelduppe)	+/- (unklar)	KI	-	-	-	-	-	-
MKS-68	1	Kosovarisch/ Albanisch	A	OE, ASZA (Mikrozephalie)	+	+	-	Herzvitium, partieller Situs inversus (Magen, Pankreas, Milz, Nebennilz rechts ventral der Leber), mediane Gaumenspalte (weicher Gaumen), sekundäre Lungenhypoplasie	OB	-	MKS1 ^S MKS3 ^S MKS4 ^S MKS5 ^S MKS6 ^S MKS7 ^S	MKS4: p.Ala1832ProfsX19 ^(d) , c.297+2T>C ^(e)
	1		A	OE fraglich	+	-	-	Präduktale Aorten- isthmusstenose	-	-	-	MKS1 ^S MKS3 ^S
MKS-69	1	Deutsch	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	MKS1 ^S MKS3 ^S	-
MKS-70	1	Arabisch	A	ASZA (Kleinhirnhypoplasie, Vermisagenesie, Corpus callosum-Agenesie)	- (Pyelektasie)	KI	-	Zystische Lungen- malformation	SNP- Array: OB	C/C 1G	MKS1 ^A MKS2 ^A MKS3 ^A MKS4 ^S MKS5 ^A MKS6 ^A MKS7 ^A MKS8 ^A MKS9 ^A MKS10 ^A	-
MKS-71	1	Romänisch	A	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	MKS1 ^S MKS3 ^S	-
MKS-72	1	Arabisch	>3 Jahre	ASZA (Hydrozephalus, weitere MRT-Auffälligkeiten: Kleinhirnhypoplasie)	+	KI	-	Hypotonie, Krampfanfälle, Ohranhangsel, Gesichtsdeformitäten, Infektneigung, VA Herzfehler	Array- CGH: OB	-	MKS3 ^S MKS4 ^S MKS7 ^S PKHD1 ^S	-
MKS-73	1	Deutsch	KI	OE	+	KI	+	KI	-	-	MKS1 ^{S(N)} MKS3 ^S	MKS1: p.Proc240Thr ⁽ⁿ⁾ , c.1408-3A_1408-6del ^(s)

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-74	1	KI	Totgeburt	OE, ASZA (Dolichocephalus, Ventrikulomegalie)	+	KI	-	-	-	-	<u>MKS3^S</u>	<u>MKS3:</u> p.Trp15X _(n) ^{he} , p.His782Arg _(m) ^{he}
MKS-75	1	Deutsch	A	OE, ASZA (Meningomyelozele, Rachischisis, Mikrozephalie)	+	+	unklar	Klumpfüße, Bulbi regelgerecht bei asymmetrischer Lidspalten, kraniofaziale Auffälligkeiten, leichtes Nackenödem, Lungenhypoplasie, Pankreas: kleinzystische Pankreasdysplasie, Nebenhoden: hochgradige multiple zystische Dysplasie	OB	-	<u>MKS3^S</u>	<u>MKS3:</u> p.Leu939Pro _(m) ^{he} , c.312+1G>T _(g) ^{he}
MKS-76	1	Deutsch	A	OE	+	KI	+	-	OB	-	<u>MKS1^S</u> <u>MKS3^{S(N)}</u>	<u>MKS3:</u> p.Glu361X _(n) ^{he} , p.Arg208X _(n) ^{he}
MKS-77	1	Deutsch	KI	OE	-	KI	+	KI	-	-	<u>MKS1^S</u> <u>MKS3^S</u>	-
MKS-78	1	Tunesisch	KI	-	+	KI	-	VA Herzfehler	SNP- Array: OB	C/C 1G	<u>MKS1^A</u> , <u>MKS2^A</u> , <u>MKS3^A</u> , <u>MKS4^{A,S+}</u> , <u>MKS5^A</u> , <u>MKS6^A</u> , <u>MKS7^A</u> , <u>MKS8^A</u> , <u>MKS9^A</u> , <u>MKS10^A</u> , BBS10 ^S	<u>MKS4:</u> p.Asn1049LysfsX16 _(d) ^{ho}
	1		ASZA (DWM, Zyste im Bereich der hinteren Schädelgrube)	+	KI	KI	KI	KI				
MKS-79	1	Italienisch	A	ASZA (Hydrozephalus)	+ (li. NA)	KI	-	Analtresie, Ösophagusatresie, fehlender linker Hoden, einseitig 4-Finger, singuläre Nabelschnurarterie	OB	-	<u>MKS1^S</u> , <u>MKS3^S</u> , <u>MKS4^{S+}</u> , <u>MKS6^S</u> , <u>MKS7^S</u>	<u>(MKS6:</u> p.Lys507Gly _(m) ^{hermat} (rs144439937 <1%))
MKS-80	1	Süd- europäisch	A	OE	unklar	KI	+	Rachischisis, Wirbeldeformitäten	OB	-	<u>MKS1^S</u> , <u>MKS3^S</u> , <u>MKS4^{S+}</u> , <u>MKS6^S</u> , <u>MKS7^S</u>	<u>(MKS4:</u> p.Asp272Asn _(m) ^{hermat})

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-81	1	Türkisch	KI	ASZA (Spina bifida, sakraler Arnold-Chiara Symptomkomplex: Kleinhirnaplasie, Banana-Sign., Ventrikulomegalie, Mikrozephalie)	+	KI	+	Singuläre Nabelschnurarterie, Fußfehlstellung	SNP- Array: 2 unklare CNVs: 424 Kb Del. 3q25.1, 325 Kb Dup. 1q44	+	<u>MKS1</u> ^{NA} , <u>MKS2</u> ^A , <u>MKS3</u> ^{NA} , <u>MKS4</u> ^{NS/SH-A} , <u>MKS5</u> ^A , <u>MKS6</u> ^{NA} , <u>MKS7</u> ^A , <u>MKS8</u> ^A , <u>MKS9</u> ^A , <u>MKS10</u> ^A	-
MKS-82	1	Deutsch	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	<u>MKS1</u> ^N , <u>MKS2</u> ^N , <u>MKS3</u> ^{NS/SH+} , <u>MKS4</u> ^{NS/SH+} , <u>MKS6</u> ^N	-
MKS-83	1	Türkisch	A	OE	+	KI	-	-	SNP- Array: Keine Kopier- zahl- analyse	C/C 1G	<u>MKS1</u> ^A , <u>MKS2</u> ^A , <u>MKS3</u> ^A , <u>MKS4</u> ^{SH+} , <u>MKS5</u> ^A , <u>MKS6</u> ^A , <u>MKS7</u> ^A , <u>MKS8</u> ^A , <u>MKS9</u> ^A , <u>MKS10</u> ^A	MKS4: c.5012-5G>T ^{ho} _(s)
MKS-84	1	Türkisch	KI	ASZA (Anenzephalus)	+ (fragl. NA)	KI	+	Menigomyelozele	-	+	<u>MKS1</u> ^N , <u>MKS3</u> ^{NS} , <u>MKS4</u> ^{NS/SH+} , <u>MKS6</u> ^{NS}	MKS6: p.Pro1563Arg ^{he(m)} _(nat/par) (MKS3) p.Gly195Asp fsX27 ^{he(m)} _(nat)
MKS-85	1	KI	KI	OE, ASZA (Mikrozephalie, Kleinhirnenbildung)	KI	KI	KI	KI	SNP- Array: OB	-	<u>MKS1</u> ^N , <u>MKS3</u> ^N , <u>MKS4</u> ^{NS/SH+} , <u>MKS6</u> ^{NS} , <u>JBTS3</u> ^N	(MKS6): p.Arg1445X ^{he} _(n) MKS3: p.Val171Ile ^{he} _(m) MKS4: p.Arg1746Gln ^{he} _(m) (rs61941020 <1%)
MKS-86	1	Deutsch	A	OE	+	+	+	VA Lippenspalte	Schnell- test: OB	-	<u>MKS1</u> ^N , <u>MKS3</u> ^{NS} , <u>MKS4</u> ^{NS/SH+} , <u>MKS6</u> ^{NS} , <u>JBTS3</u> ^N	(MKS6): p.Ile410Thr ^{he} _(m)

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Verlauf	Okzipitale Enzephalozele/ andere assoziierte zerebrale Anomalien	(Zystische) Nieren- dysplasie	Leber- fibrose/ DPM	Poly- daktylie	Weitere Symptome	Chrom.- Befund	Ko.	Analysierte Gene	Befund
MKS-87	1	Arabisch	A	OE, ASZA (Hydrozephalus)	+	+	KI	-	-	-	<u>MKS1^N</u> , <u>MKS3^{N,§}</u> , <u>MKS4^{N(S)+}</u> , <u>MKS6^N</u>	<u>MKS3:</u> p.Gln747Gln ^(sp) (rs115563233 <1%) <u>MKS4:</u> p.Asp1413His ^(m) (rs183655276 <1%))
MKS-88	1	Türkisch	A	OE	+	+	-	KI	SNP- Array: OB	+	<u>MKS1^A</u> , <u>MKS2^A</u> , <u>MKS3^{N,§}</u> , <u>MKS4^A</u> , <u>MKS5^A</u> , <u>MKS6^A</u> , <u>MKS7^A</u> , <u>MKS8^A</u> , <u>MKS9^A</u> , <u>MKS10^A</u>	<u>MKS3:</u> p.Gln467X ^(p) ^{ho}

8. Anhang

Tabelle A2: Klinische Daten der JS-Kollektiv-Patienten (Indikation: Klinischer Verdacht auf JS oder JSRD).

