

**Einsatz der Next-Generation-Sequenzierung in der
Erforschung und molekulargenetischen Diagnostik
neurodegenerativer Erkrankungen und
Bewegungsstörungen**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Stefanie Krüger (geb. Kleinmichel)
aus Würzburg

Tübingen
2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

11.01.2017

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Gasser

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alfred Nordheim

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Gasser und Herrn Prof. Dr. Alfred Nordheim für die kompetente Betreuung meiner Promotion sowie für die zahlreichen Anregungen und konstruktiven Diskussionen, die meiner Arbeit zugutegekommen sind. Zudem möchte ich Prof. Dr. Hanspeter A. Mallot und Prof. Dr. Andreas Nieder danken, dass sie als zusätzliche Prüfer an meiner Disputation teilnehmen.

Ein großer Dank geht außerdem an Frau Dr. Dr. Saskia Biskup, die meine Promotion bei der CeGaT GmbH Tübingen ermöglicht und mir damit die Ressourcen zur Anfertigung meiner Dissertation zur Verfügung gestellt hat. Durch ihr enormes Wissen im Bereich der Genetik neurodegenerativer Erkrankungen hat sie meine Arbeit kontinuierlich durch spannende Denkanstöße bereichert und stand mir dabei jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der CeGaT GmbH dafür danken, dass sie ihr Wissen und ihre Erfahrungen mit mir geteilt haben und dadurch ein großer Gewinn für mich waren und auch über diese Arbeit hinaus bleiben werden. Ich danke zudem allen Partnern der CeGaT GmbH für die gute und vertrauensvolle Zusammenarbeit im Rahmen der verschiedenen Projekte, auf denen meine Dissertation basiert.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mich stets bei all meinen Plänen unterstützen und hinter mir stehen. Mein größter Dank gilt meinem Mann Carsten, der mich durch seinen Optimismus immer wieder motiviert hat. Mit seiner Unterstützung, seinem Verständnis und seiner Liebe hat er mich durch alle Höhen und Tiefen meiner Promotion begleitet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abstract (Deutsch)	VII
Abstract (English)	VIII
Liste der Publikationen der Dissertation	IX
Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen	X
Publikationen	X
Eingereichte Manuskripte	XIV
1. Einleitung	1
1.1 Definition und Aufgaben der Humangenetik	1
1.2 Neurodegenerative Erkrankungen und übergeordnete Pathomechanismen ..	3
1.2.1 Proteinaggregation	3
1.2.2 Fehlerhafte Proteindegradierung.....	4
1.2.3 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress	5
1.2.4 Eisen-induzierte Neurodegeneration	6
1.3 Der Einsatz der Next-Generation-Sequenzierung in der humangenetischen Forschung und molekulargenetischen Diagnostik	7
1.4 Strategien der Next-Generation-Sequenzierung	9
1.4.1 Panel-Sequenzierung	9
1.4.2 Exom-Sequenzierung	10
1.4.3 Genom-Sequenzierung	11
1.5 Herausforderungen und Limitationen der NGS-Technologie	12
2. Zielsetzung	16
3. Material und Methoden	17
3.1 DNA-Isolation und Erstellung von DNA-Arbeitsverdünnungen	17
3.2 Primer-Design	17
3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
3.4 Gelelektrophorese	19

3.5 Sanger-Sequenzierung	19
3.6 Segregationsanalyse	20
3.7 C9orf72-Repeatanalyse	20
3.8 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)	21
3.9 Quantitative real-time PCR	22
3.10 Panel-Update	22
3.11 Next-Generation-Sequenzierung (NGS)	22
3.12 Auswertung von NGS-Daten und Beurteilung detektierter Varianten	25
3.13 Erstellung von Befundbriefen	27
3.14 Etablierung eines Amplikon-basierten NGS-Ansatzes	27
3.15 Statistische Methoden	30
4. Ergebnisse und Diskussion	31
4.1 Panel-Design	31
4.2 Panel-Sequenzierung in einer deutschen ALS-Kohorte	32
4.2.1 Hintergrund	32
4.2.2 Ergebnisse und Diskussion.....	34
4.3 Identifikation eines Kandidatengens für Erkrankungen aus dem NBIA-Spektrum	42
4.3.1 Hintergrund	42
4.3.2 Ergebnisse und Diskussion.....	44
4.4 Evidenz für CHCHD10 als ALS-Gen	46
4.4.1 Hintergrund	46
4.4.2 Ergebnisse und Diskussion.....	47
4.5 Exom-Sequenzierung zur Identifikation von Kandidatengenen für Dystonie	51
4.5.1 Hintergrund	51
4.5.2 Ergebnisse und Diskussion.....	53
5. Ausblick	64
Literaturverzeichnis	i
Anhang [A1 - A10]	xii

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein

A	Adenin
AAO	Age at onset
ALP	Autophagosom-Lysosom-System
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APBD	Adulte Polyglukosankörper-Erkrankung
AT	Ataxia Teleangiectasia
ATP	Adenosintriphosphat
A β 42	Amyloid-beta 42
bp	Basenpaare
C	Cystein
c.	c.DNA-Position
Ca	Calcium
cDNA	complementary DNA
CeGaT	Center for Genomics and Transcriptomics
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
Del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat,
EVS	Exome Variant Server
ExAC	Exome Aggregation Consortium
fALS	Familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
Fam.	Familie
Fe	Eisen
FTD	Frontotemporale Demenz
G	Guanin
GenDG	Gendiagnostik-Gesetz
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
het	Heterozygot
HSP	Hereditäre spastisch Spinalparalyse
IGV	Integrative Genomics Viewer
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen
MAF	Minor allele frequency
MAF_EA	Minor allele frequency European/American
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MM	Missense Mutation
MT	MutationTaster
NBIA	Neurodegeneration mit Eisenakkumulation im Gehirn
NDD	Neurodegenerative diseases
NG2	NetGene2
ng	Nanogramm

NGS	Next-Generation-Sequenzierung
NM_	Reference sequence transcript
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
NN	Splice Site Prediction by Neural Network
nt	Nukleotid
p.	Protein-Position
Pat	Patient
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDmutDB	Parkinson Disease Mutation Database
pmol	Pikomol
PP-2, PolyPhen2	Polymorphism Phenotyping v2
PROVEAN	Protein Variation Effect Analyzer
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rs	Reference SNP ID
sALS	Sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
<i>sla</i> -Maus	Sex-linked anemia Maus
SMA	Spinale Muskelatrophie
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNV	Single nucleotide variant
T	Thymin
TDP-43	Transactive response DNA binding protein 43 kDa
T_m	Schmelztemperatur
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WES	Whole exome sequencing
WGS	Whole genome sequencing
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter

Gene

ALS2	Alsin
ANG	Angiogenin
ANO3	Anoctamin 3
APEX1	Apex nuclease 1
APP	Amyloid beta A4 precursor protein
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated gene
ATNX2	Ataxin 2
ATP13A2	ATPase, type 13A2
ATP1A3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha-3 polypeptide
ATP7B	ATPase, Cu ²⁺ -transporting, beta polypeptide
ATXN1	Ataxin 1
C19orf12	Chromosome 19 open reading frame 12
C9orf72	Chromosome 9 open reading frame 72

<i>CCS</i>	Copper chaperone for superoxide dismutase
<i>CHCHD10</i>	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 10
<i>CHMP2B</i>	CHMP family, member 2B
<i>CIZ1</i>	CDKN1A-interacting zinc finger protein 1
<i>CP</i>	Ceruloplasmin
<i>DAO</i>	D-Amino acid oxidase
<i>DCAF17</i>	DDB1- and CUL4-associated factor 17
<i>DCTN1</i>	Dynactin 1
<i>DNAJC6</i>	DNAJ/HSP40 homolog, subfamily C, member 6
<i>DPP6</i>	Dipeptidyl peptidase VI
<i>ERLIN2</i>	Endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 2
<i>FA2H</i>	Fatty Acid 2-hydroxylase
<i>FGGY</i>	FGGY carbohydrate kinase domain-containing protein
<i>FIG4</i>	FIG4, s. cervisia, homolog of
<i>FTL</i>	Ferritin light chain
<i>FUS</i>	Fused in sarcoma
<i>GBE1</i>	Glycogen branching enzyme
<i>GCH1</i>	GTP cyclohydrolase I
<i>GLE1</i>	GLE1, s. cervisiae, homolog-like
<i>GNAL</i>	Guanine nucleotide-binding protein, alpha-activating activity polypeptide, olfactory type
<i>GRN</i>	Granulin precursor
<i>HEPH</i>	Hephaestin
<i>HEXA</i>	Hexosaminidase
<i>HFE</i>	HFE gene
<i>HTT</i>	Huntingtin
<i>INPP4A</i>	Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type 1, 107-KD
<i>ITPR2</i>	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2
<i>KCNA1</i>	Potassium channel, voltage-gated, shaker-related subfamily member 1
<i>KIFAP3</i>	Kinesin-associated protein 3
<i>LIF</i>	Leukemia inhibitory factor
<i>MAPT</i>	Microtubule-associated protein tau
<i>NAIP</i>	Neuronal apoptosis inhibitory protein
<i>NEFH</i>	Neurofilament protein, heavy polypeptide
<i>NKX2-1</i>	NK2 homeobox 1
<i>OPTN</i>	Optineurin
<i>PANK2</i>	Pantothenate kinase 2
<i>PARK2</i>	Parkin
<i>PLA2G6</i>	Phospholipase A2, group VI
<i>POLG</i>	Polymerase, DNA, gamma
<i>PON1</i>	Paraoxonase 1
<i>PON2</i>	Paraoxonase 2
<i>PON3</i>	Paraoxonase 3
<i>PRNP</i>	Prion protein
<i>PSEN1</i>	Presenilin 1

<i>RNF19A</i>	Double ring finger protein
<i>SETX</i>	Senataxin
<i>SGCE</i>	Sarcoglycan, epsilon
<i>SLC1A2</i>	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
<i>SNCA</i>	Synuclein, alpha
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1
<i>SPAST</i>	Spastin
<i>SPG11</i>	SPG11 gene
<i>SPG7</i>	SPG7 gene
<i>SPR</i>	Sepiapterin reductase
<i>TAF1</i>	TAF1 RNA polymerase II, TATA box-binding protein-associated factor, 250-KD
<i>TARDBP</i>	TAR DNA-binding protein
<i>TH</i>	Tyrosine hydroxylase
<i>THAP1</i>	Thap domain-containing protein 1
<i>TOR1A</i>	Torsin 1A
<i>TUBB4A</i>	Tubulin, Beta-4A
<i>UNC13A</i>	UNC13, c. elegans, homolog of, A
<i>VAPB</i>	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B
<i>VCP</i>	Valosin-containing protein
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A
<i>VPS13A</i>	Vacuolar protein sorting 13, yeast, homolog of, A
<i>VPS54</i>	Vacuolar protein sorting 54, s. cerevisiae, homolog of
<i>WDR45</i>	WD repeat-containing protein 45
<i>XK</i>	Kell blood group protein, McLeod syndrome-associated
<i>XPA</i>	XPA gene

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ziele der Humangenetik in molekulargenetischer Diagnostik und Forschung	1
Abbildung 2: Vergleichende Gegenüberstellung verschiedener Sequenzieransätze. ..	11
Abbildung 3: NGS-basierte Projekte im jeweiligen methodischen und inhaltlichen Kontext.	31
Abbildung 4: Angewendete Filterschritte nach der Panel-Sequenzierung einer deutschen ALS-Kohorte.	36
Abbildung 5: [A] Schematische Darstellung eines kostengünstigen Amplikon-basierten NGS-Ansatzes zur Sequenzierung einer NBIA-Kohorte [B] Liste von Ausschlussgenen, die mittels eines Amplikon-basierten NGS-Ansatzes analysiert werden sollen	45
Abbildung 6: [A] Stammbaum der Familie mit Mutation im <i>CHCHD10</i> -Gen [B] Schematische Darstellung der angewandten Vorgehensweise zur Identifikation der nachgewiesenen Mutation in <i>CHCHD10</i>	48
Abbildung 7: [A] Die nachgewiesene Mutation im <i>CHCHD10</i> -Gen beim Indexpatienten und zweier weiterer betroffener Familienmitglieder [B-D] Ergebnisse der durchgeführten Segregationsuntersuchungen.....	49
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifikation von Kandidatengenen für Dystonie	54
Abbildung 9: Stammbaum Fam. DYS7.....	55
Abbildung 10: In Fam. DYS7 nachgewiesene Mutationen in <i>ATM</i>	56
Abbildung 11: Stammbaum Fam. DYS11.....	58
Abbildung 12: Stammbaum Fam. DYS54.....	60
Abbildung 13: In Fam. DYS54 nachgewiesene homozygote Deletion in <i>INPP4A</i>	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema und Cycling-Protokoll für Standard-PCR.	18
Tabelle 2: Pipettierschema und Cycling-Protokoll für Standard-Sequenzierreaktion. ...	20
Tabelle 3: Pipettierschema und Cycling-Protokoll für etablierte Multiplex-PCR.	29
Tabelle 4: Patienten gescreent hinsichtlich Varianten in <i>HEPH</i> mittels NGS oder Sanger-Sequenzierung.	45
Tabelle A9-1: Analyzed ALS associated genes in TüRoBo.	Anhang A9, Seite 5
Tabelle A9-2: Identified variants in ALS associated genes.	Anhang A9, Seite 8
Tabelle A9-3: Carriers of pathogenic and intermediate <i>C9orf72</i> repeat expansions including additional non-repeat variants.	Anhang A9, Seite 9
Tabelle A9-4: Co-occurrence of variants in ALS associated genes ..	Anhang A9, Seite 12
Tabelle A9-5: Detected variants in other NDD genes.	Anhang A9, Seite 14
Tabelle A9-6: Percentage of patients carrying potentially pathogenic variants in ALS associated genes in different cohorts.	Anhang A9, Seite 17

Abstract (Deutsch)

Die Next-Generation-Sequenzierung (NGS), welche die massive parallele Sequenzierung von DNA-Fragmenten erlaubt, hat innerhalb der letzten Jahre bis dahin unvorstellbare Möglichkeiten der DNA-Analyse eröffnet und findet seitdem breite Anwendung im Rahmen der biomedizinischen Forschung und der molekulargenetischen Diagnostik. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen mit verschiedenen Strategien der NGS-Technologie und soll einerseits deren Potential sowohl auf wissenschaftlicher als auch auf diagnostischer Ebene, andererseits aber auch die komplexen Herausforderungen darstellen, die insbesondere mit der Analyse und Beurteilung generierter Daten verknüpft sind.

Anhand definierter Fragestellungen und Projekte konnten zahlreiche kausale Varianten im Zusammenhang mit unterschiedlichen Phänotypen aus dem Spektrum der neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise für Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder Dystonie identifiziert werden und in Übereinstimmung mit der Annahme, dass verschiedene neurodegenerative Erkrankungen variable Manifestationen übergeordneter Pathomechanismen darstellen, Differentialdiagnosen auf genetischer Basis ermittelt werden. Weiterhin konnte im Rahmen der Panel-Sequenzierung einer deutschen Kohorte von Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) das Mutationsspektrum der ALS erweitert werden und die Relevanz mehrerer Kandidatengene und genetischer Risikofaktoren untersucht werden. Gleichzeitig diente diese Kohorte zur Evaluation eines aktuell diskutierten komplexen Vererbungsmodells der ALS. Darüber hinaus gelang mittels Exom-Sequenzierung die Identifikation möglicher Kandidatengene für Dystonie und neurodegenerative Erkrankungen mit Eisenakkumulation im Gehirn.

Anhand der erzielten Ergebnisse soll die vorliegende Dissertation einen Beitrag zum tieferen Verständnis der genetischen Grundlagen neurodegenerativer Erkrankungen und assoziierter Pathomechanismen sowie zur Etablierung zukünftiger personalisierter Therapieoptionen leisten. Diese Erkenntnisse und auch deren unmittelbare Implementierung in die molekulargenetische Routine-Diagnostik sollen letztlich zum direkten Nutzen für den Patienten sein.

Abstract (English)

Next-generation sequencing (NGS), which allows the massively parallel sequencing of DNA has facilitated unthinkable prospects of DNA analysis and is used widely nowadays in biomedical research and molecular diagnostics. This thesis applies different strategies of NGS in the context of neurodegenerative diseases and is supposed to depict the enormous potential of NGS both on diagnostic and research level but also to illustrate the challenges especially linked to analysis and assessment of generated data.

Within this work several causative mutations for different phenotypes of the neurodegenerative disease spectrum have been identified and according to the assumption that neurodegenerative diseases represent variable clinical manifestations of common superordinate pathomechanisms, differential diagnoses have been confirmed. By performing panel-sequencing in a German cohort of amyotrophic lateral sclerosis patients the mutational range of ALS was expanded and several candidate genes and genetic risk factors have been evaluated with regard to their relevance in the pathogenesis of ALS. At the same time this cohort was used to assess an upcoming hypothesis whereupon phenotypic characteristics in ALS are influenced by co-occurrence of variants. Additionally exome sequencing allowed for the identification of possible candidate genes for dystonia and neurodegeneration with brain iron accumulation.

On the one hand, the achieved results can contribute to the deeper understanding of the genetic basis of neurodegenerative diseases and associated pathomechanisms as well as to the development of future approaches concerning personalized medicine. On the other hand the rapid implementation of results from basic science to routine molecular diagnostics is thought to be of immediate benefit for a vast number of patients.

Liste der Publikationen der Dissertation

Ganos C, Biskup S, Kleinmichel S, Zittel S, Schunke O, Gerloff C, Münchau A. Progressive ataxia associated with scarring skin lesions and vertical gaze palsy. *Mov Disord* 2013. 28(4):443-5.

Ganos C, Biskup S, Krüger S, Meyer-Osores A, Hodecker S, Hagel C, Schöls L, Bhatia KP, Münchau A. Dystonia with aphonia, slow horizontal saccades, epilepsy and photic myoclonus: a novel syndrome? *Parkinsonism Relat Disord* 2014. 20(3):328-31.

Kurzwelly D, Krüger S, Biskup S, Heneka MT. A distinct clinical phenotype in a German kindred with motor neuron disease carrying a CHCHD10 mutation. *Brain* 2015. 138(Pt 9):e376.

Lohmann E, Krüger S, Hauser AK, Hanagasi H, Guven G, Erginel-Unaltuna N, Biskup S, Gasser T. Clinical variability in ataxia-telangiectasia. *J Neurol* 2015. 262(7):1724-7.

Wilke C, Gillardon F, Deuschle C, Dubois E, Hobert MA, Vom Hagen JM, Krüger S, Biskup S, Blauwendraat C, Hruscha M, Kaeser S, Heutink P, Maetzler W, Synofzik M. Serum levels of progranulin do not reflect cerebrospinal fluid levels in neurodegenerative disease. *Curr Alzheimer Res* 2016. 13(6):654-62.

Rempe T, Kuhlenbäumer G, Krüger S, Biskup S, Matschke J, Hagel C, Deuschl G, van Eimeren T. Early-onset parkinsonism due to compound heterozygous POLG mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 2016. Aug;29:135-7.

Krüger S, Battke F, Sprecher A, Munz M, Synofzik M, Schöls L, Gasser T, Grehl T, Prudlo J, Biskup S. Rare variants in neurodegeneration associated genes revealed by targeted panel sequencing in a German ALS cohort. *Front Mol Neurosci*. 2016 Oct 13;9:92. eCollection 2016.

Dudsek A, Rimmele F, Funke C, Krüger S, Benecke R, Biskup S, Kamm C. Autosomal dominant inheritance in SPG18: Exome sequencing reveals a novel ERLIN2 missense mutation cosegregating with a pure form of HSP.
Zur Publikation eingereicht bei Orphanet Journal of Rare Diseases.

Hermann A, Kitzler H, Biskup S, Krüger S, Funke C, Terrile C, Haack TB. A case of beta-propeller protein-associated neurodegeneration due to a heterozygous deletion of WDR45.
Zur Publikation eingereicht bei Developmental Medicine & Child Neurology.

Linnebank M, McDougall C, Krüger S, Biskup S, Neumann M, Weller M, Valavanis A, Prudlo J. Novel cases of ALS after treatment of cerebral arteriovenous malformations. *Swiss Med Wkly*. 2016 Nov 12;146:w14361. doi: 10.4414/smw.2016.14361. eCollection 2016.

Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen

Dieses Kapitel beschreibt meinen Anteil an gemeinschaftlich erzielten Publikationen beziehungsweise gemeinschaftlich erstellten Manuskripten. Die hier aufgeführten Auswertungen, Analysen, Tests und sonstige Tätigkeiten wurden wie im Kapitel „Methoden“ beschrieben von mir selbst durchgeführt. Etwaige Abweichung von den im Kapitel „Methoden“ beschriebenen Vorgehensweisen werden kenntlich gemacht oder auf die entsprechenden Abschnitte im Kapitel „Ergebnisse und Diskussion“ verwiesen.

Publikationen

Ganos C, Biskup S, Kleinmichel S, Zittel S, Schunke O, Gerloff C, Münchau A. Progressive ataxia associated with scarring skin lesions and vertical gaze palsy. *Mov Disord* 2013. 28(4):443-5.

Auswertung der Exom-Daten (SOLiD, Applied Biosystems) beider Patienten anhand der durch die Fachabteilung für Bioinformatik bereitgestellten SNP-Listen (siehe Abschnitt 3.11) mit Hilfe einer durch Literaturrecherche selbst erstellten Ataxie-Genliste inkl. Differentialdiagnosen entsprechend der im Abschnitt 3.12 beschriebenen Vorgehensweise und dadurch Identifikation sowie Beurteilung der kausalen Variante im *XPA*-Gen bei beiden Patienten; Validierung der kausalen Variante mittels Sanger-Sequenzierung bei beiden Patienten wie in Abschnitt 3.5 beschrieben (inklusive PCR und Gelelektrophorese wie in den Abschnitten 3.3 und 3.4 beschrieben); Erstellung eines Befundbriefes wie in Abschnitt 3.13 beschrieben; Erstellung von Teilen des Manuskriptes (genetische Inhalte); Erstellung einer Abbildung für das Manuskript (Stammbaum der Familie); Durchsicht des Manuskriptes.

Ganos C, Biskup S, Krüger S, Meyer-Osores A, Hodecker S, Hagel C, Schöls L, Bhatia KP, Münchau A. Dystonia with aphonia, slow horizontal saccades, epilepsy and photic myoclonus: a novel syndrome? *Parkinsonism Relat Disord* 2014. 20(3):328-31.

Schrittweise Auswertung der aus EDTA-Blut erhaltenen Exom-Daten (SOLiD, Applied Biosystems) beider Patienten anhand der durch die Fachabteilung für Bioinformatik bereitgestellten SNP-Listen (siehe Abschnitt 3.11): Dystonie-Panel, Ataxie-Gene anhand einer durch Literaturrecherche selbst erstellten Genliste inkl. Differentialdiagnosen, Panel für Myoklonus-Epilepsie, jeweils wie in Abschnitt 3.12 beschrieben; Erstellung einer Liste von Genen des Dopamin-Stoffwechsels anhand einer eingehenden Literaturrecherche und Suche nach Veränderungen innerhalb dieser Gene wie in Abschnitt 3.12 beschrieben; Analyse der NGS-Daten hinsichtlich Varianten in den Genen *GLB1*, *HEXA*, *HEXB*, *ATP7B*, *PANK2*, *FTL*, *HPRT1*, *NPC1*, *NPC2* (sekundäre Dystonien, wie in Abschnitt 3.12 beschrieben); Erweiterung der Analyse auf das gesamte Exom wie in Abschnitt 3.12 beschrieben (inkl. Suche nach gemeinsamen Varianten; Suche nach Varianten, die beim Sohn homozygot, bei der Mutter heterozygot vorliegen; Suche nach Varianten in nukleär kodierten mitochondrialen Genen, Suche nach möglichen neuen Kandidatengenen, Suche nach pathogenen Varianten in X-chromosomalen Genen); Sanger-Resequenzierung von Regionen mit ungenügender Coverage in relevanten Genen wie in Abschnitt 3.5 beschrieben (inkl. PCR und Gelelektrophorese wie in den Abschnitten 3.3 und 3.4 beschrieben); Zusammenfassung von Daten für das Supplement; Erstellung einer Abbildung für das Manuskript (Stammbaum der Familie); Erstellung von Teilen des Manuskriptes (genetische Inhalte, Methodenteil „Genetic testing“); Durchsicht des Manuskripts.

Kurzwelly D, Krüger S, Biskup S, Heneka MT. A distinct clinical phenotype in a German kindred with motor neuron disease carrying a CHCHD10 mutation. Brain 2015. 138(Pt 9):e376.

Auswertung der *C9orf72*-Repeatanalyse beim Indexpatienten wie im Abschnitt 3.7 beschrieben; Auswertung des ALS-Subpanels (HiSeq 2500, Illumina) beim Indexpatienten wie im Abschnitt 3.12 beschrieben anhand der durch die Fachabteilung für Bioinformatik bereitgestellten SNP-Liste (siehe Abschnitt 3.11); Auswertung der Exom-Daten (HiSeq 2500, Illumina) beim Indexpatienten anhand der durch die Fachabteilung für Bioinformatik bereitgestellten SNP-Liste wie in Abschnitt 3.12 beschrieben; Auswertung der nach Rücksprache durch die Abteilung für Bioinformatik

bereitgestellten „common SNP-Liste“ basierend auf der Exom-Sequenzierung (HiSeq 2500, Illumina) des Indexpatienten sowie zweier gleichermaßen betroffenen Familienmitglieder wie im Abschnitt 3.12 beschrieben und so Identifikation der kausalen Mutation im *CHCHD10*-Gen bei allen drei Patienten; Erstellung von Befundbriefen wie in Abschnitt 3.13 beschrieben; Auswertung und Beurteilung der durchgeführten Segregationsanalysen wie in Abschnitt 3.6 beschrieben inkl. Erstellung medizinischer Befunde wie in Abschnitt 3.13 beschrieben; Erstellung einer Abbildung für das Manuskript (Stammbaum der Familie); Durchsicht des Manuskriptes.

Lohmann E, Krüger S, Hauser AK, Hanagasi H, Guven G, Erginel-Unaltuna N, Biskup S, Gasser T. Clinical variability in ataxia-telangiectasia. J Neurol 2015. 262(7):1724-7.

Schrittweise Auswertung der Exom-Daten (Panel für Dystonie, HiSeq 2500 Illumina) des Indexpatienten mittels der durch die Fachabteilung für Bioinformatik bereitgestellten SNP-Liste (siehe Abschnitt 3.11) wie in Abschnitt 3.12 und Kapitel 4.5 beschrieben und dadurch Identifikation und Beurteilung der kausalen Mutationen im *ATM*-Gen; Auswertung der durchgeführten Deletions-/Duplikationsanalyse des *SPR*-Gens mittels quantitativer real-time PCR wie in Abschnitt 3.9 beschrieben; Zusammenfassung von Daten für das Supplement; Erstellung von Teilen des Manuskriptes (genetische Inhalte, Methodenteile „Exome sequencing“ und „Quantitative real-time PCR“, „Results“); Durchsicht des Manuskriptes.

Wilke C, Gillardon F, Deuschle C, Dubois E, Hobert MA, Vom Hagen JM, Krüger S, Biskup S, Blauwendraat C, Hruscha M, Kaeser S, Heutink P, Maetzler W, Synofzik M. Serum levels of progranulin do not reflect cerebrospinal fluid levels in neurodegenerative disease. Curr Alzheimer Res 2016. 13(6):654-62.

Sanger-Sequenzierung (inkl. PCR und Gelelektrophorese wie in den Abschnitten 3.3 und 3.4 beschrieben) und Auswertung des *PGRN*-Gens bei zwei Patienten wie in Abschnitt 3.5 beschrieben; Erstellung von Teilen des Manuskriptes (genetische Inhalte zur Sanger-Sequenzierung zweier Patienten); Durchsicht des Manuskriptes.

Rempe T, Kuhlenbäumer G, Krüger S, Biskup S, Matschke J, Hagel C, Deuschl G, van Eimeren T. Early-onset parkinsonism due to compound heterozygous POLG mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 2016. Aug;29:135-7.

Auswertung der generierten NGS-Daten (Panel für Parkinson; HiSeq 2500, Illumina) anhand der von der Abteilung für Bioinformatik bereitgestellten SNP-Liste (siehe Abschnitt 3.11) wie in Abschnitt 3.12 beschrieben und Identifikation der kausalen Mutationen im *POLG*-Gen; Erstellung eines Befundbriefes wie in Abschnitt 3.13 beschrieben; Durchsicht des Manuskripts.

Krüger S, Battke F, Sprecher A, Munz M, Synofzik M, Schöls L, Gasser T, Grehl T, Prudlo J, Biskup S. Rare variants in neurodegeneration associated genes revealed by targeted panel sequencing in a German ALS cohort. *Front Mol Neurosci*. 2016 Oct 13;9:92. eCollection 2016.

Auswertung der generierten NGS-Daten (Panel für neurodegenerative Erkrankungen, SOLiD, Applied Biosystems) aller 80 Patienten anhand der durch die Abteilung für Bioinformatik bereitgestellten SNP-Listen (siehe Abschnitt 3.11) wie in Abschnitt 3.12 beschrieben; Sanger-Resequenzierung (inkl. PCR und Gelelektrophorese wie in den Abschnitten 3.3 und 3.4 beschrieben) von Regionen mit ungenügender Coverage und deren Auswertung wie in Abschnitt 3.5 beschrieben; Zusammenfassung aller detektierten relevanten Varianten in tabellarischer Form inkl. *in silico* Online-Predictions; Analyse und Zusammenfassung der Ergebnisse hinsichtlich der in Kapitel 4.2 genannten Fragestellungen; Auswertung der durchgeführten *C9orf72*-Repeatanalysen für alle Patienten wie in Abschnitt 3.7 beschrieben; Projektkoordination gemeinsam mit Frau Dr. Dr. Biskup und Herrn Dr. Prudlo; Idee zur Gestaltung des Manuskriptes in Rücksprache mit Frau Dr. Dr. Biskup und Herrn Dr. Prudlo; Erstellung des Manuskriptes inkl. aller Abbildungen und Tabellen; Submission des Manuskriptes; Antragstellung zur weiterführenden Finanzierung des Projekts bei der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM).

Linnebank M, McDougall C, Krüger S, Biskup S, Neumann M, Weller M, Valavanis A, Prudlo J. Novel cases of ALS after treatment of cerebral arteriovenous malformations. Swiss Med Wkly. 2016 Nov 12;146:w14361. doi: 10.4414/smw.2016.14361. eCollection 2016.

Auswertung und Beurteilung der Sanger-Sequenzierung des *VEGFA*-Gens bei zwei Patienten wie in Abschnitt 3.5 beschrieben; Durchsicht des Manuskripts.

Eingereichte Manuskripte

Dudsek A, Rimmel F, Funke C, Krüger S, Benecke R, Biskup S, Kamm C. Autosomal dominant inheritance in SPG18: Exome sequencing reveals a novel *ERLIN2* missense mutation cosegregating with a pure form of HSP.

Diskussion der Ergebnisse; Mitarbeit bei der Erstellung eines Befundbriefes wie in Abschnitt 3.13 beschrieben; Durchsicht des Manuskriptes.

Hermann A, Kitzler H, Biskup S, Krüger S, Funke C, Terrile C, Haack TB. A case of beta-propeller protein-associated neurodegeneration due to a heterozygous deletion of *WDR45*.

Auswertung und Beurteilung der durchgeführten Deletions-/Duplikationsanalyse des *WDR45*-Gens mittels quantitativer real-time PCR wie in Abschnitt 3.9 beschrieben; Erstellung einer Abbildung für das Manuskript (graphische Darstellung der Ergebnisse der quantitativen real-time PCR); Erstellung von Teilen des Manuskriptes (Methodenteile „Sanger Sequencing“, „MLPA“, „Quantitative real-time PCR“); Durchsicht des Manuskripts.

1. Einleitung

1.1 Definition und Aufgaben der Humangenetik

Gemäß eines Positionspapiers der deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V. (<http://www.gfhev.de/>) aus dem Jahr 2007 definiert sich die Humangenetik als „[...] die Wissenschaft von der genetisch bedingten Variabilität des Menschen. Sie umfasst die Betreuung von Patienten mit genetisch bedingten Erkrankungen und deren Familien [...] sowie die Grundlagenforschung und angewandte Forschung. Sie untersucht die Mechanismen und Gesetzmäßigkeiten der Vererbung beim Menschen, die Ursachen für genetisch bedingte Unterschiede zwischen den Menschen und die Umsetzung der genetischen Information in ein wahrnehmbares Erscheinungsbild (Phänotyp).“

Die Aufgaben und Ziele der Humangenetik lassen sich dementsprechend auf zwei Ebenen zusammenfassen, welche in Abhängigkeit zueinander betrachtet werden müssen (Abbildung 1).

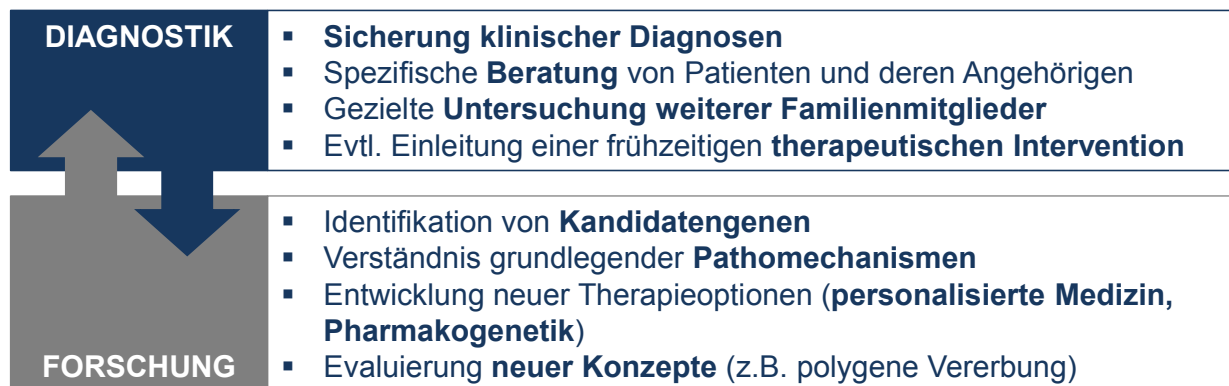


Abbildung 1: Die Ziele der Humangenetik in molekulargenetischer Diagnostik und Forschung bedingen sich gegenseitig (modifiziert nach Keller et al. 2015 und Biskup 2010).

Als Meilensteine der Humangenetik gelten die Beschreibung der DNA-Struktur durch James Watson und Francis Crick (1953) sowie die Etablierung der DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode durch Frederick Sanger (Sanger et al. 1977). Bis heute findet die nach ihm benannte Sanger-Sequenzierung standardmäßige Anwendung in der Forschung und in der humangenetischen Praxis und ermöglichte die

Entschlüsselung des humanen Genoms im Rahmen des Human Genome Projects (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). Weiterentwicklungen der Sanger-Sequenzierung zielen seitdem auf den Bedarf eines höheren Durchsatzes bei gleichzeitiger Kostenreduktion ab und führten Mitte der 2000er Jahre zur Entwicklung von sogenannten „Sequenziermethoden der nächsten Generation“ (Shendure und Ji 2008). Basierend auf den Prinzipien der Sanger-Sequenzierung erlaubt die NGS-Technologie die massive parallele Sequenzierung von Millionen DNA-Fragmenten in einem kosten- und zeiteffizienten Ansatz. Damit hat die Einführung von NGS nicht nur die DNA-Diagnostik, sondern auch die humangenetische Forschung zweifelsfrei revolutioniert. Detaillierte Beschreibungen verfügbarer NGS-Plattformen der verschiedenen Anbieter finden sich beispielsweise bei Shendure und Ji (2008) oder Reuter et al. (2015).

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung eröffnete wie oben beschrieben zwar einerseits bis dahin unvorstellbare Möglichkeiten in der Analyse des humanen Genoms, resultierte aber andererseits auch im Bedarf an allgemeingültigen Regeln im Umgang mit gewonnenen Daten und Vorgehensweisen vor allem in der medizinischen Genetik. Seit dem Jahr 2010 unterliegen in Deutschland deshalb sämtliche Bereiche der Humangenetik dem Gendiagnostikgesetz (GenDG). Das Gesetz steckt die rechtlichen Rahmenbedingungen genetischer Untersuchungen am Menschen ab und soll gleichzeitig Diskriminierung aufgrund bestimmter genetischer Eigenschaften verhindern sowie das Recht auf informationelle Selbstbestimmung garantieren (Bundesministerium für Gesundheit, 2015).

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit dem Einsatz der NGS-Technologie zur weiteren Erforschung der genetischen Grundlagen sowie der NGS-basierten molekulargenetischen Diagnostik im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen und Bewegungsstörungen. Die nachfolgenden Unterkapitel (Kapitel 1.2) sollen deshalb zunächst in einige der grundlegenden Pathomechanismen neurodegenerativer Erkrankungen einführen. Außerdem soll die Rolle von NGS in Forschung und Diagnostik beleuchtet (Kapitel 1.3) und verschiedene Analysestrategien (Kapitel 1.4) vorgestellt werden. Gleichzeitig sollen auch die komplexen Herausforderungen, die mit der NGS-Technologie verknüpft sind, thematisiert werden (Kapitel 1.5). Kapitel 2 fasst die Ziele

dieser Arbeit mit den in Kapitel 3 dargestellten Methoden zusammen, bevor in Kapitel 4 eine Auswahl der verschiedenen, im Rahmen dieser Dissertation bearbeiteten Projekte vorgestellt und diskutiert werden. Kapitel 5 verweist auf weiterführende Ansätze, die auf den erzielten Ergebnissen aufbauen und richtet den Blickwinkel auf zukünftige Aspekte der Next-Generation-Sequenzierung.

1.2 Neurodegenerative Erkrankungen und übergeordnete Pathomechanismen

Neurodegenerative Erkrankungen sind definiert als meist progressive Erkrankungen mit selektivem Verlust von Neuronen und damit der Beeinträchtigung betroffener funktioneller Systeme, was in der Manifestation spezifischer Phänotypen resultiert (Kovacs 2014). Eine klinisch-anatomische Klassifikation beschreibt neurodegenerative Erkrankungen als kognitive Störungen, bis hin zur Demenz und dem Verlust höherer Hirnfunktionen sowie Bewegungsstörungen oder als eine Kombination aus beidem (Kovacs 2015). Ein herausragendes Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen ist dabei die intra- oder extrazelluläre Ablagerung von fehlgefalteten Proteinen mit einem hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen. Je nach akkumuliertem Protein unterscheidet man Tauopathien (*MAPT*, z.B. Alzheimer Demenz), α -Synucleopathien (*SNCA*; z.B. Parkinson), Prionen-Erkrankungen (*PRNP*; z.B. Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung), TDP-43/FUS-Proteinopathien (*TARDBP*, *FUS*; z.B. Frontotemporale Demenz) oder Trinukleotiderkrankungen (z.B. *HTT*, Chorea Huntington) (Kovacs 2014).

In den folgenden Abschnitten sollen einige der im Kontext der vorliegenden Dissertation relevanten Pathomechanismen vorgestellt werden.

1.2.1 Proteinaggregation

Eine Schlüsselfunktion innerhalb der neurodegenerativen Prozesse kommt der fehlerhaften Faltung und der daraus resultierenden Aggregation von Proteinen zu. Relevant sind in diesem Kontext das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau (*MAPT*), α -Synuclein (*SNCA*), das TAR DNA-Bindungsprotein (TDP-43, *TARDBP*), FUS (*FUS*) sowie das

Prionprotein (*PRNP*) und das Amyloid β A4 Vorläuferprotein (*APP*). Diese Proteine, die weder strukturell noch auf Sequenzebene miteinander verwandt sind, weisen im aggregierten Zustand ein jeweils spezifisches Verteilungsmuster auf, welches histopathologisch kennzeichnend für die damit verknüpfte phänotypische Ausprägung ist. Trotz dieser Spezifität existiert jedoch eine gewisse Überlappung der Aggregate beziehungsweise der assoziierten Phänotypen (Kovacs 2014; Swart et al. 2014). Die fehlerhafte Faltung bedingt üblicherweise die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen. Eine solche Konformationsänderung führt daraufhin zur Freilegung von hydrophoben Proteinregionen, wodurch die Aggregation und Fibrillenbildung begünstigt wird (Takalo et al. 2013).

Das *PSEN1*-Gen beispielsweise kodiert für eine katalytische Untereinheit des γ -Sekretase-Komplexes, welcher an der proteolytischen Spaltung von APP beteiligt ist (Bird 2012). Über einen gain-of-function Mechanismus können Mutationen im *PSEN1*-Gen ein Ungleichgewicht bezüglich der Spaltung von APP hin zur vermehrten Produktion von A β 42 verursachen, welches zytotoxisch wirkt und zur Aggregation neigt (Duff et al. 1996; Jankowsky et al. 2004). Bis zum heutigen Tag ist jedoch noch unklar, ob Proteinaggregate Ursache oder Folge neurodegenerativer Prozesse sind (Landsbury 2006). Dennoch gelten die übergeordneten Mechanismen der Proteinaggregation als vielversprechender Ansatzpunkt für zukünftige Therapieversuche (Swart et al. 2014). Neuere Erkenntnisse führten außerdem zu der Annahme, dass fehlgefaltete Proteine nicht nur aggregieren, sondern dass sich diese Aggregate nach und nach sogar ausweiten und auch bisher gesunde neuronale Strukturen befallen („prion-like protein seeding“, Walker et al. 2013).

1.2.2 Fehlerhafte Proteindegradierung

Auf fehlgefaltete Proteine und Proteinaggregate reagiert die Zelle im gesunden Zustand mit drei unterschiedlichen Strategien zur Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase: Die erneute korrekte Faltung mit Hilfe von molekularen Chaperonen, alternativ die Degradierung fehlgefalteter Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und das Autophagosom-Lysosom-System (ALP). Das Signal für die Zuführung hin zur UPS-

oder ALP-vermittelten Degradierung bildet die Markierung von Proteinen durch Polyubiquitinierung mit Hilfe von drei Ubiquitin-Ligasen (E1, E2, E3). Die Degradierung erfolgt daraufhin über das Proteasom oder über Autophagie. Die dritte Strategie besteht in der Einlagerung fehlgefalteter Proteine in zellulären Einschlüssen, die einen pathologischen Zustand widerspiegeln und deshalb als Marker angesehen werden können. Zahlreiche Hinweise führten zu der Annahme, dass der Beeinträchtigung dieser Mechanismen eine bedeutsame Rolle innerhalb der neurodegenerativen Prozesse zukommt (Takalo et al. 2013).

Das *PARK2*-Gen beispielsweise, welches mit juvenilem Parkinsonismus assoziiert ist, kodiert für eine Komponente des E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes, dessen Funktion in der Markierung von Proteinen für die Proteasom-vermittelten Degradierung liegt. Ein Verlust der Enzymfunktion, welcher aufgrund von Mutationen in für die Interaktion zwischen Parkin und dem Proteasom essentiellen Domänen verursacht werden kann und zu einem loss-of-function Mechanismus führt, resultiert in der Akkumulation von Zielsubstraten, unter anderem von α -Synuclein (Bossy-Wetzel et al. 2004).

1.2.3 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress

Aufgrund ihres enormen Energiebedarfs sind Neurone in großem Maße abhängig von einer ausreichenden Energieversorgung durch Mitochondrien. Folglich erscheint es logisch, dass zahlreiche Erkrankungen aus dem neurodegenerativen Spektrum mit einer mitochondrialen Dysfunktion in Verbindung gebracht werden. Die mitochondriale Dysfunktion resultiert vor allem in oxidativem Stress durch ein Ungleichgewicht in der Generierung von ROS (reaktive Sauerstoffspezies) und antioxidativ wirkenden Enzymen wie beispielsweise SOD1, welches im Zusammenhang mit ALS beschrieben ist. Dieses Ungleichgewicht wirkt wiederum toxisch und schädigt zahlreiche zelluläre Funktionen wie beispielsweise die Ca^{2+} -Homöostase sowie die posttranslationale Modifikation von Proteinen und aktiviert außerdem Mikroglia, welche in der Folge neuroinflammatorische Prozesse initiieren (Swart et al. 2014; Bhat et al. 2015; Redler und Dokholyan 2012). In diesem Kontext sei auf die Beschreibung einer pathogenen Mutation im *CHCHD10*-Gen in Kapitel 4.4 verwiesen.

1.2.4 Eisen-induzierte Neurodegeneration

Oxidativer Stress kann außerdem aus einem Ungleichgewicht in der Homöostase von Schwermetallen, insbesondere von Eisen resultieren. Eisen ist zwar in eine Vielzahl fundamentaler zellulärer Prozesse wie den Sauerstofftransport oder die Synthese von Neurotransmittern und DNA involviert und damit einerseits essentiell für die Aufrechterhaltung dieser Funktionen. Andererseits begünstigt ein Überschuss an freiem Eisen die intrazelluläre Akkumulation des Metalls in spezifischen Hirnregionen aber auch die Aggregation von α -Synuclein und hyperphosphoryliertem Tau und fördert die oxidative Schädigung sowie den programmierten Zelltod. Ob es sich bei der Eisen-Akkumulation um einen primären Mechanismus oder um einen sekundären Effekt handelt, ist bisher noch unklar (Ward et al. 2014).

Obwohl die grundlegenden molekularen Mechanismen neurodegenerativer Prozesse bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig aufgeklärt sind, lassen sich dennoch spezifische Pathologien ableiten, welche als verbindendes Element vieler neurodegenerativer Erkrankungen angesehen werden können (Bossy-Wetzel et al. 2004). Darauf basiert auch eine aktuell diskutierte These, wonach neurodegenerative Erkrankungen weniger als jeweils isolierte Entitäten gelten, sondern vielmehr variable Manifestationen übergeordneter Pathomechanismen darstellen (Armstrong 2012). Dieser Aspekt wird durch die Identifikation von genetischen Differentialdiagnosen auch in zwei der im Rahmen dieser Dissertation bearbeiteten Projekte aufgegriffen (Kapitel 4.2 und 4.5).

Das Verständnis von genetischen Veränderungen und der dadurch initiierten oder begünstigten neurodegenerativen Prozesse, welche sich in der Folge als neurodegenerative Erkrankungen manifestieren, ist in großem Maße auf den Einsatz der NGS-Technologie und der damit verbundenen Identifikation kausaler Gene zurückzuführen. Da neurodegenerative Erkrankungen alternde Gesellschaften vor enorme soziale sowie finanzielle Herausforderungen stellen und ursächliche Therapien bislang nicht zur Verfügung stehen, kommt der Grundlagenforschung diesbezüglich eine herausragende Bedeutung zu (Kawamata und Manfredi 2011; Foo et al. 2013).

Im folgenden Abschnitt soll deshalb aufgezeigt werden, inwieweit der Einsatz der NGS-Technologie zur Erforschung und genetischen Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen beitragen kann und welche Erwartungen damit verknüpft sind.

1.3 Der Einsatz der Next-Generation-Sequenzierung in der human-genetischen Forschung und molekulargenetischen Diagnostik

Der NGS-Technologie kommt sowohl im Rahmen von forschungsorientierten als auch von diagnostischen Fragestellungen eine bedeutende Rolle zu. So nahm beispielsweise die Anzahl an Publikationen, welche vom Nachweis kausaler Mutationen für genetisch bedingte Erkrankungen oder der Identifikation krankheitsrelevanter Gene berichteten, innerhalb der letzten Jahre exponentiell zu (Lohmann und Klein 2014). Vor allem im Kontext von genetisch sehr heterogenen, phänotypisch variablen oder atypisch verlaufenden Erkrankungen hat sich die NGS-Technologie bewährt. Während mittels der herkömmlichen Sanger-Methode lediglich einige wenige Gene pro Patient sequenziert werden konnten, erlaubt die NGS-Technologie abhängig von der gewählten Strategie beispielsweise die gleichzeitige Sequenzierung aller Gene, die mit einem definierten Phänotyp assoziiert sind, in einem Ansatz (Panel-Diagnostik, Biskup 2010). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit eine kausale Mutation nachzuweisen gegenüber der Sanger-Sequenzierung enorm. Neveling und Kollegen (2013) beispielsweise berichten bei Bewegungsstörungen über Aufklärungsquoten von 20% mittels Exom-Sequenzierung (Sequenzierung des kompletten kodierenden Bereichs des humanen Genoms, Untersuchung von 50 Patienten, Analyse von 151 Genen) versus 5% mittels Sanger-Sequenzierung (Untersuchung von 953 Patienten, schrittweise Analyse von 32 Genen). Beispiele für den erfolgreichen Einsatz der Panel-Sequenzierung im Rahmen dieser Dissertation liefern die im Anhang gelisteten Publikationen A6 und A8 bezüglich Varianten im *POLG*- und *ERLIN2*-Gen bei Patienten mit einer Parkinson-Erkrankung beziehungsweise einer hereditären spastischen Spinalparalyse.

Eine Erwartung, die eng mit der NGS-Technologie verknüpft ist, ist die diagnostische Odyssee vieler Patienten mit seltenen erblich bedingten Erkrankungen durch einen einzigen Ansatz zu beenden oder sogar eine definitive Diagnose überhaupt zu

ermöglichen (Lohmann und Klein 2014). Im Interesse der Patienten fordert nicht nur Toft (2014) deshalb einen Paradigmenwechsel, wonach die molekulargenetische Diagnostik zu einem viel früheren Zeitpunkt als bisher üblich in den diagnostischen Prozess eingebunden werden sollte. Gleichzeitig sollte in der Mehrzahl der Fälle eine Abkehr von der Sanger-Sequenzierung hin zu NGS erfolgen. Dies zielt darauf ab, dem Patienten falls möglich bereits frühzeitig spezifische Therapieoptionen anzubieten und wirkungslose Medikationen oder gar Eingriffe zu ersparen (Biskup und Gasser 2012). Voraussetzung dafür ist allerdings, dass Weiterentwicklungen, welche der Sensitivität und Spezifität der Methodik sowie den nachgeschalteten Analysen in der Datenauswertung dienen, bei anhaltender Kostenreduktion und Einhaltung ethischer Standards weiter vorangetrieben werden.

Im Bereich der Grundlagenforschung liefert die Assoziation von Genen mit definierten Phänotypen mittels NGS über die Untersuchung der betroffenen Signalwege außerdem wichtige Beiträge zum tieferen Verständnis grundlegender Pathomechanismen (Biskup 2010). Ein Beispiel ist der Nachweis einer pathogenen Mutation im *CHCHD10*-Gen bei ALS (Kapitel 4.4). Das Gen kodiert für ein mitochondriales Protein und liefert damit erstmals ein direktes Indiz für die essentielle Rolle von Mitochondrien in der Ätiologie der ALS (Müller et al. 2014; Cozzolino et al. 2015). Anhand der Exom-, Trio-Exom- oder Genom-Sequenzierung (Kapitel 1.4), welche die Analyse des kompletten kodierenden Bereiches beziehungsweise aller Basen des humanen Genoms erlaubt (Kapitel 1.4.2 und 1.4.3), werden regelmäßig neue, mit einem definierten Phänotyp assoziierte Gene in der Literatur beschrieben und so das genetische Spektrum erblicher Erkrankungen kontinuierlich erweitert, Genotyp-Phänotyp-Korrelationen etabliert oder atypische Krankheitsverläufe aufgeklärt. Beispielhaft seien hier die Identifikation des *HEPH*-Gens als möglicherweise relevant bei Erkrankungen aus dem Spektrum der Erkrankungen mit Eisenablagerungen (Kapitel 4.3) oder der Nachweis pathogener *ATM*-Mutationen bei Dystonie (Kapitel 4.5) genannt. Mit Hilfe von Patientenkohorten, die mittels NGS untersucht werden, lassen sich außerdem neue Konzepte wie beispielsweise ein komplexes Vererbungsmodell der ALS (Kapitel 4.2), der Einfluss genetischer Risikofaktoren und Modifikatoren oder die Verknüpfung verwandter Pathologien auf genetischer oder mechanistischer Ebene etablieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die durch den Einsatz der NGS-Technologie in Forschung und Diagnostik gewonnen Erkenntnisse im Zusammenspiel und über ihre gegenseitige Implementierung einen enormen Beitrag zum Verständnis genetisch bedingter Erkrankungen leisten und damit den Grundstein für zukünftige pharmakogenetische Ansätze und personalisierte Therapieoptionen legen (Lohmann und Klein 2014; Biskup 2010).

Im folgenden Unterkapitel sollen die verschiedenen Strategien, die hinsichtlich der Identifikation krankheitsverursachender Mutationen Anwendung finden, vorgestellt werden.

1.4 Strategien der Next-Generation-Sequenzierung

1.4.1 Panel-Sequenzierung

Bei der sogenannten Panel-Sequenzierung (targeted sequencing) werden ausschließlich die kodierenden Bereiche derjenigen Gene angereichert, welche nachweislich mit einem definierten Phänotyp assoziiert sind (Lohmann und Klein 2014). Da dieser Ansatz die beste Abdeckung der Zielbereiche bei gleichzeitig geringstem Kosten- und Zeitaufwand bietet, findet die Panel-Sequenzierung bevorzugt dann Anwendung in der Routine-Diagnostik, wenn ein klinisch klar definiertes Krankheitsbild mit bekannter genetischer Heterogenität oder phänotypischer Variabilität vorliegt (Grada und Weinbrecht 2013; Keller et al. 2015). Diese Fokussierung auf krankheitsrelevante Gene erleichtert zwar einerseits die Interpretation nachgewiesener Varianten im Hinblick auf den spezifischen Phänotyp des Patienten und vermeidet gleichzeitig mögliche Zusatzbefunde, welche ethische Fragestellungen aufwerfen (Lohmann und Klein 2014). Andererseits stellt ebendiese Fokussierung aber auch eine Limitation des Panel-Ansatzes dar, der nur mit einer regelmäßigen Aktualisierung und Erweiterung der Anreicherungs-Kits entsprechend der aktuellen Literatur begegnet werden kann (Kapitel 3.10 und 4.1). Beispielhaft für den erfolgreichen Einsatz der Panel-Sequenzierung sei an dieser Stelle die Arbeit von Németh und Kollegen aus dem Jahr 2013 genannt, welche den Nachweis einer ursächlichen Mutation in 18% der untersuchten Ataxie-Patienten mittels Panel-Sequenzierung beschreibt (Németh et al. 2013) oder die

Identifikation einer kausalen Mutation im *TARDBP*-Gen bei einer früh beginnenden frontotemporalen Demenz ohne Beeinträchtigung der Motoneurone durch Synofzik und Kollegen (2014).

1.4.2 Exom-Sequenzierung

Die Exom-Sequenzierung (whole exome sequencing, WES) dagegen erlaubt die parallele Analyse des kompletten kodierenden Bereichs (ca. 30 Millionen Basenpaare, Rabbani et al. 2014), welcher etwa 1% des humanen Genoms ausmacht und Schätzungen zufolge rund 85% der krankheitsverursachenden Mutationen enthält (Foo et al. 2012). Damit gilt WES als leistungsfähiges Werkzeug in der Diagnostik vor allem von komplexen und überlappenden Phänotypen sowie zur Identifikation neuer Krankheits-assoziiertes Gene (Grada und Weinbrecht 2013; Foo et al. 2012). In der Literatur wird der Anteil an mittels Exom-Sequenzierung gelösten Fällen mit etwa 25% angegeben (Jacob 2013). Als Beispiel hierfür kann die Identifikation einer kausalen Mutation im *XPA*-Gen bei einem Geschwisterpaar mit einem komplexen neurologischen Syndrom und ausgeprägten Hautveränderungen (Ganos et al. 2013 [A1]) oder die Beschreibung des *WDR45*-Gens als relevant im Zusammenhang mit der Beta-propeller-Protein-assoziierten Neurodegeneration gelten (Haack et al. 2012). Gerade die Exom-Sequenzierung zeigt allerdings auch die vielschichtigen Herausforderungen auf, welche sich durch den Einsatz der NGS-Technologie vor allem in der molekulargenetischen Diagnostik aber auch im Rahmen der Forschung ergeben. Neben der bioinformatischen Aufbereitung der Rohdaten kommt dabei der korrekten Beurteilung detektierter Varianten im Hinblick auf die jeweils zugrundeliegende Fragestellung die größte Bedeutung zu (Biskup und Gasser 2012, siehe auch Kapitel 1.5 und 3.12). Da bei der Sequenzierung eines einzelnen Exoms mit etwa 20.000 bis 25.000 Veränderungen in kodierenden Bereichen zu rechnen ist, gleicht die Suche nach kausalen Varianten der Suche nach der berühmten Nadel im Heuhaufen (Foo et al. 2012; Lohmann und Klein 2014). Die Anzahl nachgewiesener Varianten lässt sich jedoch durch den Ansatz der sogenannten Trio-Exom-Analyse deutlich verringern. Hierbei können die Sequenzdaten so in Bezug zueinander gestellt werden, dass entweder *de novo* Varianten identifiziert

(klassische Trio-Exom-Analyse, Sequenzierung eines erkrankten Kindes und dessen gesunder Eltern) oder gemeinsame Varianten gleichermaßen erkrankter Mitglieder einer Familie detektiert werden können (vergleichende Exom-Analyse, siehe auch Nachweis einer ALS-verursachenden Mutation im *CHCHD10*-Gen, Kapitel 4.4). Voraussetzung hierfür ist jedoch die ausreichende Abdeckung der entsprechenden Position bei allen untersuchten Individuen.

	Sanger-Sequenzierung	Panel-Sequenzierung	Exom-Sequenzierung	Genom-Sequenzierung
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> Etablierte Methodik Keine Anwendung bioinformatischer Methoden notwendig 	<ul style="list-style-type: none"> Parallele Sequenzierung aller krankheitsrelevanter Gene Hohe Wahrscheinlichkeit des Nachweises kausaler Mutationen Kosten- und zeiteffizient Vermeidung von Zusatzbefunden 	<ul style="list-style-type: none"> Parallele Sequenzierung des gesamten kodierenden Bereichs Identifikation neuer Krankheitsgene möglich Eignung zur Untersuchung sehr seltener, komplexer Erkrankungen 	<ul style="list-style-type: none"> Parallele Sequenzierung des kompletten Genoms inkl. nicht-kodierender Bereiche Identifikation kausaler Veränderungen, z.B. in regulatorischen intergenischen Sequenzbereichen
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> Beschränkung auf wenige, einzelne Gene Geringe Wahrscheinlichkeit der Identifikation kausaler Mutationen Kosten- und zeitintensiv bei vergleichbarem Durchsatz 	<ul style="list-style-type: none"> Regelmäßige Aktualisierung des Paneldesigns nötig Bioinformatische Aufbereitung der Rohdaten erforderlich 	<ul style="list-style-type: none"> Hohe Komplexität der Datenauswertung Bioinformatische Aufbereitung der Rohdaten notwendig Konsens zum Umgang mit Zusatzbefunden nötig 	<ul style="list-style-type: none"> Hohes Datenaufkommen Sehr hohe Komplexität der Datenauswertung Bioinformatische Aufbereitung der Rohdaten notwendig Konsens zum Umgang mit Zusatzbefunden nötig Zeit- und kostenintensiv

Abbildung 2: Gegenüberstellung der Sequenzierungsmethoden: Sanger-Sequenzierung versus verschiedene Ansätze Next-Generation-Sequenzierung (modifiziert nach Keller et al. 2015).

1.4.3 Genom-Sequenzierung

Die Genom-Sequenzierung (whole genome sequencing, WGS, Keller et al. 2015) als hypothesen-freier Ansatz findet dagegen bisher nur vereinzelt Anwendung in der klinischen Diagnostik (Foo et al. 2013). Die Gründe hierfür liegen zum einen in den hohen Kosten für Datengenerierung und -speicherung. Vor allem aber lässt sich die große Anzahl an Veränderungen in nicht-kodierenden Bereichen in Bezug auf medizinische oder diagnostische Fragestellungen nach aktuellem Wissensstand kaum beurteilen, da diese nicht der Selektion unterliegen, weshalb eine Abwägung zwischen Kosten und Nutzen der Untersuchung im Einzelfall erfolgen muss (Yu et al. 2012). Mit der Initiierung der sogenannten CLARITY Challenge wurde in den Jahren 2010 bis 2014

ein Forum für die Entwicklung einheitlicher Standards und Vorgehensweisen hinsichtlich Analyse, Interpretation und Erstellung medizinischer Befunde auf Grundlage der Genom-Sequenzierung geschaffen (Brownstein et al. 2014).

In der humangenetischen Forschung findet die Genom-Sequenzierung jedoch bereits zum heutigen Zeitpunkt vielfältige Anwendungen. Da mittels WGS alle circa drei Milliarden kodierenden und nicht-kodierenden Nukleotide des humanen Genoms analysiert werden können, verspricht die Genom-Sequenzierung beispielsweise auch die Identifikation kausaler Veränderungen in intergenischen regulatorischen Bereichen und öffnet damit die Tür hin zum tieferen Verständnis, inwieweit oder über welche Mechanismen die Variation in nicht-kodierenden Bereichen zur Ausprägung phänotypischer Merkmale beiträgt (Keller et al. 2015). Abbildung 2 stellt die jeweiligen Vor- und Nachteile der Sanger-Sequenzierung der Panel-, Exom- und Genom-Sequenzierung mittels NGS vergleichend gegenüber.