(ARS= Atemregulationsstörung, ASZA= Andere assoziierte zerebrale Anomalien, ATX= Ataxie, bzw.= Beziehungsweise, C/C= Cousin und Cousine, Chrom. Befund= Chromosomaler Befund, CNV= Kopienzahlvariante, Del= Deletion, Dup= Duplikation, DWM= Dandy-Walker-Malformation, EWW= Entwicklungsverzögerung, HPT= Muskuläre Hypotonie, J= Jahre, KH= Kleinhirnhypoplasie, KI= Keine Information vorhanden, Ko.= Konsanguinität, LCA= Lebersche Kongenitale Amaurose, m= Männlich, ma= maternal, MR= Mentale Retardierung, MTS= Molar-Tooth-Sign, N= Nystagmus, OB= Ohne pathologische Befunde, OE= Okzipitale Enzephalozele, OMA= Okulomotorische Apraxie, pat= paternal, postax.= postaxial, VHA= Vermishypoplasie/-agenesie, w= Weiblich, 1G/2G= 1. bzw. 2.Grades, ^A= SNP-Array Analytik, ^D= Untersuchung auf homozygote JBTS4-Deletion mittels Multiplex-PCR, ^{he}= heterozygot, ^{ho}= homozygot, ^N= NGS-Panel, ^s= Sanger-Sequenzierung, st= Untersuchung auf JBTS5-Spleißmutation c.2991+1655A>G, *Kopplungsanalytik (vergleichend: Mehrere Betroffenen oder gesunde Familienmitglieder und Betroffene oder bezüglich Homozygotie bei bekannter Blutsverwandtschaft), ^(d)= Deletion, ^(m)= Missense-Mutation, ⁽ⁿ⁾= Nonsense-Mutation ^(s)= Spleißmutation)

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnosestellung	Kleinhirn/Zerebrale Beteiligung	Mentale Entwicklung	Körperliche Entwicklung	Augenmotilitätsstörung	Visus/Retina-beteiligung	Nierenbeteiligung	Leberbeteiligung	Postax. Polydaktylie	Chrom.-befund	Ko.	Analytik	Befund
JS-1	1 (w)	Deutsch	Perinatal	+	KI	KI	+(N)	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS4 ^D , JBTS6 ^S , JBTS6 ^S	-
JS-2	1 (m)	Türkisch	Perinatal (verstorben)	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	C/C 1G	JBTS3*, JBTS4 ^D , JBTS4 ^D , JBTS5*, JBTS6 ^S , JBTS6 ^S , JBTS7*, JBTS8*	-
JS-3	1 (m)	Türkisch	14J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS4 ^D	-
JS-4	1 (m)	Deutsch	Perinatal	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	C/C 2G	JBTS3*, JBTS4 ^D , JBTS5*, JBTS6 ^S , JBTS6 ^S , JBTS7*, JBTS7*	-
JS-5	1 (m)	Deutsch	Perinatal	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS3 ^S , JBTS4 ^D , JBTS4 ^S , JBTS6 ^S , JBTS8 ^S	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Kleinhirn/ Zerebrale Beteiligung	Mentale Ent- wicklung	Körperliche Ent- wicklung	Augen- motilitäts- störung	Visus/ Retina- beteili- gung	Nieren- beteili- gung	Leber- beteili- gung	Postax. Poly- daktylie	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
JS-6	1 (m)	Türkisch	Perinatal	+	KI	+ (ATX, HPT, ARS)	-	-	+	KI	-	SNP- Array: 507 Kb Deletion 1q21.2	C/C 1G	JBTS1, JBTS2 ^A , JBTS3 ^{A,A,S} , JBTS4 ^{DA} , JBTS5 ^A , JBTS6 ^{A,S} , JBTS7 ^A , JBTS8 ^{A,S} , JBTS9 ^A , JBTS10 ^A , JBTS17 ^A , BBS10 ^S , MKS1 [*] , MKS7 [*]	-
JS-7	1 (m)	Deutsch	25J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS5 [*] , JBTS6 ^{he,S} , JBTS7 [*]	JBTS6: p.Arg208X ⁽ⁿ⁾ , p.Arg172G ^(m)
	1 (m)		21J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS3 ^S , JBTS4 ^D , JBTS5 [*] , JBTS6 ^S , JBTS7 [*] , MKS1 [*] , MKS7 [*]	-
JS-8	1 (w)	Türkisch	5J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS1 ^A , JBTS2 ^A , JBTS3 ^A , JBTS4 ^{DA} , JBTS5 ^A , JBTS6 ^A , JBTS7 [*] , JBTS8 ^A , JBTS9 ^A , JBTS10 ^A , JBTS17 ^A	-
JS-9	1 (m)	Türkisch/ arabisch	Pränatal (perinatal ver- storben)	+ ASZA (DWM)	KI	KI	KI	KI	+	+	-	OB, SNP- Array: OB	C/C 1G	JBTS1 ^A , JBTS2 ^A , JBTS3 ^A , JBTS4 ^{DA} , JBTS5 ^A , JBTS6 ^A , JBTS7 [*] , JBTS8 ^A , JBTS9 ^A , JBTS10 ^A , JBTS17 ^A	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Kleinhirn/ Zerebrale Beteiligung	Mentale Ent- wicklung	Körperliche Ent- wicklung	Augen- motilitäts- störung	Visus/ Retina- beteili- gung	Nieren- beteili- gung	Leber- beteili- gung	Postax. Poly- daktylie	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
JS-10	1 (m)	KI	Pränatal/ perinatal	KI, ASZA (OE)	KI	+ (ARS)	-	KI	-	KI	-	SNP- Array: OB	+	JBTS1 ^A , JBTS2 ^A , JBTS3 ^{AN} , JBTS4 ^{AS,S'} , JBTS5 ^{AN} , JBTS6 ^{AN} , JBTS7 ^{AS} , JBTS8 ^{AS} , JBTS9 ^{AN} , JBTS10 ^A , JBTS17 ^A , NPHP2 ^S , MKS11 ^N	-
	1 (m)		Pränatal/ perinatal	+, ASZA (Meningo- zele)	KI	+ (ARS)	-	KI	-	KI	-				
JS-11	1 (m)		9J	KI, ASZA (DWM)	+ (MR)	KI	KI	-	KI	KI	-	-	+	JBTS2 [*] , JBTS5 [*] , JBTS6 ^{AS} , JBTS7 [*]	JBTS6: p.Gly533Glu _(m) ^{ho}
JS-12	1 (w)	Türkisch	Perinatal	KI, ASZA (Hydro- zephalus)	+ (EWW)	+ (HPT)	-	-	+	+	-	OB	-	JBTS3 [*] , JBTS5 [*] , JBTS6 ^{AS} , JBTS6 ^{AS} , JBTS7 [*]	-
JS-13	1 (m)	KI	4J	+, ASZA (Polymikro- gyrie)	+ (EWW)	KI	+ (N)	+ (Hyper- opie)	-	-	+	-	C/C 2G	JBTS3 [*] , JBTS5 [*] , JBTS6 ^{AS} , JBTS7 [*] , JBTS8 [*] , MKS11 ^N , BBS1 [*] , BBS2 [*] , BBS10 [*] , BBS12 [*]	-
JS-14	1 (m)	Deutsch	Perinatal	+	+ (EWW)	+ (HPT, ARS)	+ (N)	-	-	-	-	-	-	JBTS3 ^S , JBTS6 ^S	JBTS6: p.Ile833Thr _(m) ^{he} , p.Arg208X _(n)
JS-15	1 (m)	Dänisch	2J	KH	+ (MR)	+ (ATX)	KI	+ (LCA)	KI	KI	-	-	-	JBTS5 ^S	-
JS-16	1 (m)	Deutsch	Perinatal	KI	+ (MR)	+ (HPT)	+ (N)	-	-	KI	-	-	-	JBTS3 ^S , JBTS6 ^S	JBTS6: p.Tyr513Cys _(m) ^{ho}
JS-17	1 (m)	Türkisch	9J	+	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS5 ^S	-
JS-18	1 (m)	Deutsch	45J	KH	KI	+ (ATX)	+ (N)	-	-	-	-	-	-	JBTS3 ^S , JBTS6 ^S , JBTS8 ^S	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Kleinhirn/ Zerebrale Beteiligung	Mentale Ent- wicklung	Körperliche Ent- wicklung	Augen- motilitäts- störung	Visus/ Retina- beteili- gung	Nieren- beteili- gung	Leber- beteili- gung	Postax. Poly- daktylie	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
JS-19	1 (w)	Deutsch	Perinatal	+	KI	KI	+	(N)	-	-	-	-	-	JBTS3 ^S JBTS6 ^S	JBTS3: p.Lys246X _(n) ^{ho}
JS-20	1 (m)	Türkisch	Perinatal	+	+(EWW)	+(HPT)	+(OMA)	+	-	-	-	-	C/C 2G	JBTS3* JBTS6* JBTS7* JBTS8* JBTS9* MKS1* MKS7*	-
JS-21	1 (w)	Serbisch	Perinatal	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	SNP- Array: OB	+	JBTS1(A) JBTS2(A) JBTS3* _{S1(A)} JBTS4(A) JBTS5* _(A) JBTS6* _(A) JBTS7* _(A) JBTS8* _(A) JBTS9* _(A) JBTS10(A) JBTS17(A) MKS7*	JBTS3: p.Thr671Ile _(m) ^{ho}
JS-22	1 (m)	Arabisch	4J	KI	+(EWW)	+(HPT)	+(OMA)	-	+	KI	+	-	-	JBTS4 ^P	-
JS-23	1 (w)	Griechisch	Pränatal (Abbruch 21,SSW)	+, KH, ASZA (Dandy- Walker- Zyste)	-	-	-	-	+	-	+	46,XX bei m inneren Genitale	-	JBTS3 ^S JBTS6 ^S JBTS8 ^S MKS7 ^S	-
JS-24	1 (m)	Japanisch	2J	+, ASZA (Polymikro- gyrie)	+(EWW)	+(ARS)	-	KI	-	KI	-	-	-	JBTS3 ^S	-
JS-25	1 (w)	Arabisch	Perinatal	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS3 ^S	-
JS-26	1 (Fet)	Deutsch	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS6 ^S	-
JS-27	1 (m)	Türkisch	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	C/C 2G	JBTS5 ^S JBTS6 ^S	-
JS-28	1 (KI)	KI	Perinatal	KI, ASZA (DWM), Ventrikulo- megalie)	KI	KI	KI	KI	-	KI	+	-	-	JBTS6 ^S	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Kleinhirn/ Zerebrale Beteiligung	Mentale Ent- wicklung	Körperliche Ent- wicklung	Augen- motilitäts- störung	Visus/ Retina- beteili- gung	Nieren- beteili- gung	Leber- beteili- gung	Postax. Poly- daktylie	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
JS-29	1 (Fet, w)	Deutsch	Pränatal (Abbruch)	+	-	-	-	-	-	-	-	OB	-	-	-
JS-30	1 (m)	Estrnisch	Perinatal	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS3 ^s	-
JS-31	1 (Fet)	Deutsch	Pränatal (Abbruch)	ASZA (OE)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JBTS1 ^s , JBTS2 ^s , JBTS3 ^s , JBTS4 ^s , JBTS5 ^s , JBTS6 ^s , JBTS7 ^s , JBTS8 ^s , JBTS9 ^s , MKS1 ^s , MKS7 ^s	-
			Pränatal (Abbruch)	KH, ASZA (okzipitale Meningo- zele, Hydro- zephalus)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JS-32	1 (m)	Deutsch	9J	+	+(EWW)	-	-	-	+	-	-	-	-	JBTS4 ^d	-
JS-33	1 (m)	Deutsch	6J	KI	+(EWW, MR)	+(HPT)	+(OMA)	-	+	-	-	-	-	JBTS6 ^s , JBTS7 ^s , JBTS9 ^s	JBTS6: c.651+2>G ₆ ^{he} p.Cys615A(G ₆ ^{he})
JS-34	1 (w)	Deutsch	3J	+	KI	KI	KI	KI	+	+	-	-	-	JBTS6 ^s , JBTS7 ^s , JBTS9 ^s	JBTS6: c.651+2>G ₆ ^{he} p.Cys615A(G ₆ ^{he})
JS-35	1 (w)	Türkisch	Perinatal	+	+(EWW, MR)	+(HPT, ARS)	+(N)	-	-	-	-	-	+	JBTS3 ^s , JBTS9 ^s	JBTS5: p.Gly1890X _(n) ^{ho}
JS-36	1 (w)	Slo- wenisch	12J	+	-	+(ARS)	-	-	-	KI	-	-	-	JBTS3 ^s	-
JS-37	1 (m)	Deutsch	3J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS1 ^s , JBTS2 ^s , JBTS3 ^s , JBTS4 ^s , JBTS5 ^s , JBTS6 ^s , JBTS7 ^s , JBTS8 ^s , JBTS9 ^s	-
														JBTS1 ^s , JBTS2 ^s , JBTS3 ^s , JBTS4 ^s , JBTS5 ^s , JBTS6 ^s , JBTS7 ^s , JBTS8 ^s , JBTS9 ^s	-
JS-38	1 (m)	KI	4J	+	+(EWW, MR)	+(HPT)	-	KI	-	KI	-	-	-	JBTS5 ^s , JBTS6 ^s	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Kleinhirn/ Zerebrale Beteiligung	Mentale Ent- wicklung	Körperliche Ent- wicklung	Augen- motilitäts- störung	Visus/ Retina- beteili- gung	Nieren- beteili- gung	Leber- beteili- gung	Postax. Poly- daktylie	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
JS-39	1 (m)	Türkisch	7J	+, KH	+ (EWV, MR)	+ (HPT)	+ (N)	KI	-	KI	-	SNP- Array: OB (301kb- Dup. 2q31.1 (mat))	+	JBTS1 ^A , JBTS2 ^A , JBTS3 ^{AN} , JBTS4 ^{DA} , JBTS5 ^{A,MSH} , JBTS6 ^{AN} , JBTS7 ^A , JBTS8 ^{AS} , JBTS9 ^{AN} , JBTS10 ^A , JBTS17 ^A , MKS1 ^N ,	-
JS-40	1 (w)	Portu- giesisch	6J	+	+ (MR)	-	-	KI	-	KI	-	-	-	JBTS3 ^S , JBTS6 ^S , JBTS8 ^S , JBTS9 ^S	-
JS-41	1 (m)	Deutsch	7J	+	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS3 ^S , JBTS4 ^D , JBTS5 ^{SH} , JBTS6 ^S , JBTS9 ^S	-
JS-42	1 (m)	Kuwaitisch	Pränatal/ perinatal (ver- storben)	+	KI	KI	KI	KI	+	+	KI	SNP- Array: OB	+	JBTS1 ^A , JBTS2 ^A , JBTS3 ^A , JBTS4 ^A , JBTS5 ^A , JBTS6 ^A , JBTS7 ^A , JBTS8 ^A , JBTS9 ^{AS} , JBTS10 ^A , JBTS17 ^A	JBTS9: p.Pro1122Ser ^(m) ^{ho}
JS-43	1 (m)	Arabisch	11J	KI	+ (EWV, MR)	-	-	+ (LCA)	-	-	-	-	-	JBTS5 ^S	-
JS-44	1 (m)	Türkisch	8J	+	+ (EWV, MR)	-	-	+	-	-	-	SNP- Array: OB (119kb- Dup. 12q24.1 1 (pat))	+	JBTS1 ^A , JBTS2 ^A , JBTS3 ^A , JBTS4 ^{DA,AS} , JBTS5 ^A , JBTS6 ^A , JBTS7 ^A , JBTS8 ^A , JBTS9 ^A , JBTS10 ^A , JBTS17 ^A	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Kleinhirn/ Zerebrale Beteiligung	Mentale Ent- wicklung	Körperliche Ent- wicklung	Augen- motilitäts- störung	Visus/ Retina- beteili- gung	Nieren- beteili- gung	Leber- beteili- gung	Postax. Poly- daktylie	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
JS-45	1 (m)	Finnisch	Perinatal	+	+(EWV)	+(HPT)	-	-	-	-	-	-	-	JBTS3 ^S , JBTS4 ^D , JBTS5 ^S , JBTS9 ^S	-
JS-46	1 (w)	KI	5J	KI, ASZA (DWM)	-	-	-	+	+	KI	KI	-	-	-	-
JS-47	1 (w)	Deutsch	4J	+	+(EWV)	+(HPT, ATX)	+(N)	-	-	KI	-	-	-	JBTS3 ^S , JBTS4 ^D , JBTS5 ^S , JBTS6 ^S , JBTS9 ^S	JBTS9: c.541-1G>A ^{he} , p.Arg1518Trp ^(m)
JS-48	1 (w)	Irakisch	9J	+	+(EWV, MR)	+(ATX)	+(N)	-	-	KI	-	-	-	JBTS1 ^{A,S} , JBTS2 ^A , JBTS3 ^{A,S} , JBTS4 ^{D,A} , JBTS5 ^A , JBTS6 ^A , JBTS7 ^A , JBTS8 ^A , JBTS9 ^A , JBTS10 ^A , JBTS17 ^A	JBTS3: p.Gly644Glu ^(m)
	1 (m)		4J	+	+(EWV, MR)	+(HPT)	+(N)	-	-	KI	-	SNP- Array: OB	C/C 1G	JBTS3: p.Gly644Glu ^{ho}	
JS-49	1 (m)	Deutsch	3J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS3 ^N , JBTS4 ^D , JBTS5 ^{N(s)} , JBTS6 ^N , JBTS9 ^N , MKST1 ^N	JBTS9: p.Val1097Phe ^{he} , fsX2 ^(o) , p.Arg1330Gln ^(m)
JS-50	1 (m)	Deutsch	Perinatal	+, ASZA (Ventrículo- megalie, Arachnoidal- zyste)	+(EWV, MR)	+(HPT, ARS)	+(N)	KI	-	-	-	OB	-	JBTS3 ^{S(N)} , JBTS4 ^P	JBTS3: p.Trp725Arg ^(m)
	1 (w)		15J	KI	+(EWV)	KI	-	+	+	-	-	-	-	JBTS3: p.Trp725Arg ^(m)	
JS-51	1 (m)	Türkisch	Perinatal	+, KH, ASZA (okzipitale Meningo- zele, Hydro- zephalus)	KI	+(ARS)	-	KI	+	KI	-	Array: OB	-	JBTS3 ^N , JBTS4 ^D , JBTS5 ^{N(s)} , JBTS6 ^N , JBTS7 ^S , JBTS9 ^N , MKST1 ^N	JBTS5: p.Glu97X ⁽ⁿ⁾ , p.Ile2000Val ^{he} , fsX22 ^(o) , (p.Arg1746 Gln ^(m) , (rs61941020 <1%))

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Kleinhirn/ Zerebrale Beteiligung	Mentale Ent- wicklung	Körperliche Ent- wicklung	Augen- motilitäts- störung	Visus/ Retina- beteili- gung	Nieren- beteili- gung	Leber- beteili- gung	Postax. Poly- daktylie	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
JS-52	1 (w)	Deutsch	5J	+ ASZA (Hydro- zephalus)	+ (MR)	+ (HPT, ARS)	-	KI	+	+/-	-	-	-	JBTS1 ^s , JBTS2 ^s , JBTS3 ^s , JBTS4 ^s , JBTS5 ^s , JBTS6 ^s , JBTS7 ^s , JBTS8 ^s , JBTS9 ^s	-
JS-53	1 (w)	Portu- giesisch	10J	+	KI	KI	+	KI	-	KI	-	-	-	JBTS3 ^s	-
JS-54	1 (w)	Dänisch	Perinatal	+	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS3 ^s , JBTS6 ^s	(JBTS3: p.Arg508X ⁽ⁿ⁾) (JBTS5: p.Ile2359Leu ^(m) (rs183387506 <1%)) JBTS6: p.Asp799Asp ^(e) (rs117195541 <1%))
JS-55	1 (m)	Deutsch	9J	+	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	JBTS3 ^N , JBTS4 ^D , JBTS5 ^{N(s)+} , JBTS6 ^N , JBTS9 ^N , MKST1 ^N	
JS-56	1 (w)	Türkisch	10J	+, KH	+ (MR)	KI	-	+	+	-	-	-	-	JBTS3* JBTS4* ^(s) , JBTS5* ⁺ , JBTS6* ⁺ , JBTS7* ^s , JBTS9* ^s	-
JS-57	1 (w)	Deutsch	Perinatal	+	+ (EWV)	+ (HPT)	+	-	-	KI	-	SNP- Array: OB	-	JBTS3 ^N , JBTS4 ^D , JBTS5 ^{N(s)+} , JBTS6 ^N , JBTS9 ^N , MKST1 ^N	MKS1: p.Arg124Glu ^(m) , c.1408-34_1408- 6del ^(e) (JBTS5: p.Arg835Arg ^(e) (rs41288017 <1%)), p.Tyr933Cys ^(m) (rs41288013 <1%))