Die Herausforderungen, die allen in diesem Unterkapitel beschriebenen Ansätzen mehr oder weniger gemein sind sowie grundsätzliche Limitationen der Technologie sollen im nachfolgenden Abschnitt genauer beleuchtet werden.

1.5 Herausforderungen und Limitationen der NGS-Technologie

Neben der rein technischen Arbeitsabfolge, die den Bereich von der Vorbereitung der Proben über die eigentliche Sequenzierung bis hin zur primären Datenanalyse umfasst, stellt vor allem die sekundäre Analyse, die das Calling, die Annotation und die Interpretation von Varianten beinhaltet, die größte Herausforderung der NGS-Technologie dar (Ku et al. 2012, siehe auch Kapitel 3.11 und 3.12). Von besonderer Bedeutung ist deshalb die Etablierung einer analytischen Pipeline, welche in der Beurteilung nachgewiesener Varianten vor dem Hintergrund des Phänotyps des untersuchten Patienten oder der zugrundeliegenden Fragestellung unterstützt. Da beispielsweise eine Exom-Sequenzierung nach der primären Datenanalyse in der Detektion von etwa 20.000 bis 25.000 SNVs (single nucleotide variants) und kleineren Deletionen und Duplikationen resultiert (Foo et al. 2012), sind definierte Filterkriterien,

welche die Anzahl der potentiell pathogenen Varianten minimieren, essentiell. Dies gilt, wenn auch in geringerem Ausmaß, analog für die Panel-Sequenzierung.

Der folgende Abschnitt beschreibt die einzelnen Filterschritte, wie sie innerhalb der Routine-Diagnostik und je nach Fragestellung modifiziert in Forschungsansätzen bei der CeGaT GmbH Anwendung finden sowie Strategien zur humangenetischen Beurteilung identifizierter Varianten (vergleiche Kapitel 3.11 und 3.12).

Besonders im Kontext seltener bis sehr seltener Erkrankungen, besteht der erste Filterschritt in der Auswahl solcher Varianten, die mit einer geringen Frequenz in der Allgemeinbevölkerung auftreten. Entsprechende Daten finden sich in frei zugänglichen Online-Datenbanken wie dbSNP (Sherry et al. 2001, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), ExomeVariantServer (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) oder 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>). Weit verbreitet sind in diagnostischen Ansätzen Frequenzen von 0,1% bei autosomal-dominant vererbten Genen und 1% bei autosomal-rezessiv vererbten Genen. In Forschungsansätzen können diese Werte je nach Fragestellung jedoch modifiziert werden (Bamshad et al. 2011).

Ein zweiter Filterschritt berücksichtigt die erwartete Konsequenz der Veränderung auf das Protein. Besonders relevant sind dabei Varianten, die einen (stark) nachteiligen Effekt auf das Protein ausüben wie trunkierende Mutationen (nonsense), frame-shift Mutationen, splice-Mutationen, kleinere Deletionen/Duplikationen, Insertionen und missense Varianten. Während bei nonsense und frame shift Mutationen oder Varianten innerhalb der kanonischen splice site sowie bei vielen Deletionen mit hoher Wahrscheinlichkeit ein nachteiliger Effekt zu erwarten ist, ist die Beurteilung von missense aber auch von synonymen Varianten oft schwierig. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch synonyme Varianten über ein verändertes Splicing die Proteinfunktion beeinflussen oder Varianten in nicht-kodierenden Bereichen nachteilig wirken. Pathogene Repeatexpansionen, wie sie beispielsweise im Kontext der frontotemporalen Demenz (*C9orf72*) oder Formen der spinocerebellären Ataxie (SCA) relevant sind oder Deletionen und Insertionen mehrerer Exons oder ganzer Gene

können aufgrund der Länge generierter Reads mittels der für diese Arbeit verwendeten Sequenzieretechnologie (short read sequencing) dagegen nicht detektiert werden.

Als Unterstützung bei der Beurteilung nachgewiesener Varianten wurden verschiedene Vorhersage-Programme entwickelt, welche anhand von Algorithmen und unter Berücksichtigung spezifischer Eigenschaften der involvierten Aminosäuren eine Einschätzung des zu erwartenden Effekts liefern (Wu und Jiang 2013). Weit verbreitete Vorhersage-Programme für missense Varianten, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzt wurden, sind MutationTaster (Schwarz et al. 2014, <http://www.mutationtaster.org/>), PolyPhen2 (Adzhubei et al. 2010, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (Ng und Henikoff 2001, <http://sift.jcvi.org/>) und PROVEAN (Choi et al. 2012, <http://provean.jcvi.org/index.php>). Da es sich lediglich um theoretische Berechnungen handelt, können Vorhersage-Programme zwar einen Hinweis bezüglich der Pathogenität von Varianten geben, gelten aber keinesfalls als alleiniges Kriterium zur klinischen Bewertung nachgewiesener Varianten, weshalb nachteilige Effekte funktionell bestätigt werden müssen. Eine weitere Möglichkeit die Pathogenität von Varianten zu beurteilen, bieten diverse Gen- oder Phänotyp-spezifische Datenbanken, die meist sowohl bekannt pathogene Mutationen als auch Polymorphismen ohne bekannte Auswirkung auf den Phänotyp listen und mit entsprechenden Literaturangaben verknüpfen. Ein Beispiel hierfür ist PDmutDB (Parkinson Disease Mutation Database, <http://www.molgen.vib-ua.be/PDmutDB>, Cruts et al. 2012). Weiterhin tragen auch Informationen über die Konservierung der betroffenen Aminosäure, über involvierte Proteindomänen oder Erkenntnisse aus Tiermodellen zur Einschätzung detektierter Varianten bei.

Ein dritter Filterschritt kann außerdem den erwarteten Vererbungsmodus einer gesuchten kausalen Mutation widerspiegeln. Zeigt der Stammbaum der Familie eines Patienten eine klar autosomal-dominant vererbte Erkrankung, kann sich die Analyse auf Veränderungen in autosomal-dominant vererbten Genen fokussieren (analog Konzentration auf compound-heterozygote Mutationen bei autosomal-rezessiven Stammbäumen), wohingegen in konsanguinen Familien meist homozygote Mutationen gesucht werden (Ku et al. 2012). Eine solche Fokussierung sollte allerdings nie starr sein, da Erwartungen aufgrund des Stammbaumes nicht zwingend zutreffen müssen.

Letztlich erlauben nur umfassende funktionelle Studien, die zumindest in der Routine-Diagnostik nicht zu leisten sind, fundierte Aussagen über die tatsächlichen Auswirkungen detektierter Varianten auf die Proteinfunktion und damit auf den beobachteten Phänotyp.

An dieser Stelle sei auch auf Limitationen der NGS-Technologie hingewiesen, die sich auf technischer und analytischer Ebene beschreiben lassen. Erstere umfasst hauptsächlich die unvollständige Definition oder ungenügende Abdeckung von Zielbereichen sowie die oft lückenhafte Repräsentation von GC-reichen Sequenzabschnitten, Homopolymeren, repetitiven Sequenzen und Repeatexpansionen. Hinzu kommen mögliche Fehlerquellen im Zusammenhang mit dem Alignment und Mapping von generierten Reads oder dem Calling und der Annotation von Varianten (Association for Clinical Genetic Science, United Kingdom, 2014). Auf analytischer Ebene bergen zum Beispiel fehlerhafte Angaben in weit verbreiteten Online-Ressourcen oder systematische Fehler innerhalb der diagnostischen Pipeline die Gefahr des irrtümlichen Aussortierens oder der Fehlinterpretation von potentiell pathogenen Varianten (Association for Clinical Genetic Science, United Kingdom, 2014).

Die NGS-Technologie birgt folglich ein enormes Potential in der Diagnose und Erforschung genetisch bedingter Erkrankungen sowie der Identifikation von Krankheitsgenen und genetischen Risikofaktoren oder Modifikatoren, stellt den Anwender aber gleichzeitig auch vor große Herausforderungen. Weiterentwicklungen der Technologie sollten deshalb auf die weitere Optimierung technischer, statistischer und bioinformatischer Methoden abzielen, um die Anzahl falsch-positiver beziehungsweise falsch-negativer Befunde zu minimieren und die Pathogenität nachgewiesener Varianten fundiert zu bewerten (Bamshad et al. 2011).

2. Zielsetzung

Für die vorliegende Arbeit wurde die Next-Generation-Sequenzierung (NGS) sowohl im Kontext der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen und Bewegungsstörungen als auch zum Zwecke diagnostischer Fragestellungen eingesetzt. Beiden Ansätzen gemeinsam ist dabei die Notwendigkeit effizienter Strategien bezüglich Identifikation und Beurteilung von Varianten vor dem Hintergrund des beobachteten Phänotyps. Je nach Ansatz wurden unterschiedliche Ziele verfolgt:

Das Ziel des diagnostischen Einsatzes der NGS-Technologie bestand primär darin, klinische Verdachtsdiagnosen zu sichern und die erzielten Ergebnisse in einem humangenetischen Befund zusammenfassend zu diskutieren. Eine Aufgabe bestand deshalb darin, die regelmäßige Aktualisierung und Erweiterung des CeGaT Genpanels für neurodegenerative Erkrankungen (NDD) durchzuführen, um den Patienten zu jedem Zeitpunkt eine möglichst umfassende und dem aktuellen Stand der Wissenschaft entsprechende molekulargenetische Diagnostik anbieten zu können.

Darüber hinaus wurden mehrere Forschungsprojekte definiert. Ziel dieser war es zum einen einen Beitrag zum tieferen Verständnis der genetischen Grundlagen und assoziierten Pathomechanismen von neurodegenerativen Erkrankungen zu leisten und dabei aktuell diskutierte Hypothesen wie komplexe Vererbungsmodelle oder die Einstufung neurodegenerativer Erkrankungen als variable Manifestationen übergeordneter pathologischer Prozesse aufzugreifen. Zum anderen sollte mit Hilfe der Sequenzierung von Patientenkohorten auch die Rolle verschiedener genetischer Modifikatoren oder Risikofaktoren evaluiert werden und bisher unbeschriebene Kandidatengene als relevant in der Ätiologie definierter neurodegenerativer Erkrankungen identifiziert werden.

Als übergeordnetes Ziel dieser Arbeit kann die Verknüpfung von molekulargenetischer Diagnostik und humangenetischer Forschung betrachtet werden, da beide Ansätze in großem Maße voneinander abhängig sind und Erkenntnisse aus beiden Bereichen der wechselseitigen Implementierung bedürfen, um den Grundstein für zukünftig angestrebte personalisierte Therapieoptionen legen zu können.

3. Material und Methoden

Das nachfolgende Kapitel beschreibt die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch mich beziehungsweise durch Mitarbeiter der CeGaT GmbH angewandten Methoden und Analysen. Sämtliche Methoden, Analysen und Untersuchungen, welche von externen Ko-Autoren durchgeführt wurden, sind der jeweiligen Publikation zu entnehmen.

3.1 DNA-Isolation und Erstellung von DNA-Arbeitsverdünnungen

Die Isolation von DNA aus EDTA-Blut von Patienten entsprechend der Herstellerangaben mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kits (Qiagen) sowie die Bereitstellung von DNA-Arbeitsverdünnungen (100 ng/µl) und Primer-Verdünnungen (5 pmol/µl) wurden im Rahmen des Standardprozesses (routinemäßig) von Mitarbeitern aus dem Labor der Firma CeGaT GmbH übernommen.

3.2 Primer-Design

Das Primer-Design erfolgte mittels des frei zugänglichen Online-Programms Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Die gesetzten Voreinstellungen wurden um folgende, innerhalb der CeGaT GmbH einheitlichen Einstellungen ergänzt, um nach Möglichkeit für alle PCR-Reaktionen ein standardisiertes Cycling-Programm anwenden zu können (siehe auch Abschnitt 3.3):

Primer T_m : 68°C - 72°C

Primer size: 20 nt - 36 nt

Primer CG: 40 % - 60 %

Wenn mit Hilfe von Primer3 trotz moderater Abweichungen von den genannten Parametern kein geeignetes Primer-Paar gefunden werden konnte, wurde versucht, anhand der Zielsequenz manuell ein geeignetes Primer-Paar zu gewinnen. Generell wurden solche Primer bevorzugt, die innerhalb des Genoms ausschließlich an der gewünschten Zielsequenz binden und nicht auf häufigen SNPs liegen. Die Kontrolle

dieser Eigenschaften erfolgte mit Hilfe des UCSC Genome Browsers, Human BLAT Search (<https://genome.ucsc.edu/>).

Wenn nicht auf bereits existierende Primer zurückgegriffen werden konnte, erfolgte das Primer-Design in der Regel durch mich, in seltenen Fällen durch Mitarbeiter des CeGaT-Labors.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, welches unter Zuhilfenahme des Enzyms DNA-Polymerase die exponentielle Vervielfältigung einer Zielregion der DNA erlaubt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der AmpliTaq Gold PCR Master Mix® (Applied Biosystems) sowie der ABI Verity Fast Cyclers oder der ABI 96er Fast Cyclers (Applied Biosystems) wie in Tabelle 1 dargestellt, verwendet. Die erhaltenen Produkte wurden nach der Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.4) mittels Exonuclease I (Fermentas) und Shrimp Alkaline Phosphatase (Fermentas) entsprechend der Herstellerangaben (37°C 15'//80°C 15'//10°C 15'// 12°C ∞) aufgereinigt.

Komponente	Sample	Ctr	Temperatur	Zeit	Zyklen
2x AmpliTaq Gold PCR Master Mix	10 µl	10 µl	95°C	10 min	1x
H ₂ O	7,5 µl	8 µl	96°C	5 sec	40x
Primer Mix (5 pmol/µl)	2 µl	2 µl	64°C	5 sec	
DNA (100 ng/µl)	0,5 µl	-	68°C	40 sec	
			72°C	10 sec	1x
			12°C	∞	1x

Tabelle 1: Standardisiertes Pipettierschema und Reaktionsbedingungen für PCR Reaktionen

Sofern im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders dargestellt, wurde die PCR unter den in Tabelle 1 dargestellten Standardbedingungen routinemäßig durch Mitarbeiter aus dem Labor der Firma CeGaT GmbH durchgeführt.

3.4 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit Hilfe eines 1,5%-igen Agarosegels aufgetrennt (LE Agarose, Biozym; Gelgreen, VWR; 80 - 100 V, 45 - 60 min; 3 µl PCR-Produkt + 5 µl 1x DNA Gel Loading Dye, ThermoFisher Scientific), deren Größe anhand eines mitgelaufenen Größenmarkers (3 µl 100 bp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific) bestimmt und mit der erwarteten Produktgröße verglichen.

Sofern im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders dargestellt, wurde die Gelelektrophorese routinemäßig von Mitarbeitern des CeGaT-Labors durchgeführt.

3.5 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung, auch Kettenabbruch-Methode genannt, dient der Bestimmung der Basenabfolge eines definierten DNA-Fragmentes mittels des Enzyms DNA-Polymerase sowie der Zugabe von Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und markierten Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs).

Analog zur PCR wurde auch hier ein Standardprotokoll gewählt, welches, sofern im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders dargestellt, routinemäßig von Mitarbeitern des CeGaT-Labors durchgeführt wurde. Eingesetzt wurde wie in Tabelle 2 dargestellt das Big Dye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Im Anschluss an die Sequenzier-Reaktion wurden die Produkte mittels Sephadex-Säulen (Sephadex G-50 Fine) oder automatisiert durch den Hamilton-Roboter (Hamilton Company) entsprechend eines Standardprotokolls aufgereinigt. Für die Kapillarelektrophorese wurden 10 µl Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) sowie der 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt.

Nach der technischen Validierung durch das Laborpersonal erfolgte die medizinische Validierung, die Analyse der Sequenzierprodukte hinsichtlich des möglichen Vorliegens relevanter Varianten mit Hilfe der Software SequencingPilot (JSI medical systems) und

die Beurteilung im Kontext des Phänotypen des Patienten durch mich, sofern im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders beschrieben.

Komponente	Menge	Temperatur	Zeit	Zyklen
Big Dye	7 µl	97°C	3 min	1x
Primer F oder R	2 µl	97°C	10 sec	40x
		60°C	3 min	
PCR-Produkt	1 µl	12°C	∞	1x

Tabelle 2: Pipettierschema der Sequenzier-Reaktion und Cycling-Protokoll

3.6 Segregationsanalyse

Die Segregationsanalyse dient der besseren Beurteilung von beim Indexpatienten nachgewiesenen Varianten und bezieht dessen Familienmitglieder mit ein (je nach Fragestellung beispielsweise Eltern oder Geschwister eines Indexpatienten). Der Test beruht auf der Analyse von Familienmitgliedern lediglich hinsichtlich der zur Diskussion stehenden Variante mittels Sanger-Sequenzierung wie oben beschrieben. Die Durchführung der Segregationsanalyse wurde, sofern im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders dargestellt, von Mitarbeitern des CeGaT-Labors übernommen.

Die medizinische Validierung der Ergebnisse sowie deren Beurteilung hinsichtlich der jeweils zugrundeliegenden Fragestellung sowie die Erstellung eines Befundbriefes (siehe auch Abschnitte 3.13) erfolgte durch mich.

3.7 C9orf72-Repeatanalyse

Die Repeatanalyse dient dem Nachweis beziehungsweise dem Ausschluss von pathogenen GGGCC-Hexanukleotid-Repeatexpansionen im nicht-kodierenden Sequenzabschnitt zwischen den Exons 1a und 1b des C9orf72-Gens. Die Untersuchung

setzt sich aus zwei Schritten zusammen und umfasst zunächst eine sogenannte Genotypisierungs-PCR gefolgt von einer Repeat-PCR. Die Genotypisierungs-PCR dient dem Nachweis von Wildtyp-Allelen, während sich mit der Repeat-PCR unter Einsatz spezifischer Repeat-Primer pathogene Expansionen bis zu einer begrenzten Größe darstellen lassen. Eine genaue Größenbestimmung kann anhand eines Western Blots erzielt werden, dies wurde von der CeGaT GmbH jedoch nicht vorgenommen. Die Etablierung dieses Verfahrens analog zu DeJesus-Hernandez et al. (2011) erfolgte durch Kollegen aus der Abteilung für Diagnostik und dem Labor der CeGaT GmbH.

Die Auswertung und Beurteilung der erzielten Ergebnisse mit Hilfe der installierten Geräte-Software GeneMapper® (Applied Biosystems) erfolgte, falls im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders dargestellt, durch mich.

Analog können mit diesem Verfahren auch pathogene Repeatexpansionen in anderen Genen wie beispielsweise der Gene, welche im Zusammenhang mit spinocerebellären Ataxien (SCAs) beschrieben sind, nachgewiesen werden. Die Etablierung sowie die Auswertung dieser Untersuchungen wurden durch Mitarbeiter aus der Einzelgen-Diagnostik und dem Labor vorgenommen.

3.8 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Die MLPA ist ein Standardverfahren zum Nachweis von Gendosis-Veränderungen (Deletionen/Duplikationen) und wurde im Rahmen diagnostischer Fragestellungen angewandt. Sofern im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders dargestellt, wurde die MLPA durch Mitarbeiter aus dem CeGaT-Labor durchgeführt. Verwendet wurden SALSA MLPA Probenmixe (MRC Holland) entsprechend der Herstellerangaben.

Die Auswertung und Beurteilung der erzielten Ergebnisse erfolgte, sofern nicht anders dargestellt, mit Hilfe der Software SequencingPilot (JSI medical systems) durch mich.

3.9 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR ist eine Methode, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur relativen Quantifizierung von DNA genutzt wurde (Deletions-/Duplikationsanalyse), falls kein spezifisches MLPA-Kit zur Verfügung stand. Die Analyse wurde mit Hilfe des Luminaris Color c ROX qPCR Master Mixes (ThermoFisher Scientific) und dem QuantStudio 12 K Flex System (Life Technologies) durch Mitarbeiter aus dem CeGaT-Labor entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Mögliche Abweichungen von diesem Vorgehen werden in der jeweiligen Publikation benannt.

Die Analyse der Ergebnisse und deren Beurteilung wurden mit Hilfe der installierten Gerätesoftware, falls im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders dargestellt, durch mich vorgenommen.