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Kleinhirn/ Zerebrale Beteiligung	Mentale Ent- wicklung	Körperliche Ent- wicklung	Augen- motilitäts- störung	Visus/ Retina- beteili- gung	Nieren- beteili- gung	Leber- beteili- gung	Postax. Poly- daktylie	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
JS-58	1 (m)	Deutsch	Perinatal	+	+(EWV)	-	+(N)	KI	KI	KI	-	SNP- Array- OB	-	JBTSS ^N , JBTS4 ^D , JBTS ^{M(s)+} , JBTS6 ^N , JBTS9 ^N , MKST ^N	-
JS-59	1 (Fet)	KI	Pränatal	+	+(EWV, MR)	-	-	-	+	KI	-	-	-	JBTSS ^S	-
JS-60	1 (m)	Türkisch	3J	+	+(EWV, MR)	-	-	-	-	KI	-	-	-	JBTSS ^N , JBTS ^{N(s)+} , JBTS6 ^N , JBTS9 ^N , MKST ^N	-
JS-61	1 (m)	Britisch	2J	+	KI	KI	+(OMA)	KI	KI	KI	-	-	-	JBTSS ^S , JBTS4 ^{S+} , JBTS ^S	-

8. Anhang

Tabelle A3: Klinische Daten der BBS-Kollektiv-Patienten (Indikation: Klinischer Verdacht auf BBS).
(C/C= Cousin und Cousine, Chrom. Befund= Chromosomaler Befund, EWV= Entwicklungsverzögerung, HG= Hypoplastisches Genitale, J= Jahre, KI= Keine Information vorhanden, Ko.= Konsanguinität, LB= Lernbehinderung, m= Männlich, NA= Nierenagenese, NB= Nachtblindheit, MR= Mentale Retardierung, OB= Ohne pathologischen Befund, PD= postaxiale Polydaktylie, re.= rechts, RP= Retinitis pigmentosa, w= Weiblich, ZND= zystische Nierendysplasie, 1G/2G= 1. bzw. 2.Grades, ^A= SNP-Array Analytik, ^C= Asper-Chip-Analytik, ^H= Untersuchung auf Hotspot BBS1-Mutation p.Met390Arg, ^{he}= heterozygot, ^{ho}= homozygot, ^s= Sanger-Sequenzierung, = Kopplungsanalytik (vergleichend: Mehrere Betroffene oder gesunde Familienmitglieder und Betroffene oder bezüglich Homozygotie bei bekannter Blutsverwandschaft), ^(d)= Deletion, ^(dup)= Duplikation, ^(m)= Missense-Mutation, ⁽ⁿ⁾= Nonsense-Mutation, ^(s)= Spleißmutation)

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnosestellung	Adipositas	Entwicklung	Postaxiale Polydaktylie	Visusbeteiligung	Nierenbeteiligung	Weitere Symptome	Chrom.-befund	Ko.	Analytik	Befund
BBS-1	1 (m)	Deutsch	3J	KI	KI	KI	KI	+	KI	-	-	BBS1 ^s BBS2 ^s BBS10 ^s BBS12 ^s	-
BBS-2	1 (m)	Deutsch	4J	-	-	+	-	+	-	OB	-	BBS10: p.Cys91LeufsX5 ^(dup) _(re) , p.Arg49Trp _(m)	BBS10: p.Cys91LeufsX5 ^(dup) _(re) , p.Arg49Trp _(m)
BBS-3	1 (w)	Türkisch	Pränatal/ perinatal	-	+(EWV)	+	-	+(ZND, pränatal)	Mikrozephalie	OB	C/C 1G	BBS1 ^s BBS2 ^s BBS10 ^s BBS13 ^s , MKS2*, MKS3*, PKHD1*	BBS10: p.Lys188Trp ^(m) _(ho) , (p.Ala636Val _(m)) ^(ho)
BBS-4	1 (m)	Deutsch	Perinatal	+	-	+	+(NB)	-	Kryptorchismus, Großwuchs, Zugentfibrom	-	-	BBS1: p.Met390Arg ^(m) _(he) , p.Glu224Lys ^(m)	BBS1: p.Met390Arg ^(m) _(he) , p.Glu224Lys ^(m)
BBS-5	1 (m)	KI	6J	+	+(EWV, LB)	+	+(NB)	+	HG	OB	+	BBS1 ^s , BBS2 ^s , BBS10 ^s , BBS12 ^s	BBS12: p.Gly539Val ^(m) _(ho)
	1 (Fet)		pränatal	-	-	KI	KI	+(ZND, pränatal)	-	-	-	-	BBS12: p.Gly539Val ^(m) _(ho)
BBS-6	1 (w)	Deutsch	10J	+	+(EWV)	+	-	-	-	-	-	BBS1 ^H BBS10 ^s	-
BBS-7	1 (m)	Deutsch	4J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H BBS10 ^s BBS12 ^s	-
BBS-8	1 (m)	KI	9J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H BBS10 ^s BBS12 ^s	-
BBS-9	1 (w)	Türkisch	9J	+	KI	+	+	+	Minderwuchs	-	C/C 1G	BBS1 ^s , BBS2 ^s , BBS10 ^s , BBS12 ^s	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Acipositas	Entwicklung	Postaxiale Polydaktylie	Visus- beteiligung	Nierenbe- teiligung	Weitere Symptome	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
BBS-10	1 (m)	Türkisch	Perinatal	+	+ (LB)	+	+ (NB)	+	HG, Zahnfehlstellung	-	C/C 1G	BBS1*, BBS2*, BBS10*, BBS12 ^s	-
	1 (w)		Perinatal	+	+ (LB)	+	+ (NB)	+	Zahnfehlstellung				
	1 (w)		Perinatal	+	+ (EWV)	+	KI	+	Fazialis- parese re.				
BBS-11	1 (m)	KI	3J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s	-
BBS-12	1 (m)	Arabisch	2J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	SNP- Array: OB	C/C 1G	BBS1 ^A , BBS2 ^A , BBS3 ^A , BBS4 ^{A-s} , BBS5 ^A , BBS6 ^A , BBS7 ^A , BBS8 ^A , BBS9 ^A , BBS10 ^A , BBS11 ^A , BBS12 ^A , BBS13 ^A , BBS14 ^A , BBS15 ^A	BBS4: c.332+2_332 +3insTT ^(s) ^{ho}
BBS-13	1 (w)	Deutsch	18J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s	-
BBS-14	1 (m)	Deutsch	Perinatal	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	BBS10: p.Cys91LeufsX5 _(dup) ^{he} , p.Gly603Ser _(m)
BBS-15	1 (m)	Türkisch	7J	+	+ (EWV)	+	+ (RP)	KI	Analatresie, Hypospadie	Array: OB	+	BBS1 ^{*s} , BBS2 ^{*s} , BBS10 ^{*s} , BBS12 ^s	-
BBS-16	1 (w)	Türkisch	3J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	-
BBS-17	1 (m)	KI	12J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	-
BBS-18	1 (m)	Türkisch	5J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	+	BBS1 ^H , BBS2 ^{*s} , BBS10 ^{*s} , BBS12 ^s	BBS10: p.Ser311Ala _(m) ^{ho}
BBS-19	1 (m)	Kasachs- tanisch	19J	+	+ (EWV)	+	+ (NB)	KI	Kariöses Gebiss	OB	C/C 1G	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	BBS12: p.Arg675X _(n) ^{ho}
BBS-20	1 (Fet)	Schwedisch	Pränatal	-	-	+	KI	+ (ZND, pränatal)	Leber: duktale Anomalie	OB	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS13 ^s	BBS10: p.Cys91LeufsX5 _(dup) ^{ho}

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Acipositas	Entwicklung	Postaxiale Polydaktylie	Visus- beteiligung	Nierenbe- teiligung	Weitere Symptome	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
BBS-21	1 (m)	Jordanisch	Pränatal	+	+(EWW)	-	+	+ (ZND, pränatal)	Morbus Hirschsprung, Mindewuchs	-	+	BBS1 ^s , BBS10 ^s , BBS12 ^s	BBS1: p.Arg483X _(n) ^{ho}
BBS-22	1 (Fet)	Australisch (kaukasisch)	Pränatal	-	-	+	-	+ (ZND, pränatal)	Einlappige rechte Lunge, Kolon- verlagerung, Leber: duktile Anomalie	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	BBS12: p.Gly119Asp _(m) ^{he} , p.Ala672Val _(m) ^{he}
BBS-23	1 (w)	Deutsch	19J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	-
BBS-24	1 (w)	KI	8J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	-
BBS-25	1 (m)	Syrisch	14J	+	+(EWW, MR)	+	+(RP)	KI	Aortenisthmus- stenose	-	+	BBS2 [*] , BBS10 ^s , BBS12 ^s	BBS10: p.Ser269PhefsX35 _(dup) ^{ho}
BBS-26	1 (w)	Deutsch	2J	-	+(EWW)	+	KI	+	Cavernöses Hämangiom re. Oberlid	OB	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	-
BBS-27	1 (w)	KI	Perinatal	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	-
BBS-28	1 (m)	KI	13J	+	+(LB)	KI	KI	KI	HG	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s	-
BBS-29	1 (m)	Dänisch	Perinatal	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^G , BBS2 ^c , BBS3 ^c , BBS4 ^c , BBS5 ^c , BBS6 ^c , BBS7 ^c , BBS8 ^c , BBS9 ^c , BBS10 ^{c,s} , BBS11 ^c , BBS12 ^c , BBS13 ^c	-
BBS-30	1 (w)	Deutsch	48J	+	+(MR)	+	+	+	Cholezysto- lithiasis	-	-	BBS1 ^H , BBS10 ^s , BBS12 ^s , BBS13 ^s	-
BBS-31	1 (w)	Portugiesisch	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS10 ^s	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Acipositas	Entwicklung	Postaxiale Polydaktylie	Visus- beteiligung	Nierenbe- teiligung	Weitere Symptome	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
BBS-32	1 (w)	Türkisch	KI	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	C/C 2G	BBS1* BBS2* BBS10* BBS12* BBS1* BBS2* BBS10* BBS12* BBS13* BBS14* MKS3* MKS5* MKS6* MKS7* JBTS3* JBTS8*	-
BBS-33	1 (m)	Türkisch	25J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	C/C 1G	BBS1* BBS2* BBS10* BBS12* BBS13* BBS14* MKS3* MKS5* MKS6* MKS7* JBTS3* JBTS8*	-
BBS-34	1 (w)	Malaysisch	8J	+	+	(LB)	+	+	Minderwuchs	-	-	BBS1 ^H BBS10 [§]	-
BBS-35	1 (m)	Arabisch (kuwaitisch)	11J	+	KI	+	KI	+	Erhöhte Leber- echogenität	-	+	BBS1* ^S BBS10* BBS12* BBS1* ^S BBS2* ^S BBS10* BBS12* [§]	-
BBS-36	1 (m)	Deutsch/ jugoslawisch	40J	+	KI	+	+	KI	-	-	-	BBS1* ^S BBS2* ^S BBS10* BBS12* [§]	-
BBS-36	1 (w)		33J	+	KI	+	+	KI	-	-	-	BBS1* ^S BBS2* ^S BBS10* BBS12* [§]	-
BBS-37	1 (KI)	Taiwanesisch	5J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^S	-
BBS-38	1 (w)	KI	4J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^{C,S} , BBS2 ^C , BBS3 ^C , BBS4 ^C , BBS5 ^C , BBS6 ^C , BBS7 ^C , BBS8 ^C , BBS9 ^C , BBS10 ^C , BBS11 ^C , BBS12 ^C , BBS13 ^C	BBS1: p.Met(390A)G _(m) ^{He} , c.48-1(G>A) _(b) ^{He}
BBS-39	1 (m)	Deutsch	6J	+	+	(EWV)	KI	KI	Hypospadie	-	-	BBS1 ^H BBS10 [§]	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Acipositas	Entwicklung	Postaxiale Polydaktylie	Visus- beteiligung	Nierenbe- teiligung	Weitere Symptome	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
BBS-40	1 (m)	Türkisch	3J	+	+ (EWV, MR)	+	KI	+	Pierre-Robin- Sequenz (keine Lippen-/Gaumen- spalte), Krampfzufälle, Makrosomie, Ohrendysmorphie links, Schlafapnoe	-	+	<u>BBS1*</u> , <u>BBS2*</u> , <u>BBS10*s</u> , <u>BBS12*</u>	<u>BBS10:</u> p.Tyr177Cys ^(m) ^{ho}
BBS-41	3 (m, w, w)	Arabisch	5J	+	+ (MR)	+	+ (RP)	+	-	-	-	<u>BBS1*s</u> , <u>BBS2*</u> , <u>BBS10*</u> , <u>BBS12*</u>	-
BBS-42	1 (w)	Deutsch	Perinatal	KI	KI	KI	KI	-	KI	-	-	<u>BBS1^H</u> , <u>BBS10^S</u>	-
BBS-43	1 (m)	Taiwanesisch	14J	+	KI	+	+	+	-	-	-	<u>BBS1^S</u> , <u>BBS2^S</u> , <u>BBS10^S</u> , <u>BBS12^S</u>	<u>BBS2:</u> p.Ile188ThrfsX13 ^(del) ^{he} , p.Arg339X ⁽ⁿ⁾
BBS-44	1 (m)	Arabisch	3J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	<u>BBS1^S</u> , <u>BBS10^S</u>	<u>BBS10:</u> p.Asn364ThrfsX5 ^(del) ^{ho}
BBS-45	1 (m)	Türkisch	24J	-	+ (LB)	-	+	+	Innenohr- schwerhörigkeit	-	-	<u>BBS1^S</u> , <u>BBS10^S</u> , <u>BBS12^S</u>	-
BBS-46	1 (m)	Deutsch	9J	+	+ (MR)	+	-	KI	KI	-	-	<u>BBS1^S</u>	<u>BBS1:</u> p.Met390Arg ^(m) ^{ho}
BBS-47	1 (Fet)	Türkisch	Pränatal	-	-	+	KI	+	-	SNP- Array: OB	+	<u>BBS1^A</u> , <u>BBS2^A</u> , <u>BBS3^A</u> , <u>BBS4^A</u> , <u>BBS5^A</u> , <u>BBS6^A</u> , <u>BBS7^A</u> , <u>BBS8^A</u> , <u>BBS9^A</u> , <u>BBS10^A</u> , <u>BBS11^A</u> , <u>BBS12^A</u> , <u>BBS13^A</u> , <u>BBS14^A</u> , <u>BBS15^A</u>	<u>BBS12:</u> p.Glu495ArgfsX3 ^(del) ^{ho}

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Adipositas	Entwicklung	Postaxiale Polydaktylie	Visus- beteiligung	Nierenbe- teiligung	Weitere Symptome	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
BBS-48	1 (w)	Indisch	3J	+	+ (EWW)	-	KI	KI	-	-	-	BBS1 ^{C,S} , BBS2 ^C , BBS3 ^C , BBS4 ^C , BBS5 ^C , BBS6 ^C , BBS7 ^C , BBS8 ^C , BBS9 ^C , BBS10 ^{C,S} , BBS11 ^C , BBS12 ^{C,S} , BBS13 ^C ,	-
BBS-49	1 (m)	Englisch	6J	+	+ (EWW, LB)	+	-	+ (ZND)	Schlafapnoe, Krampfanfälle	-	-	BBS1 ^S	-
BBS-50	1 (m)	Jordanisch	8J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS10 ^S , BBS12 ^S	-
BBS-51	1 (m)	Nieder- ländisch	6J	-	-	+	-	KI	Kryptorchismus	-	-	BBS6 ^S	-
BBS-52	1 (m)	Asiatisch	7J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	SNP- Array: OB	+	BBS1 ^{A,A} , BBS2 ^{A,A} , BBS3 ^A , BBS4 ^A , BBS5 ^A , BBS6 ^A , BBS7 ^A , BBS8 ^A , BBS9 ^A , BBS10 ^{A,S} , BBS11 ^A , BBS12 ^A , BBS13 ^A , BBS14 ^{A,A} , BBS15 ^A	BBS10: p.Tyr559X _(n) ^{ho}
BBS-53	1 (w)	KI	6J	+	+ (MR)	-	-	-	-	SNP- Array: OB	C/C 1G	BBS1 ^{AH} , BBS2 ^{A,S} , BBS3 ^A , BBS4 ^A , BBS5 ^A , BBS6 ^A , BBS7 ^A , BBS8 ^A , BBS9 ^A , BBS10 ^A , BBS11 ^A , BBS12 ^A , BBS13 ^A , BBS14 ^A , BBS15 ^A	BBS2: p.Val1510Phe _(s) ^{ho}

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Acipositas	Entwicklung	Postaxiale Polydaktylie	Visus- beteiligung	Nierenbe- teiligung	Weitere Symptome	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
BBS-54	1 (m)	Libanesische	3J	KI	KI	+	KI	KI	KI	SNP- Array: OB	C/C 1G	BBS1 ^A BBS2 ^A BBS3 ^A BBS4 ^A BBS5 ^{A,S} BBS6 ^A BBS7 ^A BBS8 ^A BBS9 ^A BBS10 ^A BBS11 ^A BBS12 ^A BBS13 ^A BBS14 ^A BBS15 ^A	-
BBS-55	1 (m)	Irakisch	7J	+	+(MR)	+	+(RP)	-	-	SNP- Array: OB	C/C 2G	BBS1 ^A BBS2 ^A BBS3 ^A BBS4 ^{A,S} BBS5 ^{A,S} BBS6 ^A BBS7 ^A BBS8 ^A BBS9 ^A BBS10 ^A BBS11 ^A BBS12 ^A BBS13 ^A BBS14 ^A BBS15 ^A	<u>BBS4</u> : p.Glu136ValfsX27 ^{ho} (del)
BBS-56	1 (w)	Portugiesisch	18J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS10 ^S	BBS10: p.Cys91LeufsX5 ^{ho} (dup)
BBS-57	1 (w)	Türkisch	13J	+	+(LB)	-	-	+	Dilatative Kardio- myopathie, Schwerhörigkeit, Diabetes mellitus, Wachstums- hormonmangel, kariöse Zähne	SNP- Array: OB	C/C 2G	BBS1 ^A BBS2 ^A BBS3 ^A BBS4 ^A BBS5 ^{A,S} BBS6 ^A BBS7 ^{A,S} BBS8 ^A BBS9 ^A BBS10 ^A BBS11 ^S BBS12 ^{A,S} BBS13 ^A BBS14 ^A BBS15 ^A	-