3.10 Panel-Update

Das Update des CeGaT-Panels für neurodegenerative Erkrankungen wurde in regelmäßigen Abständen im Austausch mit externen klinischen Partnern sowie in Zusammenarbeit mit Kollegen aus der Abteilung für Bioinformatik durchgeführt. In meinen Aufgabenbereich fielen dabei die Auswahl relevanter Gene über eine umfassende Literaturrecherche sowie die Einteilung dieser Gene in verschiedene krankheitsspezifische Subpanels, um eine dem aktuellen Stand der Wissenschaft entsprechende genetische Diagnostik anbieten zu können. Neben der Anwendung in der Routine-Diagnostik wurden die verschiedenen Versionen des resultierenden Anreicherungs-Kits (Panels) auch zur Bearbeitung von Forschungsfragestellungen eingesetzt.

3.11 Next-Generation-Sequenzierung (NGS)

Die Next-Generation Sequenzierung dient der massiven parallelen Sequenzierung von Millionen DNA-Fragmenten und setzt sich plattformübergreifend im Wesentlichen aus fünf Schritten zusammen:

- I. Erstellung einer Sequenzierbibliothek
- II. Amplifikation
- III. Sequenzierung und Signaldetektion
- IV. Bioinformatische Aufbereitung der Rohdaten
- V. Analyse/Auswertung

Für die vorliegende Arbeit wurden die NGS-Plattformen SOLiD® (Sequencing by Ligation; Applied Biosystems) sowie HiSeq 2500 (Sequencing by Synthesis; Illumina®) eingesetzt. Für Panel-Sequenzierungen wurde das oben erwähnte Custom Design Panel (Agilent) eingesetzt, für Exom-Sequenzierungen das SureSelect Exome Kit (Agilent), beides in der zum Untersuchungszeitpunkt jeweils aktuellen Version. Die Schritte I bis III wurden dabei entsprechend der jeweiligen Herstellerangaben mit dem oben beschriebenen Custom-Design-Panel für neurodegenerative Erkrankungen oder dem SureSelect Exome Kit von speziell geschultem Laborpersonal der Firma CeGaT GmbH durchgeführt. Die Aufbereitung der erhaltenen Rohdaten (Schritt IV) erfolgte angepasst an die verwendete Plattform nach einer definierten bioinformatischen Pipeline durch Mitarbeiter aus der entsprechenden Fachabteilung der Firma CeGaT. Dieser Prozess wiederum umfasst plattformübergreifend die folgenden Schritte:

IV.i Primäranalyse: Sequence Generation

Konvertierung der Rohdaten in Sequenzdaten mit assoziierten Qualitätsmerkmalen (signal analysis, base calling, base quality scoring) und Generierung von Reads (read generation) mittels jeweils installierter Gerätesoftware; Demultiplexing von gepoolten Proben.

IV.ii Sekundäranalyse: Alignment / Variant Detection

Alignment gegen das Referenzgenom (HiSeq 2500: Burrows Wheeler Aligners BWA-mem; SOLiD: BFAST); Filterung von PCR-Duplikaten (duplicate read filtering); Re-Alignment der Reads in der Nähe von InDels; Re-Kalibrierung der Qualitätsmerkmale; Detektion von Varianten (variant calling) in der kodierenden Region und in benachbarten

intronischen Regionen (± 8 bp) bis zu einer Minor Allele Frequency von 1% (HiSeq 2500: SAMtools und VarScan; SOLiD: GATK; bekannt pathogene Varianten werden bis zu ± 30 bp detektiert); Filterung von falsch-positiven Varianten.

IV.iii Tertiäranalyse: Annotation

Bereitstellung von Kontextinformation (Frequenz, Art der Veränderung, Konsequenz auf Proteinebene, Konservierung) durch Implementierung gängiger Datenbanken und einer CeGaT-internen Datenbank.

Ziel dieses Prozesses ist die Generierung einer individuellen SNP-Liste oder beispielsweise einer sogenannten „common SNP-Liste“ (bei vergleichenden Exom-Analysen, siehe z.B. Kurzwelly et al. 2015 [A3]) in tabellarischer Form. Die SNP-Liste enthält im Wesentlichen folgende Informationen:

- Chromosomale Position detektierter Veränderungen
- Lokalisation und Art nachgewiesener Veränderungen auf cDNA-Ebene
- Konsequenz detektierter Veränderungen auf Proteinebene
- Zygotie nachgewiesener Veränderungen
- Beobachtete Frequenz der Veränderungen in der Allgemeinbevölkerung
- Evolutionäre Konservierung der betroffenen Positionen

Anhand dieser sowie zusätzlicher Informationen aus verschiedenen (genspezifischen) Datenbanken, aktueller Literatur und in-silico Online-Vorhersagetools erfolgt dann die Beurteilung aller detektierten Varianten hinsichtlich des beobachteten Phänotyps des untersuchten Patienten (Schritt V).

Diese Auswertung (detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 3.12) wurde, sofern im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders beschrieben, von mir vorgenommen. Im Falle von diagnostischen Fragestellungen

erstellte ich außerdem eine beurteilende Zusammenfassung der Ergebnisse in Form eines Befundbriefes an den einsendenden Arzt (siehe auch Abschnitt 3.13).

3.12 Auswertung von NGS-Daten und Beurteilung detektierter Varianten

Die Auswertung der generierten NGS-Daten erfolgte auf Basis der bereitgestellten SNP-Listen, sofern im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders dargestellt, durch mich. Die Beurteilung von detektierten Varianten hinsichtlich einer möglichen Pathogenität und deren klinischer Relevanz für den einzelnen Patienten ist sowohl im Rahmen von diagnostischen als auch von wissenschaftlichen Fragestellungen von zentraler Bedeutung für die vorliegende Arbeit.

Die Beurteilung nachgewiesener Varianten basiert im Wesentlichen auf folgenden Kriterien:

- Frequenz in der Allgemeinbevölkerung und in einem großen inhouse-Datensatz: Exome Variant Server, ExAC Browser, dbSNP, 1000 Genomes, Ensembl, genspezifische Datenbanken (Informationen aus dbSNP und ExAC in SNP-Liste enthalten). Sofern nicht anders dargestellt, wurden entsprechend der Empfehlungen innerhalb der CeGaT GmbH folgende Grenzwerte festgelegt (ausgenommen sind bekannt pathogene Mutationen mit Frequenzen oberhalb der festgelegten Grenzwerte): Minor allele frequency $\leq 0,1\%$ bei dominanter Vererbung, minor allele frequency $\leq 1\%$ bei rezessiver Vererbung.
- Konsequenz der Veränderung auf Proteinebene: z.B. frameshift, nonsense, missense, splicing, deletion/duplication, synonymous (Information in SNP-Liste enthalten)
- Lage der Veränderung im Protein: z.B. innerhalb funktioneller Domänen oder Repeat-Regionen (z.B. via ExPASy <https://www.expasy.org/genomics>; Uniprot <http://www.uniprot.org/>)
- Vererbungsmodus: Dominant/rezessiv

- Zygotie: Heterozygot/homozygot (Information in SNP-Liste enthalten)
- Phänotyp des Patienten
- Evolutionäre Konservierung: Multiple Alignments über mehrere Spezies (z.B. via NCBI HomoloGene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>)
- In-silico Vorhersagen anhand verschiedener Online-Tools: z.B. MutationTaster, PolyPhen2, PROVEAN, SIFT, NetGene2, Splice Site Prediction by Neural Network
- Überprüfung der generierten Reads durch Visualisierung mittels IGV (z.B. Ausschluss von Artefakten, Überprüfung der Coverage).
- Evidenz aus der Literatur

Sofern nicht in der bereitgestellten SNP-Liste enthalten, wurden die benötigten Informationen durch mich zusammengetragen und entsprechend der jeweiligen Fragestellung eingeordnet, analysiert und beurteilt. Durch die Zusammenschau dieser Analysen und Recherchen konnte ich so eine Klassifizierung nachgewiesener Varianten als pathogen, möglicherweise pathogen, unklar, wahrscheinlich benigne und benigne vornehmen. Dies entspricht der in einem Consensus Paper von Richards et al. (2015) vorgeschlagenen Vorgehensweise zur Klassifizierung von Varianten.

Abweichungen von diesem Vorgehen waren als Anpassung an die jeweilige Fragestellung möglich. Dies schließt beispielsweise die Erniedrigung des Grenzwertes der Frequenz bei sehr seltenen Erkrankungen oder die Konzentration auf homozygote Varianten bei Patienten aus konsanguinen Familien durch eine von mir vorgenommene entsprechende Filterung und Bearbeitung der bereitgestellten SNP-Liste ein. Die beschriebene Vorgehensweise gilt auch für die Bearbeitung von „common SNP-Listen“, welche nach Rücksprache von Mitarbeitern aus der Abteilung für Bioinformatik bereitgestellt wurden.

Abweichungen von der hier beschriebenen Vorgehensweise wurden jeweils im entsprechenden Unterkapitel im Abschnitt „Ergebnisse und Diskussion“ festgehalten. Die durchschnittliche Anzahl an zu beurteilenden Varianten variierte dabei von etwa zehn bis 15 Varianten bei der Analyse eines einzelnen Subpanels, bis hin zu mehreren

Tausend Varianten bei Einzel-Exomen, beispielsweise bei der Suche nach möglichen Kandidatengen.

3.13 Erstellung von Befundbriefen

Im Kontext diagnostischer Fragestellungen erfolgte die Erstellung medizinischer Befundbriefe an den einsendenden Arzt durch mich. Ein solcher Befundbrief enthält neben einer Beschreibung der angewandten Methoden die zusammengefassten und vor dem Hintergrund des Phänotyps des Patienten beurteilten Ergebnisse der NGS-Diagnostik (siehe Abschnitt 3.12). Der Befundbrief muss neben der genauen Benennung nachgewiesener Varianten, Informationen über deren Pathogenität, deren Vererbungsmodus, deren Konsequenzen auf das betreffende Protein, deren phänotypische Ausprägung, deren Bedeutung für Familienangehörige und Verweise auf aktuelle Literatur enthalten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden, soweit im Kapitel „Eigenanteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen“ nicht anders dargestellt, nicht nur die Befundbriefe für die im Kapitel „Publikationen“ beschriebenen Patienten bzw. Familien durch mich erstellt. Zusätzlich wurden zahlreiche weitere Befunde im Rahmen diagnostischer Aufträge durch mich angefertigt.

3.14 Etablierung eines Amplikon-basierten NGS-Ansatzes

Für das in Kapitel 4.3 vorgestellte Projekt zur Überprüfung von *HEPH* als mögliches Kandidatengen für Erkrankungen aus dem NBIA-Spektrum wurde durch mich ein Amplikon-basierter NGS-Ansatz etabliert. Die Idee, *HEPH* als Kandidatengen zu betrachten, geht auf mich zurück. Die Idee zur Umsetzung dieses Projektes reifte in gemeinsamen Diskussionen mit einer CeGaT-Mitarbeiterin aus der Abteilung für Forschung und Entwicklung. Abgesehen von der Einbindung der Proben in einen Sequenzierlauf wurden sämtliche Versuche und Tests im Rahmen der Etablierung dieses Ansatzes von mir selbst durchgeführt. Dies beinhaltete:

- Auswahl der 15 parallel im Ansatz untersuchten Gene (siehe Abbildung 5B) zum Ausschluss möglicherweise pathogener Veränderungen in bekanntermaßen mit der Erkrankung assoziierten Genen anhand einer eingehenden Literaturrecherche
- Primer-Design wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, zur Amplifikation aller kodierenden Exons der zu untersuchenden Gene (242 Fragmente) mit folgenden Vorgaben:
 - o Produktlänge maximal 480 bp
 - o Primer T_m : 60°C bis 72°C, Einteilung der Primer-Paare in drei Temperaturkategorien und jeweils Anpassung der Annealing-Temperatur
 - Kategorie a: Primer T_m 68°C - 72°C; Annealing 64°C
 - Kategorie b: Primer T_m 64°C - 68°C; Annealing 60°C
 - Kategorie c: Primer T_m 60°C - 64°C; Annealing 56°C
 - o Primer-Länge 21 nt bis 30 nt
 - o CG-Gehalt 40% bis 60%
 - o Einfügen eines NGS-Tags (definierte Nukleotidsequenz)
- Einzeltestung aller Primer-Paare mit Test-DNA mittels PCR und Gelelektrophorese nach Standardbedingungen wie im Abschnitt 3.3 und 3.4 beschrieben; Re-Design weniger ausgefallener Primer
- Zusammenstellung von Primer-Paaren in 10er-Pools unter Berücksichtigung der Temperaturkategorien und der jeweiligen Produktgrößen (Vermeidung von sehr ähnlichen Produktgrößen innerhalb eines Primer-Pools)
- Etablierung eines Multiplex-PCR-Ansatzes mit Test-DNA:
 - o Experimentelle Bestimmung der minimalen Anzahl an PCR-Zyklen, die eine visuelle Kontrolle der PCR-Produkte per Gelelektrophorese erlaubt, zur Vermeidung unnötiger Zyklen und damit zur Reduktion der Fehlerrate
 - o Experimentelle Bestimmung der optimalen Primer-Konzentration innerhalb eines Pools, um Unterschiede in der Effizienz der einzelnen PCR-Reaktionen auszugleichen

Dies resultierte in folgender Multiplex-PCR und folgendem Cycling-Programm:

Komponente	Sample	Ctr	Temperatur	Zeit	Zyklen
2x AmpliTaq Gold PCR Master Mix	10 µl	10 µl	95°C	10 min	1x
H ₂ O	4,5 µl	5 µl	96°C	5 sec	25x
Primer Mix (0,5 pmol/µl each primer)	5 µl	5 µl	64°C/60°C/56°C	5 sec	
DNA (100 ng/µl)	0,5 µl	-	68°C	40 sec	
			72°C	10 sec	1x
			12°C	∞	1x

Tabelle 3: Pipettierschema und Cycling-Protokoll der etablierten Multiplex-PCR (Annealing-Temperatur je nach Primer-Kategorie 64°C, 60°C oder 56°C)

- Aufreinigung der PCR-Produkte mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kits (Qiagen) mit folgenden Abweichungen zum Protokoll des Herstellers: Einsatz von 15 µl PCR-Produkt und 75 µl PB-Puffer; Einsatz von 12 µl EB-Puffer
- Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Nanodrop (Thermo Scientific) beziehungsweise Bioanalyzer High Sensitivity Chip (Agilent Technologies) entsprechend der Herstellerangaben
- Erneute Aufreinigung der PCR-Produkte mittels magnetischer Beads (Agencourt® AMPure® XP-Kit, Beckman Coulter) entsprechend der Herstellerangaben
- Erstellung von gepoolten paired-end libraries mittels des Nextera DNA Library Preparation Kits (Illumina) entsprechend der Herstellerangaben mit folgenden Abweichungen: Statt 15 µl des Nextera PCR Master Mixes wurden 30 µl des AmpliTaq Gold PCR Master Mixes eingesetzt, als Anpassung an das veränderte Reaktionsvolumen wurden zur Aufreinigung 36 µl statt der vorgesehenen 30 µl beads eingesetzt
- Sequenzierung auf dem HiSeq 2500 (Illumina)
- Anwendung der bioinformatischen Pipeline wie in Abschnitt 3.11 (Schritte IV.i bis IV.iii) beschrieben durch Mitarbeiter aus der Abteilung für Bioinformatik

- Visuelle Kontrolle der generierten Reads hinsichtlich Coverage mit dem Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad Institute)

Die in Kapitel 4.3 erwähnte Sanger-Sequenzierung beziehungsweise die Auswertung von NGS-Daten hinsichtlich Varianten im *HEPH*-Gen bei 38 von mir ausgewählten Patienten mit entsprechender Symptomatik erfolgte wie in den Abschnitten 3.5 und 3.12 beschrieben durch mich.

3.15 Statistische Methoden

Zum Vergleich des mittleren Erkrankungsalters von Patienten im Rahmen der Panel-Sequenzierung einer deutschen ALS-Kohorte (Kapitel 4.2) wurde der Kruskal-Wallis Rank Sum Test durch Mitarbeiter aus der Abteilung für Bioinformatik der CeGaT GmbH durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Um die im Kapitel 2 genannten Ziele zu erreichen, wurde die Panel- und die Exom-Sequenzierung mittels NGS sowohl für die Forschung als auch für diagnostische Zwecke eingesetzt. Abbildung 3 stellt die relevanten Teilprojekte und publizierten Ergebnisse beziehungsweise zur Publikation eingereichte Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in ihrem jeweiligen methodischen Kontext dar.

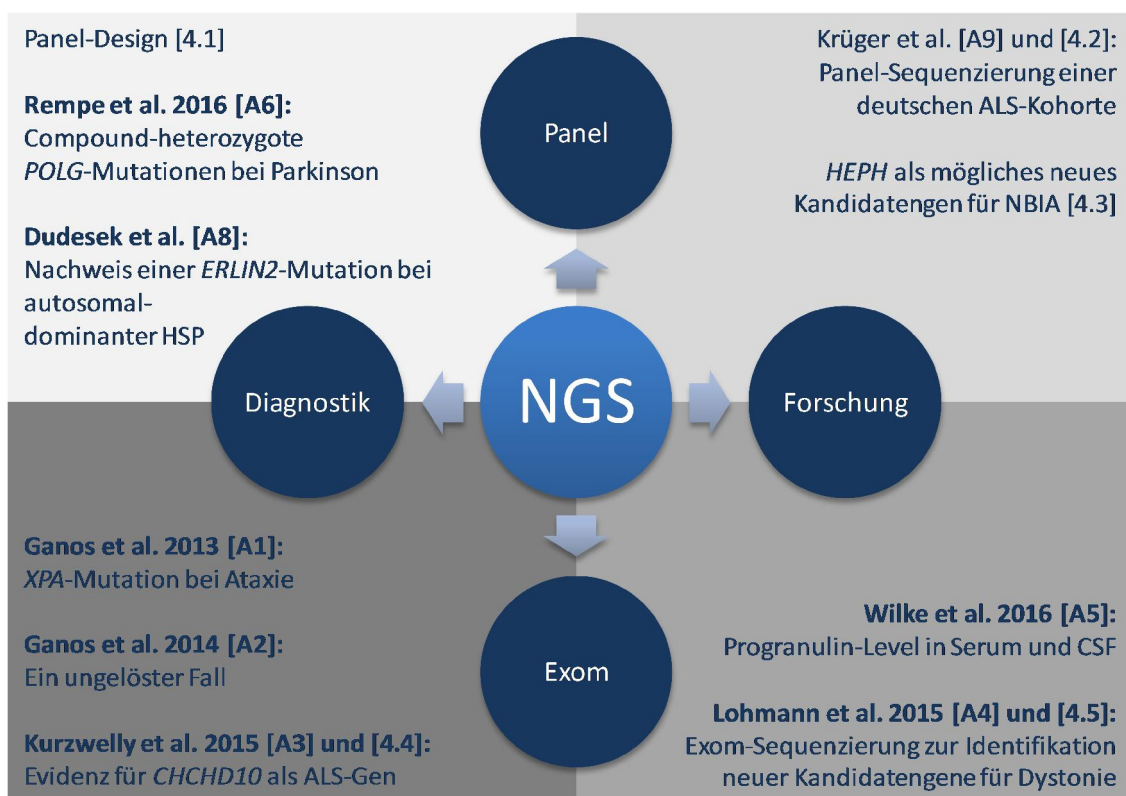


Abbildung 3: Die Abbildung zeigt die im Rahmen der vorgelegten Dissertation bearbeiteten NGS-basierten Projekte in ihrem jeweiligen methodischen und inhaltlichen Kontext.

4.1 Panel-Design

Zu den Aufgaben innerhalb der Promotion bei der CeGaT GmbH zählte neben der Bearbeitung verschiedener Projekte, die auf die weitere Erforschung der genetischen Grundlagen neurodegenerativer Erkrankungen abzielten, auch die regelmäßige Erweiterung und Aktualisierung des Diagnostik-Panels für neurodegenerative

Erkrankungen und Bewegungsstörungen anhand aktueller Literatur (siehe auch Kapitel 3.10). Während das zu Beginn der Promotion Anfang 2012 eingesetzte Anreicherungs-Kit NDD_v2 inklusive zahlreicher Kandidatengene 277 Gene ohne Einteilung in Subpanels je nach Phänotyp umfasste, beinhaltet die Version NDD_v6 inklusive einiger Kandidatengene 477 Gene, eingeteilt in 24 definierte Subpanels. Damit kann folglich eine umfassende und dem aktuellen Stand der Wissenschaft entsprechende humangenetische Diagnostik für unterschiedliche neurodegenerative Erkrankungen und Bewegungsstörungen wie beispielsweise Parkinson, Demenz, Amyotrophe Lateralsklerose, Ataxie, hereditäre spastische Spinalparalysen oder Dystonie sowie einige weitere seltene Erkrankungen angeboten werden.