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Acipositas	Entwicklung	Postaxiale Polydaktylie	Visus- beteiligung	Nierenbe- teiligung	Weitere Symptome	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
BBS-58	1 (w, Mutter)	KI	KI	+	KI	+	+ (RP)	KI	-	SNP- Array: OB	C/C 1G	BBS1 ^A , BBS2 ^A , BBS3 ^A , BBS4 ^{A,s} , BBS5 ^A , BBS6 ^A , BBS7 ^{A,s} , BBS8 ^A , BBS9 ^A , BBS10 ^A , BBS11 ^{A,s} , BBS12 ^{A,s} , BBS13 ^A , BBS14 ^A , BBS15 ^A , RET ^S	BBS7: p.Cys243Tyr ^(m) ^{ho}
	1 (w, Tochter)												
BBS-59	1 (w)	Deutsch	5J	+	+ (EWW)	+	+ (PR)	KI	AnaIatresie	OB	-	BBS1 ^S , BBS2 ^S , BBS6 ^S , BBS10 ^S , BBS12 ^S	-
BBS-60	1 (m)	Deutsch	Perinatal	+	+ (EWW)	+	KI	+	HG, Retrognathie	-	-	BBS1 ^S , BBS2 ^S , BBS4 ^S , BBS6 ^S , BBS8 ^S , BBS9 ^S , BBS10 ^S , BBS12 ^S	BBS8: p.Met305IlefsX15 ^(del) ^{ho}
BBS-61	1 (m)	KI	5J	+	-	+	+ (PR)	-	-	-	-	BBS6 ^S , ALMS1 ^S	-
BBS-62	1 (w)	Türkisch	Perinatal	+	-	+	-	-	-	SNP- Array: OB	C/C 1G	BBS1 ^{A,s} , BBS2 ^A , BBS3 ^A , BBS4 ^A , BBS5 ^A , BBS6 ^A , BBS7 ^A , BBS8 ^A , BBS9 ^A , BBS10 ^A , BBS11 ^A , BBS12 ^A , BBS13 ^A , BBS14 ^A , BBS15 ^A	BBS1: c.48-1G>A ⁽⁶⁾ ^{ho}

8. Anhang

Familie	Betroffene	Herkunft	Diagnose- stellung	Acipositas	Entwicklung	Postaxiale Polydaktylie	Visus- beteiligung	Nierenbe- teiligung	Weitere Symptome	Chrom.- befund	Ko.	Analytik	Befund
BBS-63	1 (m)	Nieder- ländisch	10J	+	+ (MR)	+	-	-	Kryptorchismus	-	-	BBS1 ^c , BBS2 ^c , BBS3 ^c , BBS4 ^c , BBS5 ^c , BBS6 ^c , BBS7 ^c , BBS8 ^c , BBS9 ^c , BBS10 ^{cs} , BBS11 ^c , BBS12 ^c , BBS13 ^c	BBS10: p.Cys91LeufsX5 _(10p) ^{he} , p.Ser169Pro(m)
BBS-64	1 (m)	KI	Perinatal	+	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^h , BBS10 ^h	-
BBS-65	1 (w)	Deutsch	11J	KI	KI	KI	KI	KI	KI	-	-	BBS1 ^s , BBS2 ^s , BBS4 ^s , BBS6 ^s , BBS9 ^s , BBS10 ^s , BBS12 ^s	-
BBS-66	1 (Fet)	Deutsch	Pränatal	-	KI	-	KI	+/- (einseitige NA)	Hydrometrokolpos	-	-	BBS6 ^s	-

8. Anhang

Tabelle A4: Liste der Publikationen, die bezüglich der Mutationshäufigkeiten der verschiedenen MKS-Gene ausgewertet wurde.

1)	Karmous-Benailly H, Martinovic J, Gubler MC, et al.: Antenatal presentation of Bardet-Biedl syndrome may mimic Meckel syndrome. <i>Am J Hum Genet.</i> 2005, 76:493-504.
2) ^{P1}	Kyttälä M, Tallila J, Salonen R, et al.: MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel syndrome. <i>Nat Genet.</i> 2006, 38:155-157.
3)	Smith UM, Consugar M, Tee LJ, et al.: The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat. <i>Nat Genet.</i> 2006, 38:191-196.
4) ^{P2}	Khaddour R, Smith U, Baala L, et al.: Spectrum of MKS1 and MKS3 mutations in Meckel syndrome: a genotype-phenotype correlation. Mutation in brief #960. Online. <i>Hum Mutat.</i> 2007, 28:523-524.
5) ^{P3}	Auber B, Burfeind P, Herold S, et al.: A disease causing deletion of 29 base pairs in intron 15 in the MKS1 gene is highly associated with the campomelic variant of the Meckel-Gruber syndrome. <i>Clin Genet.</i> 2007, 72:454-459.
6) ^{P4}	Consugar MB, Kubly VJ, Lager DJ, et al.: Molecular diagnostics of Meckel-Gruber syndrome highlights phenotypic differences between MKS1 and MKS3. <i>Hum Genet.</i> 2007, 121:591-599.
7)	Frank V, Ortiz Brüche N, Mager S, et al.: Aberrant splicing is a common mutational mechanism in MKS1, a key player in Meckel-Gruber syndrome. <i>Hum Mutat.</i> 2007, 28:638-639. (eigene Patienten daher zunächst ausgenommen)
8)	Baala L, Audollent S, Martinovic J, et al.: Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome. <i>Am J Hum Genet.</i> 2007, 81:170-179.
9)	Delous M, Baala L, Salomon R, et al.: The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. <i>Nat Genet.</i> 2007, 39:875-881.
10)	Frank V, den Hollander AI, Brüche NO, et al.: Mutations of the CEP290 gene encoding a centrosomal protein cause Meckel-Gruber syndrome. <i>Hum Mutat.</i> 2008, 29:45-52. (eigene Patienten daher zunächst ausgenommen)
11) ^{P5}	Tallila J, Jakkula E, Peltonen L, Salonen R, Kestilä M: Identification of CC2D2A as a Meckel syndrome gene adds an important piece to the ciliopathy puzzle. <i>Am J Hum Genet.</i> 2008, 82:1361-1367.
12)	Bergmann C, Fliegauf M, Brüche NO, et al.: Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. <i>Am J Hum Genet.</i> 2008, 82:959-970. (eigene Patienten daher zunächst ausgenommen)
13)	Tallila J, Salonen R, Kohlschmidt N, Peltonen L, Kestilä M: Mutation spectrum of Meckel syndrome genes: one group of syndromes or several distinct groups? <i>Hum Mutat.</i> 2009, 30:E813-830.

8. Anhang

14) ^{P6}	<p>Tallila J, Salonen R, Kohlschmidt N, Peltonen L, Kestilä M: Mutation spectrum of Meckel syndrome genes: one group of syndromes or several distinct groups? <i>Hum Mutat</i> 2009, 30: E813-830. (In Verbindung mit Dissertation siehe 13)</p>
15)	<p>Gunay-Aygun M, Parisi MA, Doherty D, et al.: MKS3-related ciliopathy with features of autosomal recessive polycystic kidney disease, nephronophthisis, and Joubert Syndrome. <i>J Pediatr.</i> 2009, 155:386-392.e381.</p>
16)	<p>Travaglini L, Brancati F, Attie-Bitach T, et al.: Expanding CEP290 mutational spectrum in ciliopathies. <i>Am J Med Genet A.</i> 2009, 149A:2173-2180.</p>
17) ^{P7}	<p>Mougou-Zerelli S, Thomas S, Szenker E et al: CC2D2A mutations in Meckel and Joubert syndromes indicate a genotype-phenotype correlation. <i>Hum Mutat</i> 2009; 30: 1574-1582.</p>
18)	<p>Putoux A, Mougou-Zerelli S, Thomas S, et al.: BBS10 mutations are common in 'Meckel'-type cystic kidneys. <i>J Med Genet.</i> 2010, 47:848-852.</p>
19)	<p>Kim SK, Shindo A, Park TJ, et al.: Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. <i>Science.</i> 2010, 329:1337-1340.</p>
20)	<p>Valente EM, Logan CV, Mougou-Zerelli S, et al.: Mutations in TMEM216 perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes. <i>Nat Genet.</i> 2010, 42:619-625.</p>
21) ^{P8}	<p>Iannicelli M, Brancati F, Mougou-Zerelli S, et al.: Novel TMEM67 mutations and genotype-phenotype correlates in meckelin-related ciliopathies. <i>Hum Mutat.</i> 2010, 31:E1319-1331.</p>
22)	<p>Coppieters F, Lefever S, Leroy BP, De Baere E: CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. <i>Hum Mutat.</i> 2010, 31:1097-1108.</p>
23)	<p>Fiskerstrand T, Houge G, Sund S, et al.: Identification of a gene for renal-hepatic-pancreatic dysplasia by microarray-based homozygosity mapping. <i>J Mol Diagn.</i> 2010, 12:125-131.</p>
24)	<p>Shaheen R, Faqeih E, Seidahmed MZ, et al.: A TCTN2 mutation defines a novel Meckel Gruber syndrome locus. <i>Hum Mutat.</i> 2011, 32:573-578.</p>
25)	<p>Dowdle WE, Robinson JF, Kneist A, et al.: Disruption of a ciliary B9 protein complex causes Meckel syndrome. <i>Am J Hum Genet.</i> 2011, 89:94-110. (eigene Patienten daher zunächst ausgenommen)</p>
26)	<p>Hopp K, Heyer CM, Hommerding CJ, et al.: B9D1 is revealed as a novel Meckel syndrome (MKS) gene by targeted exon-enriched next-generation sequencing and deletion analysis. <i>Hum Mol Genet.</i> 2011, 20:2524-2534.</p>
27)	<p>Otto EA, Ramaswami G, Janssen S, et al.: Mutation analysis of 18 nephronophthisis associated ciliopathy disease genes using a DNA pooling and next generation sequencing strategy. <i>J Med Genet.</i> 2011, 48:105-116.</p>
28)	<p>Bachmann-Gagescu R, Ishak GE, Dempsey JC, et al.: Genotype-phenotype correlation in CC2D2A-related Joubert syndrome reveals an association with ventriculomegaly and seizures. <i>J Med Genet.</i> 2012, 49:126-137.</p>

8. Anhang

Tabelle A5: Liste der Publikationen, die bezüglich der Mutationshäufigkeiten der verschiedenen JS-Gene ausgewertet wurde.

1)	Parisi M, Glass I: Joubert Syndrome and Related Disorders. In R. A. Pagon, T. D. Bird, C. R. Dolan, K. Stephens and M. P. Adam (eds), <i>GeneReviews</i> . Seattle WA: University of Washington, Seattle, 2003 [updated 2012].
2)	Parisi MA, Bennett CL, Eckert ML, et al.: The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. <i>Am J Hum Genet.</i> 2004, 75:82-91.
3)	Ferland RJ, Eyaid W, Collura RV, et al.: Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in AHI1 in Joubert syndrome. <i>Nat Genet.</i> 2004, 36:1008-1013.
4)	Dixon-Salazar T, Silhavy JL, Marsh SE, et al.: Mutations in the AHI1 gene, encoding joubertin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria. <i>Am J Hum Genet.</i> 2004, 75:979-987.
5)	Castori M, Valente EM, Donati MA, et al.: NPHP1 gene deletion is a rare cause of Joubert syndrome related disorders. <i>J Med Genet.</i> 2005, 42:e9.
6)	Utsch B, Sayer JA, Attanasio M, et al.: Identification of the first AHI1 gene mutations in nephronophthisis-associated Joubert syndrome. <i>Pediatr Nephrol.</i> 2006, 21:32-35.
7) ^{P1}	Valente EM, Brancati F, Silhavy JL, et al.: AHI1 gene mutations cause specific forms of Joubert syndrome-related disorders. <i>Ann Neurol.</i> 2006, 59:527-534.
8) ^{P2}	Parisi MA, Doherty D, Eckert ML, et al.: AHI1 mutations cause both retinal dystrophy and renal cystic disease in Joubert syndrome. <i>J Med Genet.</i> 2006, 43:334-339.
9)	Valente EM, Silhavy JL, Brancati F, et al.: Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. <i>Nat Genet.</i> 2006, 38:623-625.
10)	Sayer JA, Otto EA, O'Toole JF, et al.: The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. <i>Nat Genet.</i> 2006, 38:674-681.
11)	Baala L, Romano S, Khaddour R, et al.: The Meckel-Gruber syndrome gene, MKS3, is mutated in Joubert syndrome. <i>Am J Hum Genet.</i> 2007, 80:186-194.
12)	Parisi MA, Doherty D, Chance PF, Glass IA: Joubert syndrome (and related disorders) (OMIM 213300). <i>Eur J Hum Genet.</i> 2007, 15:511-521.
13)	Tory K, Lacoste T, Burglen L, et al.: High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations. <i>J Am Soc Nephrol.</i> 2007, 18:1566-1575.

8. Anhang

14) ^{P3}	<p>Brancati F, Barrano G, Silhavy JL, et al.: CEP290 mutations are frequently identified in the oculo-renal form of Joubert syndrome-related disorders. <i>Am J Hum Genet.</i> 2007, 81:104-113.</p>
15)	<p>Delous M, Baala L, Salomon R, et al.: The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. <i>Nat Genet.</i> 2007, 39:875-881.</p>
16)	<p>Helou J, Otto EA, Attanasio M, et al.: Mutation analysis of NPHP6/CEP290 in patients with Joubert syndrome and Senior-Løken syndrome. <i>J Med Genet.</i> 2007, 44:657-663.</p>
17)	<p>Wolf MT, Saunier S, O'Toole JF, et al.: Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis. <i>Kidney Int.</i> 2007, 72:1520-1526.</p>
18) ^{P4}	<p>Kroes HY, van Zon PH, Franssen van de Putte D, et al.: DNA analysis of AHI1, NPHP1 and CYCLIN D1 in Joubert syndrome patients from the Netherlands. <i>Eur J Med Genet.</i> 2008, 51:24-34.</p>
19) ^{P5}	<p>Valente EM, Brancati F, Dallapiccola B: Genotypes and phenotypes of Joubert syndrome and related disorders. <i>Eur J Med Genet.</i> 2008, 51:1-23.</p>
20)	<p>Cantagrel V, Silhavy JL, Bielas SL, et al.: Mutations in the cilia gene ARL13B lead to the classical form of Joubert syndrome. <i>Am J Hum Genet.</i> 2008, 83:170-179.</p>
21)	<p>Gorden NT, Arts HH, Parisi MA, et al.: CC2D2A is mutated in Joubert syndrome and interacts with the ciliopathy-associated basal body protein CEP290. <i>Am J Hum Genet.</i> 2008, 83:559-571.</p>
22)	<p>Brancati F, Iannicelli M, Travaglini L, et al.: MKS3/TMEM67 mutations are a major cause of COACH Syndrome, a Joubert Syndrome related disorder with liver involvement. <i>Hum Mutat.</i> 2009, 30:E432-442.</p>
23)	<p>Bielas SL, Silhavy JL, Brancati F, et al.: Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidylinositol signaling to the ciliopathies. <i>Nat Genet.</i> 2009, 41:1032-1036.</p>
24) ^{P6}	<p>Doherty D: Joubert syndrome: insights into brain development, cilium biology, and complex disease. <i>Semin Pediatr Neurol.</i> 2009, 16:143-154.</p>
25)	<p>Gunay-Aygun M, Parisi MA, Doherty D, et al.: MKS3-related ciliopathy with features of autosomal recessive polycystic kidney disease, nephronophthisis, and Joubert Syndrome. <i>J Pediatr.</i> 2009, 155:386-392.e381.</p>
26)	<p>Schurman SJ, Scheinman SJ: Inherited cerebrorenal syndromes. <i>Nat Rev Nephrol.</i> 2009, 5:529-538.</p>
27)	<p>Coene KL, Roepman R, Doherty D, et al.: OFD1 is mutated in X-linked Joubert syndrome and interacts with LCA5-encoded lebercilin. <i>Am J Hum Genet.</i> 2009, 85:465-481.</p>
28)	<p>Travaglini L, Brancati F, Attie-Bitach T, et al.: Expanding CEP290 mutational spectrum in ciliopathies. <i>Am J Med Genet A.</i> 2009, 149A:2173-2180.</p>

8. Anhang

29)	Otto EA, Tory K, Attanasio M, et al.: Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11). <i>J Med Genet.</i> 2009, 46:663-670.
30)	Parisi MA: Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders. <i>Am J Med Genet C Semin Med Genet.</i> 2009, 151C:326-340.
31)	Mougou-Zerelli S, Thomas S, Szenker E, et al.: CC2D2A mutations in Meckel and Joubert syndromes indicate a genotype-phenotype correlation. <i>Hum Mutat.</i> 2009, 30:1574-1582.
32)	Brancati F, Dallapiccola B, Valente EM: Joubert Syndrome and related disorders. <i>Orphanet J Rare Dis.</i> 2010, 5:20.
33)	Edvardson S, Shaag A, Zenvirt S, et al.: Joubert syndrome 2 (JBTS2) in Ashkenazi Jews is associated with a TMEM216 mutation. <i>Am J Hum Genet.</i> 2010, 86:93-97.
34)	Doherty D, Parisi MA, Finn LS, et al.: Mutations in 3 genes (MKS3, CC2D2A and RPGRIP1L) cause COACH syndrome (Joubert syndrome with congenital hepatic fibrosis). <i>J Med Genet.</i> 2010, 47:8-21.
35) ^{P7}	Iannicelli M, Brancati F, Mougou-Zerelli S, et al.: Novel TMEM67 mutations and genotype-phenotype correlates in meckelin-related ciliopathies. <i>Hum Mutat.</i> 2010, 31:E1319-1331.
36)	Valente EM, Logan CV, Mougou-Zerelli S, et al.: Mutations in TMEM216 perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes. <i>Nat Genet.</i> 2010, 42:619-625.
37)	Otto EA, Ramaswami G, Janssen S, et al.: Mutation analysis of 18 nephronophthisis associated ciliopathy disease genes using a DNA pooling and next generation sequencing strategy. <i>J Med Genet.</i> 2011, 48:105-116.
38)	Davis EE, Zhang Q, Liu Q, et al.: TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. <i>Nat Genet.</i> 2011, 43:189-196.
39)	Dafinger C, Liebau MC, Elsayed SM, et al.: Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. <i>J Clin Invest.</i> 2011, 121:2662-2667.
40)	Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, et al.: A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. <i>Nat Genet.</i> 2011, 43:776-784.
41)	Valente EM, Brancati F, Boltshauser E, Dallapiccola B: Clinical utility gene card for: Joubert syndrome. <i>Eur J Hum Genet.</i> 2011, 19.
42)	Huang L, Szymanska K, Jensen VL, et al.: TMEM237 is mutated in individuals with a Joubert syndrome related disorder and expands the role of the TMEM family at the ciliary transition zone. <i>Am J Hum Genet.</i> 2011, 89:713-730.
43)	Poretti A, Vitiello G, Hennekam RC, et al.: Delineation and diagnostic criteria of Oral-Facial-Digital Syndrome type VI. <i>Orphanet J Rare Dis.</i> 2012, 7:4.

8. Anhang

44)	Bachmann-Gagescu R, Ishak GE, Dempsey JC, et al.: Genotype-phenotype correlation in CC2D2A-related Joubert syndrome reveals an association with ventriculomegaly and seizures. <i>J Med Genet.</i> 2012, 49:126-137.
45)	Lee JE, Silhavy JL, Zaki MS, et al.: CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. <i>Nat Genet.</i> 2012, 44:193-199.
46)	Lee JH, Silhavy JL, Lee JE, et al.: Evolutionarily assembled cis-regulatory module at a human ciliopathy locus. <i>Science.</i> 2012, 335:966-969.
47)	Srouf M, Schwartzenruber J, Hamdan FF, et al.: Mutations in C5ORF42 cause Joubert syndrome in the French Canadian population. <i>Am J Hum Genet.</i> 2012, 90:693-700.
48)	Juric-Sekhar G, Adkins J, Doherty D, Hevner RF: Joubert syndrome: brain and spinal cord malformations in genotyped cases and implications for neurodevelopmental functions of primary cilia. <i>Acta Neuropathol.</i> 2012, 123:695-709.
49) ^{P8}	Alazami AM, Alshammari MJ, Salih MA, et al.: Molecular characterization of Joubert syndrome in Saudi Arabia. <i>Hum Mutat.</i> 2012.
50)	Dixon-Salazar TJ, Silhavy JL, Udpa N, et al.: Exome sequencing can improve diagnosis and alter patient management. <i>Sci Transl Med.</i> 2012, 4:138ra178.
51)	Field M, Scheffer IE, Gill D, et al.: Expanding the molecular basis and phenotypic spectrum of X-linked Joubert syndrome associated with OFD1 mutations. <i>Eur J Hum Genet.</i> 2012, 20:806-809.