Im Rahmen der vorliegenden Promotion fand dieses Diagnostik-Panel in unterschiedlichen Versionen neben den in den folgenden Kapiteln beschriebenen Forschungsprojekten auch vielfache Anwendung im Rahmen von diagnostischen Fragestellungen. Dies beinhaltete sowohl die Auswertung der generierten NGS-Daten sowie die Erstellung eines fundierten medizinischen Befundes, welcher nachgewiesene Varianten nicht nur beschreibt, sondern deren Relevanz im Hinblick auf den Phänotyp des Patienten auch zu beurteilen und einzuordnen versucht. Beispielhaft sei in diesem Zusammenhang auf zwei Manuskripte verwiesen, die auf der Beschreibung zweier Fälle aus der Routine-Diagnostik der CeGaT GmbH beruhen (Rempe et al. [A6]; Dudesek et al. [A8]).

4.2 Panel-Sequenzierung in einer deutschen ALS-Kohorte

4.2.1 Hintergrund

Bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) handelt es sich um eine multisystemische neurodegenerative Erkrankung mit bevorzugtem Befall von Motoneuronen, die zu einer muskulären Paralyse und meist innerhalb weniger Jahre zum Tod führt (Peters et al. 2015). Das mittlere Erkrankungsalter wird für die sporadische Form mit 56 Jahren und für die familiäre Form mit 46 Jahren angegeben (Kinsley und Siddique 2015). Männer sind im Verhältnis 1,5:1 häufiger betroffen als Frauen (Bento-Abreu et al. 2010). Die

Prävalenz der ALS in der Bevölkerung beträgt etwa 1:20.000 und die weltweite Inzidenz liegt bei circa 1:50.000 pro Jahr (Chen et al. 2013).

Seit im Jahr 1993 durch Rosen und Kollegen mit einer Mutation im *SOD1*-Gen erstmals eine genetische Ursache der ALS beschrieben wurde, kommt der Erforschung der genetischen Grundlagen der ALS wachsende Bedeutung zu (Rosen et al. 1993). In etwa 10% der Fälle wird die Erkrankung als familiär eingestuft (mindestens ein weiteres betroffenes Familienmitglied), wohingegen 90% der Erkrankungen als sporadisch klassifiziert werden (Chen et al. 2013).

Die *Amyotrophic Lateral Sclerosis Online genetics Database* listet aktuell 126 Gene, die als relevant in der Ätiologie der ALS gelten oder mit der Erkrankung assoziiert werden (Abel et al. 2012, <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>, letzter Zugriff: 22.12.2015). Demnach gilt die Amyotrophe Lateralsklerose als Erkrankung, die durch eine große Lokusheterogenität gekennzeichnet ist und sowohl autosomal-dominant als auch autosomal-rezessiv oder X-chromosomal vererbt werden kann (Chen et al. 2013). Die am häufigsten betroffenen Gene *C9orf72*, *SOD1*, *FUS* und *TARDBP* bedingen dabei einen Anteil von mehr als 60% der familiären Fälle. Allerdings wurden kausale Mutationen in Genen, die mit der familiären Form der Erkrankung in Verbindung gebracht wurden, auch bei Patienten, die an der sporadischen ALS erkrankt sind, nachgewiesen, wenn auch in geringerem Ausmaß (Su et al. 2014), beispielsweise durch unvollständige Penetranz, nicht-biologische Vaterschaft, autosomal-rezessive Vererbung oder *de novo* Mutationen.

Durch den Einsatz von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) und der NGS-Technologie konnten innerhalb der letzten Jahre zahlreiche neue Krankheitsgene, Kandidatengene, Risikofaktoren und Modifikatoren (z.B. mit Effekt auf das Erkrankungsalter, die Progressionsrate oder die klinische Manifestation) identifiziert werden (Bettencourt und Houlden 2015). Vor allem Risikofaktoren und Modifikatoren sind dabei nicht zwingend direkt ursächlich, sondern können möglicherweise auch indirekt im Zusammenspiel mit anderen genetischen Faktoren nachteilig wirken (Renton et al. 2014).

Mutationen in ALS-assoziierten Genen bewirken verschiedene molekulare Pathomechanismen, welche neurodegenerative Prozesse initiieren oder fördern und

umfassen unter anderem die Aggregation fehlgefalteter Proteine (vornehmlich Aggregate des TDP-43 Proteins, kodiert durch das *TARDBP*-Gen), mitochondriale Dysfunktion und daraus resultierenden oxidativen Stress sowie Defekte in der axonalen Struktur und innerhalb axonaler Transportmechanismen (Redler und Dokholyan 2012, siehe auch Kapitel 1.2). Da die genannten Mechanismen weniger als spezifische, sondern vielmehr als übergeordnete Motive neurodegenerativer Veränderungen gelten, wird die ALS zunehmend in einen Kontext neurodegenerativer Erkrankungen mit teils stark überlappenden Pathologien und Phänotypen gestellt (Redler und Dokholyan 2012). Dies wird noch verdeutlicht durch Berichte von Patienten, die potentiell pathogene Varianten in Genen tragen, welche mit verwandten Pathologien (z.B. Frontotemporale Demenz, hereditäre spastische Paralyse oder Spinale Muskelatrophie) verknüpft sind.

Aktuell wird außerdem eine Hypothese diskutiert, wonach die ALS eine Erkrankung von komplexer genetischer Ursache ist. Verschiedene Kohortenstudien an fALS und sALS Patienten berichten über Häufigkeiten von 1,6% bis 31,7%, mit der potentiell pathogene Varianten in mehr als einem ALS-assoziierten Gen nachgewiesen werden konnten (Kenna et al. 2013; van Blitterswijk et al. 2012; Cady et al. 2015). Das Vorliegen mehr als einer möglicherweise pathogenen Variante wurde beispielsweise bei Cady et al. (2015) mit einem um zehn Jahre signifikant jüngeren Erkrankungsalter verknüpft.

4.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Das TüRoBo-Projekt stellt eine Kooperation zwischen Tübingen (Stefanie Krüger und Dr. Dr. Saskia Biskup, CeGaT GmbH), Rostock (PD Dr. med. J. Prudlo, Klinik für Neurologie und Poliklinik) und Bochum (Dr. med. T. Grehl, Neurologische Universitätsklinik und Poliklinik) dar mit dem Ziel, zum Verständnis der genetischen Grundlagen der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) beizutragen. Außerdem soll gleichzeitig der Nutzen der Panel-Sequenzierung mittels NGS sowohl in der humangenetischen Forschung als auch in der molekulargenetischen Diagnostik aufgezeigt werden. Um dies zu erreichen, wurden folgende Projektziele definiert:

- A. Nachweis publizierter und bisher unbeschriebener potentiell pathogener Varianten in 39 ALS-assoziierten Genen.
- B. Untersuchung eines komplexen genetischen Modells der ALS.
- C. Verknüpfung der ALS mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen auf genetischer/mechanistischer Ebene anhand der Analyse mehr als 200 zusätzlicher Gene.

Im Zeitraum April 2011 bis August 2012 wurden hierfür im Rahmen der Patientenversorgung in Spezialsprechstunden der Universitätskliniken Rostock und Bochum 80 Patienten (55% männlich, 45% weiblich; 7,5% familiär, 92,5% sporadisch; 82,5% ALS, 6,25% ALS-FTD, 2,5% flail leg, 2,5% flail arm, 6,25% primäre Lateralsklerose (PLS); mittleres Erkrankungsalter 60,1 Jahre) rekrutiert.

Alle Patienten wurden in einem ersten Schritt auf eine pathologische Repeat-Expansion im *C9orf72*-Gen hin untersucht, gefolgt von einer umfassenden Panel-Sequenzierung, die 39 ALS-assoziierte Gene sowie 238 weitere Gene, die mit neurodegenerativen Erkrankungen im Zusammenhang stehen, beinhaltet. Die Beurteilung nachgewiesener Varianten erfolgte für jeden Patienten entsprechend einer definierten Vorgehensweise (Krüger et al. [A9]), unter anderem unter Berücksichtigung der jeweiligen Allelfrequenz, verschiedener Vorhersageprogramme sowie spezifischer Online-Datenbanken und aktueller Literatur (Krüger et al. [A9]). Folgende zum Zeitpunkt des Projektstarts mit ALS assoziierte Gene wurden analysiert (Tabelle A9-1):

ALS2, ANG, APEX1, ATXN1, ATXN2, C9orf72, CCS, CHMP2B, DAO, DCTN1, DPP6, FGGY, FIG4, FUS, GLE1, GRN, HEXA, HFE, ITPR2, KIFAP3, LIF, NAIP, NEFH, OPTN, PON1, PON2, PON3, RNF19A, SETX, SLC1A2, SOD1, SPAST, SPG11, TARDBP, UNC13A, VAPB, VCP, VEGFA und *VPS54*.

A. Nachweis potentiell pathogener Varianten in 39 ALS-assoziierten Genen

Anhand der Analyse von 39 mit ALS-assoziierten Genen konnten 79 seltene Varianten (minor allele frequency, MAF_EA $\leq 1\%$ in dbSNP, EVS oder ExAC) nachgewiesen

werden, von denen 45 Varianten bisher nicht in der Literatur beschrieben wurden. Nach Ausschluss synonymmer Varianten, deren tatsächlicher Effekt auf das Protein ohne weiterführende funktionelle Untersuchungen nicht sicher beurteilt werden kann, wurden in Summe 54 seltene Varianten bei 23 männlichen und 25 weiblichen Patienten identifiziert. Dies entspricht dem Nachweis potentiell pathogener Veränderungen in 60% der Studienteilnehmer (Abbildung 4).

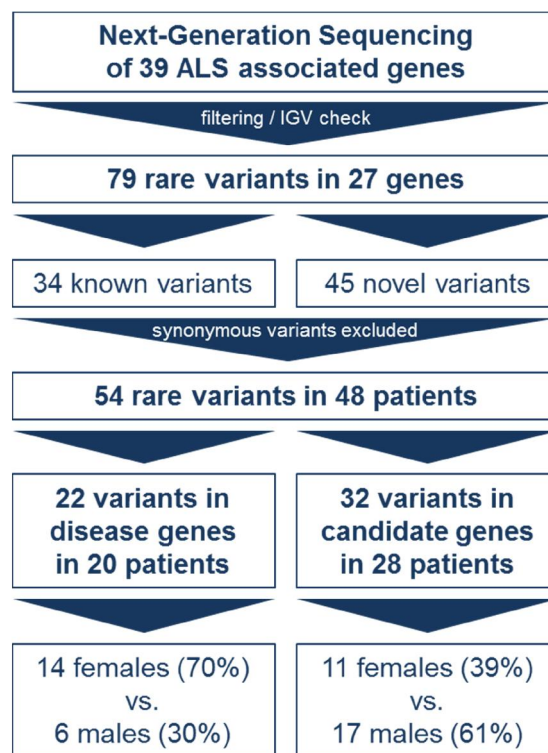


Abbildung 4: Schematische Darstellung der angewendeten Filterschritte und Anzahl der daraus resultierenden Varianten innerhalb der untersuchten Kohorte (Krüger et al. [A9]).

Von den 20 Patienten, die Träger von Varianten in anerkannten Krankheitsgenen sind, sind 95% an der sporadischen Form erkrankt. Aufgrund der Tatsache, dass sporadische Fälle den Großteil der Kohorte ausmachen, erscheint dies einerseits logisch, andererseits wäre dennoch eine Häufung potentiell pathogener Varianten in ALS-Genen bei familiären Fällen zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse veranschaulichen jedoch,

dass genetische Faktoren auch bei scheinbar sporadischen Erkrankungen relevant sind und eine umfassende genetische Diagnostik bei diesen Patienten indiziert ist. Tabelle A9-2 fasst die innerhalb der Kohorte in ALS-assoziierten Genen identifizierten Varianten zusammen.

Anhand der Untersuchung des *C9orf72*-Gens konnte bei fünf sporadischen Patienten (Pat #2, Pat #10, Pat #24, Pat #373, Pat #673; 6,3% der Gesamtkohorte, mittleres Erkrankungsalter 67,6 Jahre) eine pathologische Repeatexpansion (n Repeats ≥ 30) sowie bei vier Patienten (Pat #6, Pat #25, Pat #26, Pat #729; 5% der Gesamtkohorte, mittleres Erkrankungsalter 57,0 Jahre) eine intermediäre Repeatexpansion (20 bis einschließlich 29 Repeateneinheiten) nachgewiesen werden (Tabelle A9-3).

Aktuell wird noch diskutiert, ab welcher genauen Repeatanzahl ein klar pathologischer Effekt angenommen werden kann und inwieweit intermediäre Expansionen nachteilig auf den Phänotyp wirken (Rohrer et al. 2015). Wie bereits in Kapitel 4.2.1 dargestellt, gehört *C9orf72* zu den am häufigsten betroffenen Genen bei ALS/ALS-FTD und bedingt in Deutschland 21,7% der familiären und 5,2% der sporadischen ALS-Erkrankungen (Majounie et al. 2012). Demnach spiegelt der Prozentsatz der identifizierten Mutationsträger (n Repeats ≥ 30) bei sporadischen Fällen den Erwartungswert grob wider, wohingegen dies bei familiären Erkrankungen nicht der Fall ist. Auffällig ist das um eine Dekade jüngere Erkrankungsalter bei Trägern einer intermediären Repeatexpansion (20 bis 29 Repeateneinheiten) im Vergleich zu Trägern von pathogenen Repeatexpansionen. Analog zu einer Hypothese von van Blitterswijk und Kollegen (2012), wonach zusätzliche genetische Faktoren die Pathogenese der ALS bei Trägern pathogener *C9orf72*-Repeatexpansionen beeinflussen, könnten auch bei Trägern von intermediären Repeatexpansionen zusätzliche Varianten modulierend auf den Phänotyp oder das Manifestationsalter wirken. Tatsächlich konnten bei zwei der vier Träger einer intermediären Expansion (Pat #26, Pat #729) zusätzliche Varianten in ALS-assoziierten Genen nachgewiesen werden. Innerhalb der fünf Träger einer pathogenen Repeatexpansion konnten ebenfalls zwei Patienten (Pat #10 und Pat #373) mit zusätzlichen Varianten identifiziert werden (Tabelle A9-3).

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten außerdem bei 28 Patienten in Summe 32 seltene Varianten in Kandidatengen, Risikofaktoren oder Modifikatoren identifiziert werden (Tabelle A9-2). Beispielsweise konnte bei vier Patienten jeweils eine heterozygote missense-Variante im *GRN*-Gen nachgewiesen werden. Obwohl bisher hauptsächlich loss-of-function Mutationen in *GRN* als ursächlich für eine frontotemporale Demenz beschrieben wurden (Gass et al. 2006), deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass missense Mutationen in *GRN* auch mit der Pathogenese der ALS verknüpft sind (Cannon et al. 2013). Folglich sollte die genetische Routine-Diagnostik bei ALS zukünftig auch die Analyse des *GRN*-Gens umfassen. Weiterhin konnten acht Varianten im *FGGY*-Gen, sieben Varianten in *ITPR2* und drei Varianten im *UNC13A*-Gen nachgewiesen werden, welche möglicherweise modulierend wirken könnten.

Ein Vergleich der Häufigkeit, mit der Varianten in den untersuchten Genen innerhalb der hier beschriebenen Kohorte und in publizierten ausländischen Kohorten auftreten, deutet darauf hin, dass die entsprechenden Genfrequenzen möglicherweise aufgrund von Gründereffekten von Population zu Population variieren können (Tabelle A9-6). Als Beispiel seien Varianten in *VAPB* genannt, welche bei 5% der hier untersuchten deutschen Patienten, jedoch nicht bei US-amerikanischen oder irischen Patienten identifiziert werden konnten (Couthouis et al. 2014; Kenna et al. 2013).

B. Untersuchung eines komplexen Vererbungsmodells der ALS

In Anlehnung an publizierte Studien, welche ein komplexes Vererbungsmodell der ALS befürworten (z.B. van Blitterswijk et al. 2012), wurden im Rahmen dieses Projektes 15 Patienten (18,8% der Gesamtkohorte, 10 weiblich, 5 männlich) identifiziert, die Träger mehr als einer potentiell pathogenen Variante sind (Tabelle A9-4, synonyme Varianten ausgeschlossen). Vier dieser 15 Patienten sind außerdem Träger einer pathogenen (Pat #10, Pat #373) oder intermediären (Pat #26, Pat #729) *C9orf72*-Repeatexpansion.

Ein komplexes Vererbungsmodell der ALS könnte aktuell diskutierten Hypothesen zufolge sowohl die oftmals beobachtete reduzierte Penetranz als auch die große inter- und sogar intrafamiliäre phänotypische Variabilität der Erkrankung erklären. Eine Arbeit von Cady und Kollegen (2015) beispielsweise zeigte, dass das Erkrankungsalter bei

Patienten, die Träger von mindestens zwei potentiell pathogenen Varianten waren, um zehn Jahre niedriger war im Vergleich zu Patienten mit lediglich einer Variante (Untersuchung von 17 ALS-Genen bei 391 Patienten; 3,8% der Patienten waren Träger von mindestens zwei potentiell pathogenen Varianten). Der auffällige Unterschied zwischen den Zahlen von Cady et al. (3,8%) und der hier diskutierten Untersuchung (18,8%) könnte damit begründet sein, dass Cady und Kollegen ausschließlich beschriebene ALS-Gene untersuchten, wohingegen in dieser Studie zusätzlich auch Kandidatengene und genetische Risikofaktoren sowie Modifikationen der ALS analysiert wurden.

Ein Vergleich des mittleren Erkrankungsalters von Patienten, bei denen keine Variante (57,8 Jahre), eine Variante (61,3 Jahre) oder mindestens zwei Varianten (65,0 Jahre) nachgewiesen werden konnten, zeigte anders als bei Cady und Kollegen eine spätere Manifestation der Symptomatik mit zunehmender Anzahl nachgewiesener Varianten, auch wenn diese Unterschiede statistisch nicht signifikant waren (Kruskal-Wallis Rank Sum Test). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Varianten einen vorteilhaften oder nachteiligen Effekt auf weitere gleichzeitig vorliegende Varianten oder Mutationen ausüben. Als Beispiel hierfür kann möglicherweise das *ITPR2*-Gen gelten. Im Rahmen dieser Studie konnten Varianten in *ITPR2* bei sieben Patienten gemeinsam mit mindestens einer weiteren Variante nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Patienten, die Träger einer beliebigen Kombination von Varianten waren, war das mittlere Erkrankungsalter von Patienten mit *ITPR2*-Varianten in Kombination mit anderen Varianten leicht erniedrigt (66,6 Jahre versus 64 Jahre). Obwohl diese Erniedrigung statistisch nicht signifikant war, könnte dies auf einen nachteiligen Effekt von zusätzlichen Varianten im *ITPR2*-Gen hinweisen.

C. Verknüpfung der ALS mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen

Eine aktuell viel diskutierte Hypothese besagt, dass neurodegenerative Erkrankungen weniger als jeweils eigenständige Entitäten anzusehen sind, sondern vielmehr in der variablen Manifestation übergeordneter Pathomechanismen resultieren, welche wiederum kennzeichnend für neurodegenerative Prozesse sind (Armstrong 2012, siehe

auch Kapitel 1.2). Um die beschriebene Kohorte einer Evaluation dieser Hypothese zu unterziehen, wurden parallel zu den 39 ALS-assoziierten Genen auch 238 zusätzliche Gene sequenziert, welche mit verwandten Krankheitsbildern wie beispielsweise der hereditären spastischen Spinalparalyse (HSP) oder der spinalen Muskelatrophie (SMA) aber auch anderen neurodegenerativen Erkrankungen verlinkt sind.

Dies führte zur Identifikation von 12 Patienten, die potentiell pathogene Veränderungen innerhalb dieser 238 Gene tragen und als mögliche Differentialdiagnosen betrachtet werden könnten (Tabelle A9-5).

Bei Pat #38 beispielsweise wurden zwei heterozygote Varianten im *GBE1*-Gen detektiert. Mutationen in *GBE1* können einem autosomal-rezessiven Erbgang folgend eine adulte Polyglukosankörper-Erkrankung (adult Polyglucosan body disease, APBD) verursachen, welche unter anderem durch Auffälligkeiten der oberen Motoneurone ähnlich zur ALS sowie kognitive Defizite und einen Glykogen-Branching-Enzym-Mangel gekennzeichnet ist (Klein 2013). Da der betroffene Patient im Rahmen der letzten klinischen Untersuchung (PD Dr. med. J. Prudlo, Rostock) deutliche Anzeichen einer Schädigung speziell der oberen Motoneurone sowie kognitive Beeinträchtigungen zeigte, könnte APBD unter der Voraussetzung, dass beide nachgewiesenen Varianten im compound-heterozygoten Zustand vorliegen differentialdiagnostisch möglicherweise in Frage kommen. Ob die Veränderungen beide Allele betreffen, konnte allerdings nicht untersucht werden, da im vorliegenden Fall weder eine Segregationsanalyse innerhalb der Familie noch eine PCR basierend auf mutationsspezifischen Primern möglich war.

Auffällig bei der Betrachtung der Gesamtkohorte dagegen war der Nachweis von heterozygoten Varianten im *SPG7*-Gen bei vier sporadisch erkrankten Patienten (Tabelle A9-5). Mutationen in *SPG7* können einem meist autosomal-rezessiven Erbgang folgend eine spastische Paraplegie vom Typ 7 verursachen, welche unter anderem durch eine Spastik und Schwäche der unteren Extremitäten sowie in einigen Fällen durch eine zusätzliche, sehr komplexe neurologische Symptomatik charakterisiert ist (Casari und Marconi 2010). Kürzlich wurde jedoch auch von einigen Patienten mit einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung im Zusammenhang mit heterozygoten *SPG7*-Mutationen berichtet (z.B. Sánchez-Ferrero et al. 2013). Aufgrund dessen

erscheint auch die differentialdiagnostische Abklärung einer *SPG7*-assoziierten Erkrankung sinnvoll. Bei den innerhalb dieser Kohorte detektierten Varianten handelt es um eine trunkierende Mutation sowie zwei missense-Mutationen, die in der Literatur bereits als nachteilig beschrieben wurden (Brugman et al. 2007; Bonn et al. 2010), sodass zumindest eine Mitursächlichkeit dieser Mutationen für den Phänotyp denkbar scheint. Obwohl weiterführende Studien zwingend nötig sind, um den tatsächlichen Effekt von Veränderungen im *SPG7*-Gen im Kontext von Motoneurerkrankungen zu definieren, wird deutlich, dass die Einbeziehung möglicher Differentialdiagnosen in der Routine-Diagnostik vorteilhaft sein kann.

Zusammenfassend konnte anhand einer umfassenden Panel-Sequenzierung gezeigt werden, dass die Amyotrophe Lateralsklerose innerhalb der untersuchten deutschen Kohorte eine große genetische Heterogenität aufweist, welche nicht ausschließlich auf ALS-assoziierte Gene limitiert ist, sondern sich auch auf Kandidatengene und genetische Modifikatoren oder Risikofaktoren erstreckt. Überraschend war dabei die niedrige Frequenz, mit der potentiell pathogene Varianten in den laut Literatur am häufigsten betroffenen Genen *SOD1* und *C9orf72* beobachtet werden konnten. Stattdessen konnte bei vier Patienten eine Variante im *GRN*-Gen nachgewiesen werden. Dies deutet in Übereinstimmung mit anderen Studien darauf hin, dass Mutationen in *GRN* auch in der Pathogenese reiner ALS-Erkrankungen relevant sein könnten.

In Anlehnung an eine aktuell diskutierte Hypothese wurden die Individuen der Kohorte hinsichtlich des gleichzeitigen Auftretens mehr als einer potentiell pathogenen Variante analysiert. Abweichend von in der Vergangenheit publizierten Kohorten-Studien konnte allerdings kein niedrigeres Erkrankungsalter bei Trägern mehr als einer Variante festgestellt werden. Dies schließt modifizierende Effekte, die auf das gleichzeitige Auftreten mehrerer Varianten zurückzuführen sein könnten, jedoch nicht aus.

Die parallele Sequenzierung von 238 Genen aus dem Kontext neurodegenerativer Erkrankungen lieferte außerdem Hinweise darauf, dass in einem substantiellen Anteil von Betroffenen potentiell pathogene Varianten in Genen, die mit verwandten Pathologien assoziiert sind, vorliegen könnten.

In der Zusammenschau verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die NGS-Technologie einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung und Erforschung der genetischen Heterogenität komplexer Erkrankungen leisten kann. Die Translation dieser Ergebnisse in die molekulargenetische Diagnostik zeigt außerdem, dass eine umfassende Panel-Diagnostik nach dem Ausschluss einer pathogenen Repeatexpansion im *C9orf72*-Gen nicht nur bei familiären Fällen, sondern im gleichen Maße auch bei sporadischen Erkrankungen angeboten werden sollte. Eine solche umfassende Diagnostik sollte außerdem relevante Differentialdiagnosen der ALS mit Schädigung der Motoneurone einschließen.

Damit kann das beschriebene Projekt als Beispiel dafür gelten, wie Ergebnisse aus der humangenetischen Forschung ganz unmittelbar zum Wohl des Patienten in die molekulargenetische Diagnostik implementiert werden können.

4.3 Identifikation eines Kandidatengens für Erkrankungen aus dem NBIA-Spektrum

4.3.1 Hintergrund

Unter dem Überbegriff Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn wird eine Gruppe von sehr seltenen komplexen Erkrankungen zusammengefasst, welche charakterisiert sind durch die Akkumulation von Eisen in den Basalganglien (Globus pallidus und/oder Substantia nigra). Das phänotypische Spektrum reicht dabei von Dystonie, zerebellärer Ataxie, Demenz und Spastik über Parkinsonismus bis hin zu neuropsychiatrischen Auffälligkeiten, optischer Atrophie und retinaler Degeneration bei variablem Erkrankungsalter (Gregory und Hayflick 2014). Aktuell sind zehn hereditäre Formen samt zugehörigem Gen beschrieben. Trotz der namensgebenden Auffälligkeiten im Eisenmetabolismus, sind allerdings nur zwei dieser Entitäten mit Veränderungen in Genen verknüpft, die direkt in den Eisenmetabolismus involviert sind (Neuroferritinopathie und Aceruloplasminämie, verknüpft mit Mutationen im *FTL*- beziehungsweise *CP*-Gen). Mehrheitlich fungieren die im Zusammenhang mit NBIA beschriebenen Gene im Lipidstoffwechsel und in den Mitochondrien (z.B. *PANK2*,

PLA2G6, *FA2H*) oder sind essentiell für lysosomale und autophagosomale Prozesse (z.B. *WDR45*, *ATP13A2*; Levi und Finazzi 2014, siehe auch Kapitel 1.2).

Obwohl die exakten Mechanismen des Eisenstoffwechsels im ZNS nur teilweise aufgeklärt sind, ist bekannt, dass eine Vielzahl an Proteinen an der Aufnahme von Eisen aus der systemischen Zirkulation über die Blut-Hirn-Schranke und die Verteilung innerhalb des ZNS beteiligt ist (Rouault 2013). Eine zentrale Rolle kommt dabei Ferroxidasen zu, welche die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} katalysieren und damit den Export von Eisen aus Zellen vermitteln (Zhao et al. 2015). Ein Funktionsverlust von Ferroxidasen resultiert folglich in einer zytotoxischen Akkumulation von Eisen innerhalb der Zellen. Zu den Ferroxidasen im ZNS gehören unter anderem Ceruloplasmin (*CP*) und Hephaestin (*HEPH*), die eine große Homologie von 50% auf Aminosäuren-Ebene aufweisen (Zhao et al. 2015).

Untersuchungen der sogenannten *sla*-Maus (sex-linked anemia), welche eine *in-frame* Deletion (194 Aminosäuren) im *Heph*-Gen aufweist, konnten zeigen, dass eine eingeschränkte Proteinfunktion bei den Tieren einerseits in einer systemischen Anämie sowie andererseits gleichzeitig in einer Akkumulation von Eisen in Oligodendrozyten, wo *Heph* exprimiert wird, resultiert (lokale Eisendefizienz versus lokale Eisenakkumulation). Im Alter von etwa sechs Monaten manifestierte sich die Eisen-Akkumulation bei der *sla*-Maus in motorischen Defiziten (Vulpe et al. 1999; Schulz et al. 2011). Jiang und Kollegen (2015) berichten von vergleichbaren Ergebnissen sowie der spezifischen Akkumulation von Eisen im Kortex, Hippocampus, Hirnstamm und Kleinhirn von *Heph*^{-/-}-Mäusen.

Die parallele Untersuchung von *Cp*^{-/-}-Mäusen zeigte eine Eisenakkumulation in Astrozyten, allerdings erst im Alter von etwa 18 Monaten sowie eine erhöhte Expression von *Heph*. Die Autoren schließen daraus, dass der Funktionsverlust von *Cp* zumindest zeitweise von *Heph* kompensiert werden kann (Jiang et al. 2015).

Da sowohl Oligodendrozyten als auch Astrozyten wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung von Neuronen wahrnehmen und die Akkumulation von Eisen letztlich neurodegenerative Prozesse anstößt, gelten *Heph*^{-/-}-Mäuse bei Jiang und Kollegen (2015) als vielversprechendes Modell für neurodegenerative Erkrankungen. Über die

Auswirkungen von Mutationen in *HEPH* beim Menschen ist bisher nichts bekannt (Jiang et al. 2015).

4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden mittels Exom-Sequenzierung wie in Kapitel 3.12 beschrieben bei einer Patientin mit Chorea, orofazialen Dyskinesien, Demenz, Dystonie, Dysarthrie und Dysphagie sowie psychiatrischen Auffälligkeiten und positiver Familienanamnese die Stopp-Mutation c.1429C>T; p.R477* sowie der Austausch c.1945G>A; p.A649T im *HEPH*-Gen (NM_138737.4) im jeweils heterozygoten Zustand nachgewiesen. Mittlerweile ist bekannt, dass es sich bei p.A649T (rs17216603) um einen Polymorphismus mit einer globalen Allelfrequenz von mehr als 2% handelt, der somit höchstwahrscheinlich als benigne einzustufen ist (ExAC Browser). Da es sich bei *HEPH* um ein X-chromosomales Gen handelt und der zugrundeliegende Vererbungsmodus bisher nicht geklärt ist, bleibt unklar, ob die nachgewiesene Stopp-Mutation p.R477* (het.) allein ursächlich für den Phänotyp einer weiblichen Patientin sein kann. Möglicherweise könnten in diesem Zusammenhang auch Imprinting-Effekte (X-Inaktivierung) relevant sein, auf die an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Mittels Sanger-Sequenzierung oder NGS von *HEPH* bei 38 weiteren Patienten (Tabelle 4; in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. A. Danek, Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München, Prof. Dr. med. L. Schöls, Neurologische Klinik und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Universität Tübingen, Biobank des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung, Universität Tübingen; siehe auch Kapitel 3.14) konnten zusätzliche Träger von verschiedenen potentiell pathogenen Varianten im *HEPH*-Gen identifiziert werden (unpublizierte Daten).

n Patienten	Phänotyp	Genetische Vorbefunde
5	Neuroakanthozytose	negativ
8	Choreoathetose	VPS13A negativ
12	Chorea	negativ
9	Neurodegenerative Erkrankung	negativ
4	NBIA	CP negativ

Tabelle 4: Anzahl an Patienten und deren Phänotyp sowie genetische Vorbefunde, die im Rahmen des beschriebenen Projekts bezüglich Varianten im *HEPH*-Gen gescreent wurden.

Um eine mögliche Relevanz von Hephaestin bezüglich Erkrankungen aus dem NBIA-Spektrum zu evaluieren, sollten >190 Patienten mit klinisch diagnostizierter Choreoathetose nach vorherigem Ausschluss von kausalen *VPS13A*-Mutationen mittels Western Blot (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. A. Danek, Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München) hinsichtlich potentiell pathogener Veränderungen im *HEPH*-Gen gescreent werden. Zu diesem Zweck wurde ein Amplikon-basierter NGS-Ansatz etabliert, um sowohl *HEPH* als auch 15 weitere Gene, die mit Differentialdiagnosen verknüpft sind, möglichst kostengünstig zu sequenzieren (siehe Kapitel 3.14). Abbildung 5 zeigt schematisch die hierfür etablierte Vorgehensweise.

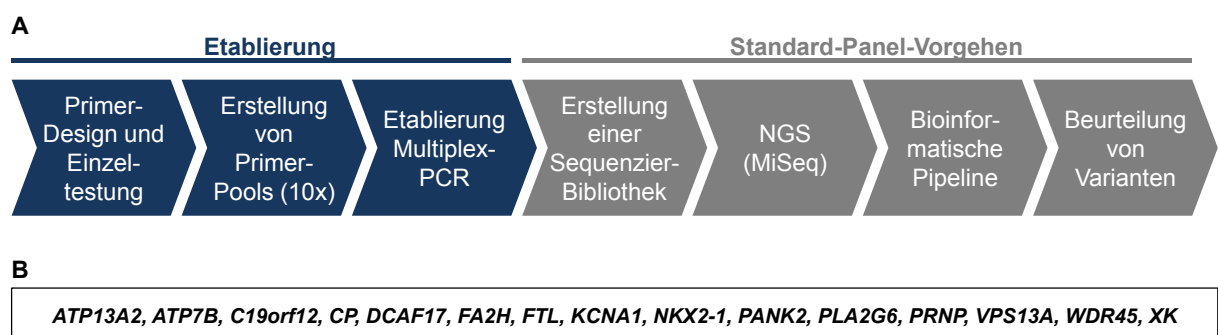


Abbildung 5: [A] Schematische Darstellung der neu etablierten (blau) und bereits etablierten (grau) Arbeitsschritte zur kostengünstigen Amplikon-basierten Sequenzierung einer Kohorte mittels NGS. [B] Liste derjenigen Gene, die im mutierten Zustand zur Ausprägung von Differentialdiagnosen führen können und innerhalb des beschriebenen Ansatzes als Ausschluss-Gene gelten.

Sollten anhand eines solchen Screenings weitere Träger von potentiell pathogenen Varianten in *HEPH* identifiziert werden können, wäre dies zusätzlich zu der kürzlich erschienenen Arbeit an *Heph*^{-/-}-Mäusen von Jiang und Kollegen (2015) ein weiteres Indiz für eine mögliche Relevanz von *HEPH* in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen mit Eisenakkumulation und die erste Beschreibung möglicherweise ursächlicher humaner Mutationen.

Dies könnte eventuell sogar eine mögliche Therapierelevanz darstellen, da an einem Experiment mit *Cp*- und *Heph*-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte, dass der Einsatz des Eisenchelators Deferipron (Ferriprox®) den Eisengehalt in untersuchten Hirnregionen mindern konnte (Zhao et al. 2015). Zusätzlich verspricht ein Wissenszuwachs im Bereich der verschiedenen Entitäten des NBIA-Spektrums und des Eisenmetabolismus im ZNS auch einen wichtigen Erkenntnisgewinn hinsichtlich anderer Erkrankungen wie Parkinson oder Demenz, da der Eisenmetabolismus auch hier eine zentrale Rolle spielt (White et al. 2015).

4.4 Evidenz für *CHCHD10* als ALS-Gen

4.4.1 Hintergrund

Sowohl anhand von Tiermodellen als auch über mittels iPSC gewonnene neuronale Zellen von Patienten konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Veränderungen der mitochondrialen Struktur, im Elektronentransport durch die mitochondrialen Komplexe I bis IV und im Import mitochondrialer Proteine an der Pathogenese der ALS beteiligt sind (Cozzolino et al. 2015). Da der daraus resultierende oxidative Stress, die Calcium-vermittelte Exzitotoxizität und ein Ungleichgewicht im zellulären Energiestoffwechsel bereits vor der Manifestation erster Symptome beobachtet werden können, scheint den Mitochondrien eine primäre Rolle in der Ätiologie der Erkrankung zuzukommen (Cozzolino et al. 2015). Ein weiteres Indiz für eine essentielle Rolle der Mitochondrien bei ALS ist außerdem die Tatsache, dass zahlreiche mit der Erkrankung assoziierte Gene wie beispielsweise *SOD1* und *VAPB* eng mit mitochondrialen Funktionen verknüpft sind (Cozzolino et al. 2015).

Bannwarth und Kollegen (2014) berichteten erstmals über eine Veränderung im *CHCHD10*-Gen, welches für ein mitochondriales Gen kodiert. Die Autoren beurteilten die nachgewiesene Veränderung p.S59L im heterozygoten Zustand als ursächlich in einer Familie mit einer spät manifestierenden Motoneuronerkrankung mit kognitiven Einbußen, zerebellärer Ataxie und Myopathie und konnten die gleiche Veränderung auch in einer zweiten unabhängigen betroffenen Familie nachweisen (Bannwarth et al. 2014). Anhand von Patienten-Fibroblasten konnten Bannwarth und Kollegen unter anderem zeigen, dass die Mutation eine Defizienz der Atmungskette, ultrastrukturelle Veränderungen der Mitochondrien und eine Beeinträchtigung des mitochondrialen Netzwerkes zur Folge hat. Damit zeigen die Autoren zum ersten Mal eine direkte Verknüpfung von Veränderungen in einem mitochondrialen Gen und einem Phänotyp des ALS-FTD Spektrums auf und untermauern damit die primäre Rolle von Mitochondrien in der Pathogenese der Erkrankung. Daraufhin wurden in der Literatur weitere ALS-Patienten als Träger von Varianten im *CHCHD10*-Gen identifiziert (z.B. Müller et al. 2014; Chaussenot et al. 2014; Johnson et al. 2014). Aktuell wird die tatsächliche Relevanz von mehreren publizierten Veränderungen im *CHCHD10*-Gen kontrovers diskutiert, vor allem da umfassende funktionelle Studien größtenteils noch ausstehen.

4.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Ein Beispiel für eine erfolgreiche genetische ALS-Diagnostik mittels Exom-Sequenzierung stellt eine durch Dr. med. Delia Kurzwelly (Neurologie, Universitätsklinik Bonn) betreute Familie dar, innerhalb derer acht Patienten an autosomal-dominant vererbter ALS erkrankt sind (Abbildung 6A). Bei allen acht Betroffenen manifestierte sich die Erkrankung ausschließlich in den oberen Extremitäten mit progressiver, meist schlaffer Parese, Muskelschwund und Faszikulationen in proximalen oder distalen Muskeln. Einige Familienmitglieder entwickelten zusätzlich bulbäre Symptome und ein spastisches Gangbild. Das Erkrankungsalter war mit 41 bis 73 Jahren (Mittelwert 59,5 Jahre) sehr variabel (Kurzwelly et al. 2015 [A3]).

4. Ergebnisse und Diskussion

Nachdem im ersten Schritt der molekulargenetischen Diagnostik eine pathologische Repeat-Expansion im *C9orf72*-Gen beim Indexpatienten (III.1) ausgeschlossen wurde, erfolgte basierend auf einer Exom-Sequenzierung eine schrittweise erweiterte Untersuchung wie in Abbildung 6B dargestellt (siehe auch Kapitel 3.7 und 3.12). Da im zweiten Schritt im Rahmen einer ALS-Panel Analyse (25 Gene) keine potentiell ursächliche Mutation beim Indexpatienten nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend eine Auswertung auf Exom-Ebene durchgeführt.

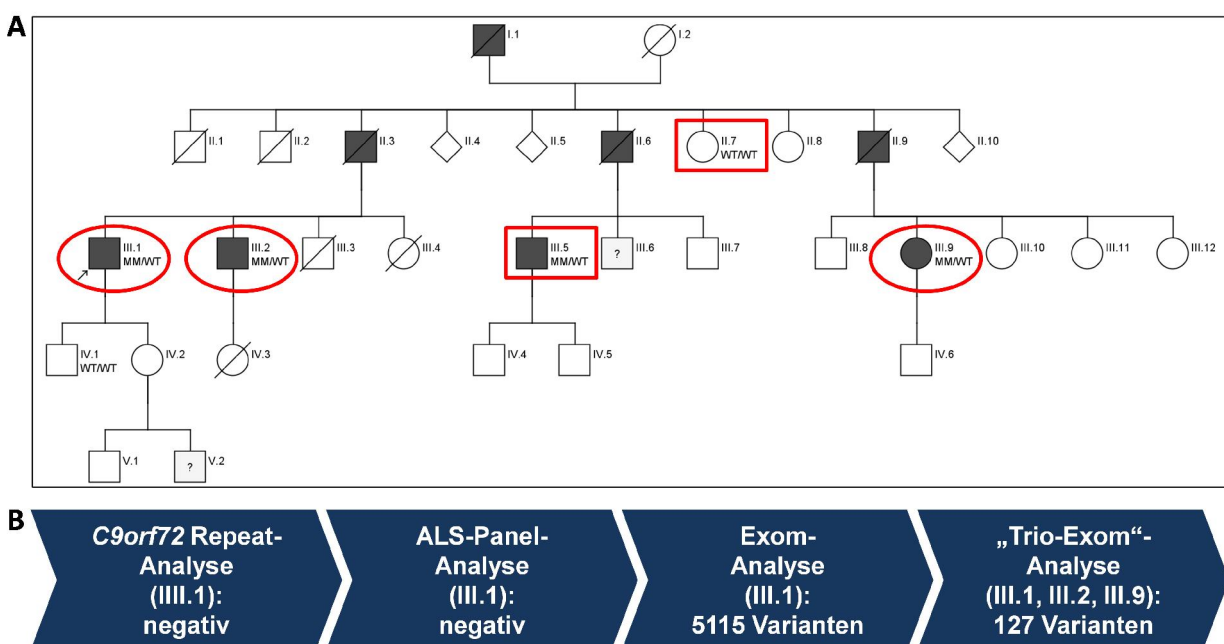


Abbildung 6: [A] Stammbaum der untersuchten Familie. Der Indexpatient (III.1) ist durch einen Pfeil markiert. Dunkle Symbole: Von der Erkrankung betroffen, weiße Symbole: nicht betroffen, Markierung durch Kreis: Exom-Sequenzierung, Markierung durch Rechteck: Sanger-Sequenzierung im Rahmen einer Segregationsanalyse. MM = missense Mutation, WT = Wildtyp. [B] Schematische Darstellung der angewandten Vorgehensweise zur Identifikation der nachgewiesenen Mutation in *CHCHD10*.