Tabelle A6: Liste der Publikationen mit Angaben zu Mutationshäufigkeiten in den entsprechenden BBS-Genen.

1) ^{P1}	Waters AM, Beales PL: Bardet-Biedl Syndrome. In R. A. Pagon, T. D. Bird, C. R. Dolan, K. Stephens and M. P. Adam (eds), <i>GeneReviews</i> . Seattle WA: University of Washington, Seattle, 1993 [updated 2011].
2) ^{P2}	Muller J, Stoetzel C, Vincent MC, et al.: Identification of 28 novel mutations in the Bardet-Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease. <i>Hum Genet.</i> 2010, 127:583-593.
3) ^{P3}	Sapp JC, Nishimura D, Johnston JJ, et al.: Recurrence risks for Bardet-Biedl syndrome: Implications of locus heterogeneity. <i>Genet Med.</i> 2010, 12:623-627.
4) ^{P4}	Deveault C, Billingsley G, Duncan JL, et al.: BBS genotype-phenotype assessment of a multiethnic patient cohort calls for a revision of the disease definition. <i>Hum Mutat.</i> 2011, 32:610-619.
5) ^{P5}	Mockel A, Perdomo Y, Stutzmann F, et al.: Retinal dystrophy in Bardet-Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. <i>Prog Retin Eye Res.</i> 2011, 30:258-274.

Eigene Publikationen

2012

Zerres K, Eggermann T, Rudnik-Schöneborn S, **Ortiz Brüchle N** (2012) Zystische Nierenerkrankungen. Dialyse aktuell 16: 500-511

Spengler S, Begemann M, **Ortiz Brüchle N**, Baudis M, Denecke B, Kroisel PM, Oehl-Jaschkowitz B, Schulze B, Raabe-Meyer G, Spaich C, Blümel P, Jauch A, Moog U, Zerres K, Eggermann T (2012) Molecular karyotyping as a relevant diagnostic tool in children with growth retardation with silver-russell features. J Pediatr 161: 933-942

Zerres K, **Ortiz Brüchle N** (2012) [Cystic kidney diseases]. Internist (Berl) 53: 419-428

Eckmann-Scholz C, Jonat W, Zerres K, **Ortiz-Brüchle N** (2012) Earliest ultrasound findings and description of splicing mutations in Meckel-Gruber syndrome. Arch Gynecol Obstet 286: 917-921

Gründahl JE, Guan Z, Rust S, Reunert J, Müller B, Du Chesne I, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, **Ortiz-Brüchle N**, Häusler MG, Siedlecka J, Swiezewska E, Raetz CR, Marquardt T (2012) Life with too much polyprenol: polyprenol reductase deficiency. Mol Genet Metab 105: 642-651

Neumann HP, Bacher J, Nabulsi Z, **Ortiz Brüchle N**, Hoffmann MM, Schaeffner E, Nürnberger J, Cybulla M, Wilpert J, Riegler P, Corradini R, Kraemer-Guth A, Azurmendi P, Nunez M, Gläsker S, Zerres K, Jilg C (2012) Adult patients with sporadic polycystic kidney disease: the importance of screening for mutations in the PKD1 and PKD2 genes. Int Urol Nephrol

Neumann HP, Malinoc A, Bacher J, Nabulsi Z, Ivanovas V, **Bruechle NO**, Mader I, Hoffmann MM, Riegler P, Kraemer-Guth A, Burchardi C, Schaeffner E, Martin RS, Azurmendi PJ, Zerres K, Jilg C, Eng C, Gläsker S (2012) Characteristics of intracranial aneurysms in the else kröner-fresenius registry of autosomal dominant polycystic kidney disease. Cerebrovasc Dis Extra 2: 71-79

2011

Bergmann C, von Bothmer J, **Ortiz Brüchle N**, Venghaus A, Frank V, Fehrenbach H, Hampel T, Pape L, Buske A, Jonsson J, Sarioglu N, Santos A, Ferreira JC, Becker JU, Cremer R, Hoefele J, Benz MR, Weber LT, Buettner R,

Eigene Publikationen

Zerres K (2011) Mutations in multiple PKD genes may explain early and severe polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22: 2047-2056

2010

Ortiz Brüchle N, Venghaus A, von Bothmer J, Rudnik-Schöneborn S, Eggermann T, Bergmann C, Zerres K (2010) Zystennieren – eine Übersicht. *Medizinische Genetik* 22: 322-331

2008

Bergmann C, **Brüchle NO**, Frank V, Rehder H, Zerres K (2008) Perinatal deaths in a family with autosomal dominant polycystic kidney disease and a PKD2 mutation. *N Engl J Med* 359: 318-319

Bergmann C, Fliegau M, **Brüchle NO**, Frank V, Olbrich H, Kirschner J, Schermer B, Schmedding I, Kispert A, Kränzlin B, Nürnberg G, Becker C, Grimm T, Girschick G, Lynch SA, Kelehan P, Senderek J, Neuhaus TJ, Stallmach T, Zentgraf H, Nürnberg P, Gretz N, Lo C, Lienkamp S, Schäfer T, Walz G, Benzing T, Zerres K, Omran H (2008) Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am J Hum Genet* 82: 959-970

Brüchle NO, Frank J, Frank V, Senderek J, Akar A, Koc E, Rigopoulos D, van Steensel M, Zerres K, Bergmann C (2008) RSPO4 is the major gene in autosomal-recessive anonychia and mutations cluster in the furin-like cysteine-rich domains of the Wnt signaling ligand R-spondin 4. *J Invest Dermatol* 128: 791-796

Frank V, den Hollander AI, **Brüchle NO**, Zonneveld MN, Nürnberg G, Becker C, Du Bois G, Kendziorra H, Roosing S, Senderek J, Nürnberg P, Cremers FP, Zerres K, Bergmann C (2008) Mutations of the CEP290 gene encoding a centrosomal protein cause Meckel-Gruber syndrome. *Hum Mutat* 29: 45-52

2007

Frank V, **Ortiz Brüchle N**, Mager S, Frints SG, Bohring A, du Bois G, Debatin I, Seidel H, Senderek J, Besbas N, Todt U, Kubisch C, Grimm T, Teksen F, Balci S, Zerres K, Bergmann C (2007) Aberrant splicing is a common mutational mechanism in MKS1, a key player in Meckel-Gruber syndrome. *Hum Mutat* 28: 638-639

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Klaus Zerres für das Ermöglichen der Promotion am Institut, die Bereitstellung meines Dissertationsthemas und die engagierte Betreuung, die konstruktiven gedanklichen Beiträge und die allumfassende Unterstützung.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. rer. nat. Thomas Eggermann für die konstruktiven Beiträge, die organisatorische Hilfe, vor allem aber für die unerschütterliche seelische und moralische Unterstützung.

Mein Dank gilt außerdem dem technischen Institutspersonal und den weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern der AG Zystennieren für die praktische Unterstützung und das familiäre Arbeitsklima.

Darüber hinaus danke ich:

...den Einsendern und Familien.

...den weiteren Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche Unterstützung bei Problemen und Fragen.

Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei M. Sc. Andreas Venghaus für die schöne gemeinsame Zeit bei „den Zystennieren“, die Loyalität und Unterstützung und die freundschaftlichen „Nicht-Raucher-Pausen“ sowie bei Dipl. Biol. Matthias Begemann und Dr. rer. nat. Sabrina Spengler für ihren kreativen Input und die legendären Diskussionen in den Mittagspausen, die niemals Langeweile aufkommen ließen.

Mein besonderer Dank gilt Florian Krebs und meiner Familie.

Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zugrunde liegenden Originaldaten am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

Erklärung zum Eigenanteil

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 10 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Frau **Nadina Ortiz Brüchle**, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „*Syndromale Ziliopathien –Molekulargenetische Aufklärung als methodische Herausforderung*“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Die Auswertung und Planung sämtlicher in der Arbeit aufgeführten Ergebnisse sowie die Erfassung und statistische Auswertung von allen klinischen und genetischen Daten des eigenen Kollektivs und der einbezogenen Literaturdaten.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

- Prof. Dr. med. K. Zerres, Humangenetik Aachen: Betreuung und Erarbeitung der Fragestellung und Auswertung der klinischen Daten
- Prof. Dr. rer. nat. T. Eggermann, Humangenetik Aachen: Unterstützung bei der Erhebung, Analyse und Auswertung der molekulargenetischen Daten
- Technisches Institutsperson und wissenschaftliche Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Zystennieren, Humangenetik Aachen: Bei der Generierung der molekular-genetischen Daten als Grundlage für diese Arbeit

Nadina Ortiz Brüchle

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Frau
Nadina Ortiz Brüchle.

Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Zerres

Persönliche Angaben

Name: Ortiz Brühle
Vorname: Nadina Carola
Geburtstag: 21.05.1978
Geburtsort: Wilhelmshaven
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Qualifikation

1997 Abitur, Gymnasium Cäcilienchule Wilhelmshaven
1997-1998 Fortbildung in den Fremdsprache
Spanisch und Englisch, Dolmetscher Institut Münster,
zweite Muttersprache: Spanisch
11.1998 Beginn Studium der Veterinärmedizin, LMU München
04.2006 Abschluss des Studiums der Veterinärmedizin, LMU
München

Praktika, Berufstätigkeit und Weiterbildung

04.2002 Klinisches Praktikum, Pets Unlimited, San Francisco (USA)
04.-06.2003 Molekularimmunologisches Praktikum, LMU, München
01.-03.2004 Mikrobiologisches Praktikum, Stadtveterinäramt, Karlsruhe

08.2002-07.2003 Tätigkeit als studentische Hilfskraft, Institut für
Tierphysiologie, LMU München
07.2006 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Humangenetik des Universitätsklinikums Aachen zur
Promotion in Teilzeit
seit 07.2009 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin in Vollzeit am
Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Aachen
zur Promotion und als verantwortliche betreuende
Molekulargenetikerin der Diagnostik von erblichen
zystischen Nierenerkrankungen der AG
Zystennieren/Ziliopathien

seit 07.2006 Weiterbildung zur Fachhumangenetikerin GfH am Institut
für Humangenetik, Universitätsklinikum der RWTH Aachen