Nach der Filterung der durch die Exom-Sequenzierung erhaltenen Variantenliste entsprechend definierter diagnostischer Standards (MAF_{EA} ≤1,5%, kodierende Bereiche ±8 Basenpaare bzw. MAF_{EA} ≤5%, kodierende Bereiche ±30 Basenpaare bei beschriebenen Veränderungen; Allelfrequenz 0,1% für autosomal-dominant vererbte Gene bzw. 1% für autosomal-rezessiv vererbte Gene) lagen beim Indexpatienten mehr

als 5000 Varianten zur Beurteilung hinsichtlich einer möglichen Pathogenität vor. Dies verdeutlicht die bereits in Kapitel 1.5 benannten Herausforderungen, welche die Exom-Sequenzierung für diagnostische Zwecke mit sich bringt. Um die Anzahl der zu beurteilenden Varianten zu minimieren, wurde in einem dritten Schritt die Exom-Sequenzierung zweier weiterer Familienmitglieder (Abbildung 6A, III.2 und III.9) initiiert. Die bioinformatische Filterung nach gemeinsamen Varianten aller drei Betroffener (modifizierte Trio-Analyse) resultierte in einer deutlich verkürzten SNV-Liste von knapp 130 Veränderungen (Abbildung 6B, diagnostische Pipeline analog zu oben).

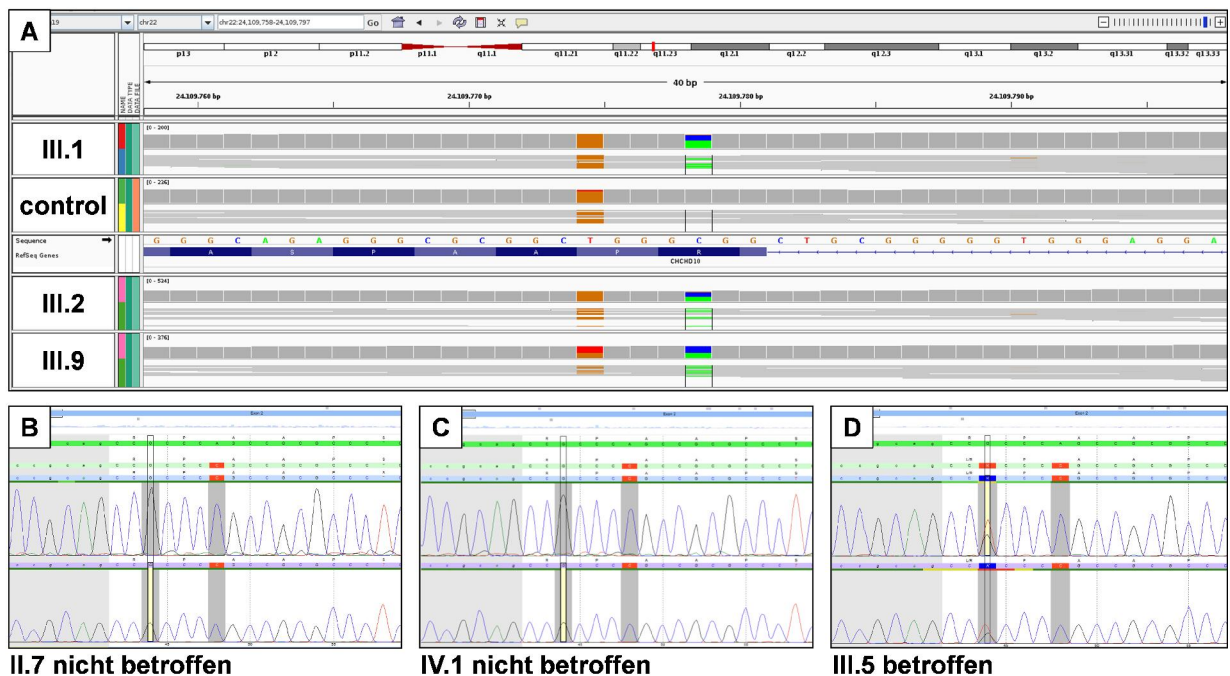


Abbildung 7: [A] Darstellung der heterozygoten Mutation c.44G>T; p.R15L im *CHCHD10*-Gen beim Indexpatienten (III.1) und zweier weiterer betroffener Familienmitglieder (III.2 und III.9) anhand der per Exom-Sequenzierung generierten Reads. [B] Eine per Sanger-Sequenzierung durchgeführte Segregationsanalyse zeigt, dass ein nicht betroffenes Familienmitglied (II.7) kein Träger der beim Indexpatienten nachgewiesenen heterozygoten Mutation in *CHCHD10* ist. [C] Im Rahmen einer prädiktiven Analyse per Sanger-Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass ein nicht betroffenes Familienmitglied kein Träger der beschriebenen *CHCHD10*-Mutation ist. [D] Anhand einer weiteren Segregationsanalyse konnte nachgewiesen werden, dass ein gleichermaßen betroffenes Familienmitglied ebenfalls Träger der Mutation p.R15L (het.) im *CHCHD10*-Gen ist. Die Kontrolle setzt sich aus 50 zufällig ausgewählten Individuen zusammen.

So konnte schließlich die Veränderung c.44G>T; p.R15L (het.) in Exon 2 des *CHCHD10*-Gens (NM_213720.1, rs730880030) identifiziert werden, die aufgrund aktueller Publikationen als höchstwahrscheinlich kausal eingestuft wurde (Abbildung 7A). Eine anschließende Segregationsanalyse ergab, dass ein weiteres, gleichermaßen betroffenes Familienmitglied (Abbildung 6A, III.5) ebenfalls heterozygoter Träger der Variante ist, wohingegen bei einem gesunden Familienmitglied (Abbildung 6A, II.7) kein Austausch an der beschriebenen Position nachgewiesen werden konnte (Abbildung 7B-D). Parallel zu dieser Untersuchung wurde *CHCHD10* p.R15L (het.) von Müller und Kollegen (2014) als höchstwahrscheinlich ursächlich in zwei von ALS betroffenen deutschen Familien beschrieben. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind Patienten aus drei US-amerikanischen und drei deutschen Familien mit autosomal-dominant vererbter ALS als Träger von p.R15L (het.) im *CHCHD10*-Gen beschrieben worden (Johnson et al. 2014; Müller et al. 2014; Kurzwelly et al. 2015 [A3]). Während Müller und Kollegen (2014) von einer symptomfreien Überträgerin von p.R15L in *CHCHD10* berichten, wurde in der hier beschriebenen Familie eine vollständige Penetranz beobachtet (Kurzwelly et al. 2015 [A3]). Das *CHCHD10*-Gen kodiert für ein mitochondriales Protein aus der Familie der sogenannten „coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing“ Proteine, welches in den Cristae Junctions im intermembranösen Zwischenraum innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist. CHCHD10 nimmt dort Funktionen in der Aufrechterhaltung der Morphologie von Cristae sowie in der oxidativen Phosphorylierung wahr (Bannwarth et al. 2014). Die innerhalb der hier vorgestellten Familie nachgewiesene Variante betrifft eine bei Säugern zwar nur mäßig konservierte Aminosäure, befindet sich laut Müller und Kollegen (2014) allerdings in einer potentiellen N-terminalen mitochondrialen Zielsequenz und könnte somit den korrekten Import von CHCHD10 in Mitochondrien beeinflussen (Cozzolino et al. 2015). Dies impliziert erstmals eine direkte Ursächlichkeit von Mutationen in einem Gen, welches für ein mitochondriales Protein kodiert und kann als weiteres Indiz dafür gelten, dass Mitochondrien eine primäre Rolle in der Initiierung neurodegenerativer Prozesse spielen (Müller et al. 2014; Cozzolino et al. 2015). Auch die Tatsache, dass beispielsweise mit *SOD1*, *VAPB* und *OPTN* bereits weitere Proteine, die mit Mitochondrien interagieren, als relevant bei ALS beschrieben wurden, bekräftigt diese Hypothese (Cozzolino et al. 2015). Folglich könnte sich die Suche nach neuen

Kandidatengenen für ALS aber auch für andere neurodegenerative Erkrankungen zukünftig vermehrt auf Gene fokussieren, die in die Funktion und Struktur von Mitochondrien involviert sind oder für mitochondriale Proteine kodieren. Die Beschreibung der hier vorgestellten Familie erbringt somit nicht nur weitere Evidenz hinsichtlich der Relevanz des *CHCHD10*-Gens, sondern trägt auch ganz direkt zum tieferen Verständnis grundlegender Pathomechanismen der ALS bei.

Dies hat gleichzeitig auch Konsequenzen für die molekulargenetische Diagnostik: Da alle bisher beschriebenen Veränderungen im *CHCHD10*-Gen in Exon 2 liegen, empfiehlt sich bei ALS-Patienten mit Erstmanifestation in den oberen Extremitäten und einer Schädigung primär der unteren Motoneurone mit Spastik und bulbären Zeichen bei langsamer Progression im Vorfeld einer umfassenden Panel-Diagnostik zunächst die Sequenzierung dieses Hotspots mittels klassischer Sanger-Sequenzierung.

4.5 Exom-Sequenzierung zur Identifikation von Kandidatengenen für Dystonie

4.5.1 Hintergrund

Unter dem Begriff Dystonie wird eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammengefasst, welche allesamt gekennzeichnet sind durch anhaltende oder intermittierende Muskelkontrakturen, die in unwillkürlichen Körperhaltungen oder repetitiven Bewegungsmustern resultieren. Dystone Bewegungen sind dabei oft drehend beziehungsweise schraubend und werden ausgelöst oder verstärkt durch Willkürbewegungen und der damit verbundenen Muskelaktivierung (Albanese et al. 2013). Die klinische Klassifizierung der Dystonie erfolgt anhand des Erkrankungsalters, der betroffenen Körperregionen sowie zusätzlicher Faktoren wie beispielsweise anhand des Auftretens weiterer neurologischer Auffälligkeiten oder Bewegungsstörungen (isolierte versus kombinierte Dystonie, Klein et al. 2014). Neben externen Faktoren wie beispielsweise Intoxikationen, Infektionen, metabolischen Erkrankungen oder Schädel-Hirn-Traumata spielen vor allem genetische Veränderungen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung. So wurden innerhalb der letzten Jahre Mutationen in 18 Genen als ursächlich für Dystonie beschrieben. Des Weiteren wurden einige

genetische Loci sowie zahlreiche Gene im Zusammenhang mit komplexen Erkrankungen, bei denen Dystonie nur ein Symptom unter anderen darstellt, mit der Erkrankung assoziiert (Klein et al. 2014). Genetische Faktoren umfassen dabei das ganze Spektrum von Suszeptibilitätsfaktoren mit kleiner Effektgröße bis hin zu kausalen Veränderungen mit reduzierter oder voller Penetranz (Lohmann und Klein 2013). Diese können entweder autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv aber auch X-chromosomal vererbt werden.

Einblicke in die genetischen Ursachen der Dystonie haben die Grundlage für die Aufklärung und das Verständnis involvierter Signalwege und damit für die Pathogenese der Erkrankung gelegt, zumal Dystonie-Patienten keine gesicherten histopathologischen Auffälligkeiten zeigen wie dies bei neurodegenerativen Erkrankungen, die mit dem Verlust von Neuronen einhergehen, der Fall ist (Dauer 2014). So beeinträchtigen beispielsweise Mutationen in *GCH1*, *SPR*, *TH* und *GNAL* die Biosynthese und Signalwirkung von Dopamin, Veränderungen in *TUBB4*, *SGCE* und *TOR1A* wirken auf die Dynamik des Zytoskeletts, Mutationen in *THAP1*, *CIZ1* und *TAF1* stören Prozesse der Transkriptionsregulation sowie der Zellzykluskontrolle und Veränderungen in *ATP1A3* und *ANO3* beeinflussen die Wirkweise von Ionenkanälen, für die sie kodieren (Lohmann und Klein 2013).

Seit der erstmaligen Beschreibung von Mutationen in *GCH1* als ursächlich für die Dopa-responsive Dystonie im Jahr 1994 und der darauffolgenden Identifikation weiterer kausaler Gene hat vor allem die Einführung der NGS-Technologie maßgeblich zur Entschlüsselung der genetischen Ursachen der Dystonie beigetragen (Klein 2014). Mit Hilfe der Exom-Sequenzierung in zwei Familien mit primärer Torsionsdystonie gelang es Fuchs und Kollegen (2012) über den Nachweis einer nonsense- und einer missense-Mutation das *GNAL*-Gen als relevant in der Ätiologie der Dystonie zu identifizieren. Ein nachfolgendes Screening in 39 weiteren betroffenen Familien führte zur Detektion von sechs weiteren potentiell pathogenen Veränderungen in *GNAL*. Auch die Beschreibung von ursächlichen Varianten in *CIZ1*, *ANO3* und *TUBB4A* wurde durch eine Kombination aus einer Kopplungsanalyse und Exom-Sequenzierung ermöglicht (Xiao et al. 2012; Charlesworth et al. 2012; Hersheson et al. 2013). Nachdem solche Beispiele für die Implementation der Exom-Diagnostik argumentierten, stieg die Zahl an Publikationen,

die bisher unbekannte Gene mit Dystonie assoziierten weiter deutlich an. Festzuhalten ist jedoch auch, dass die Ergebnisse dieser Studien nachfolgenden Evaluierungen vor allem mittels funktioneller Analysen werden standhalten müssen.

Die Herausforderungen, die es im Rahmen der Identifikation neuer Dystonie-Gene zu überwinden gilt, beinhalten zum einen die Beurteilung detektierter Varianten vor dem Hintergrund einer beobachteten reduzierten Penetranz bereits bestätigter Dystonie-Gene (z.B. Reduktion der Penetranz auf bis zu 30% bei Mutationen in *TOR1A*, Lohmann und Klein 2013). Zum anderen treten dystone Bewegungsstörungen auch im Kontext komplexer Phänotypen auf (z.B. aus dem Spektrum der NBIA-Erkrankungen, siehe auch Ganos et al. 2013 [A1]; Ganos et al. 2014 [A2]) oder stellen lediglich die Erstmanifestation anderer zugrundeliegender Erkrankungen dar (z.B. Dystonie als Erstmanifestation einer *PARK2*-vermittelten Parkinson-Erkrankung bei 42% der Betroffenen, Brüggemann und Klein 2013), wodurch die klinische Charakterisierung erschwert wird.

4.5.2 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Projekt mit dem Ziel der Identifikation neuer Kandidatengene für Dystonie initiiert. Hierfür wurden Indexpatienten aus sieben türkischen, teils konsanguinen Familien, die zuvor durch Frau Dr. med. E. Lohmann (Abteilung für Neurodegenerative Erkrankungen, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Universität Tübingen und Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Standort Tübingen; Abteilung für Neurologie, Verhaltensneurologie und Bewegungsstörungen, Medizinische Fakultät der Universität Istanbul) rekrutiert und klinisch charakterisiert wurden, mittels Exom-Sequenzierung analysiert. Abbildung 8 zeigt schematisch die Abfolge der durchgeführten Analyseschritte (vergleiche auch Kapitel 3.11 und 3.12).

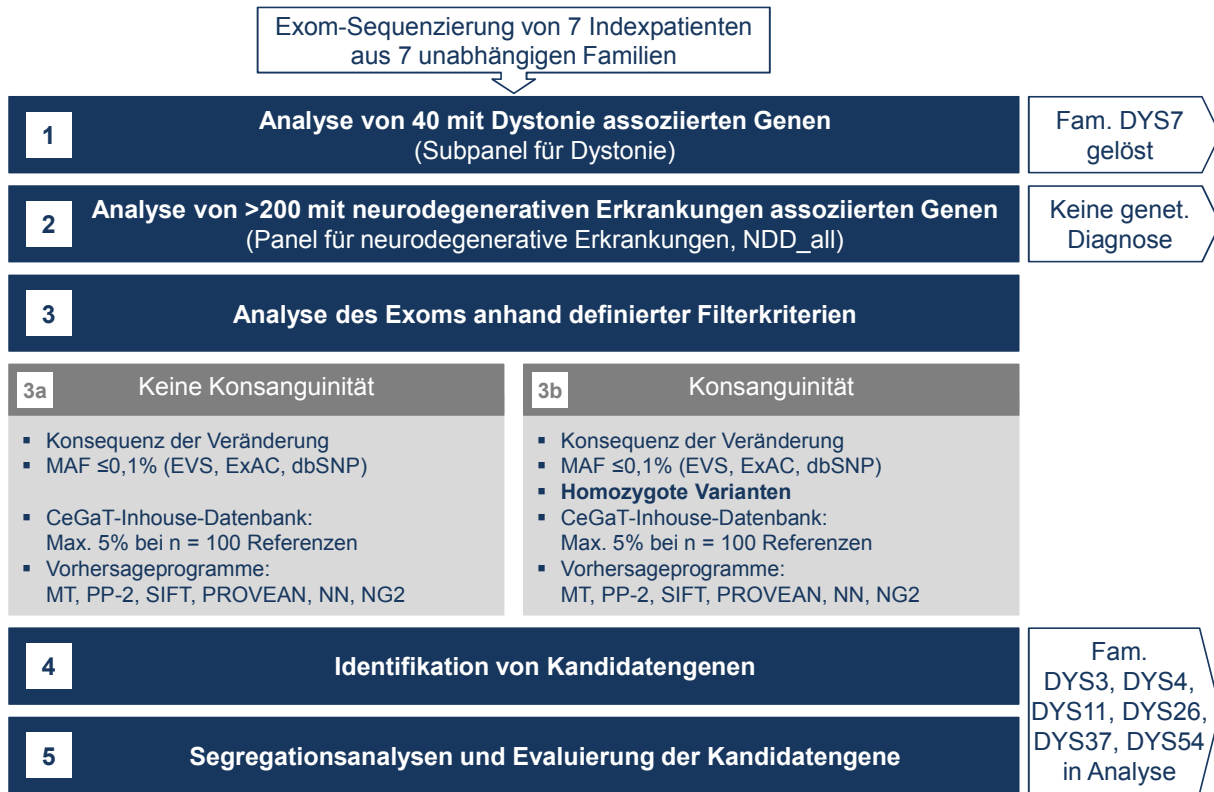


Abbildung 8: Schematische Darstellung der schrittweisen Erweiterung der Analyse mit dem Ziel der Identifikation von neuen Kandidatengenen für Dystonie. Im Fall der Familie DYS7 konnten innerhalb des Subpanels für Dystonie zwei ursächliche Mutationen im *ATM*-Gen nachgewiesen werden, weshalb der entsprechende Indexpatient keiner erweiterten Analyse unterzogen wurde. Im zweiten Schritt der Analyse basierend auf dem Groß-Panel-Ansatz konnte keine eindeutige genetische Diagnose gestellt werden.

Familie DYS7

Im Fall der Familie DYS7 (Abbildung 9) konnten durch die Überprüfung der Dystonie-Gene die Mutationen c.1279delA; p.G301VfsX19 in Exon 7 und c.8147T>C; p.V2716A (rs587782652) in Exon 55 des *ATM*-Gens (NM_000051.3) im jeweils heterozygoten Zustand nachgewiesen werden (Abbildung 10, Lohmann et al. 2015 [A4]).

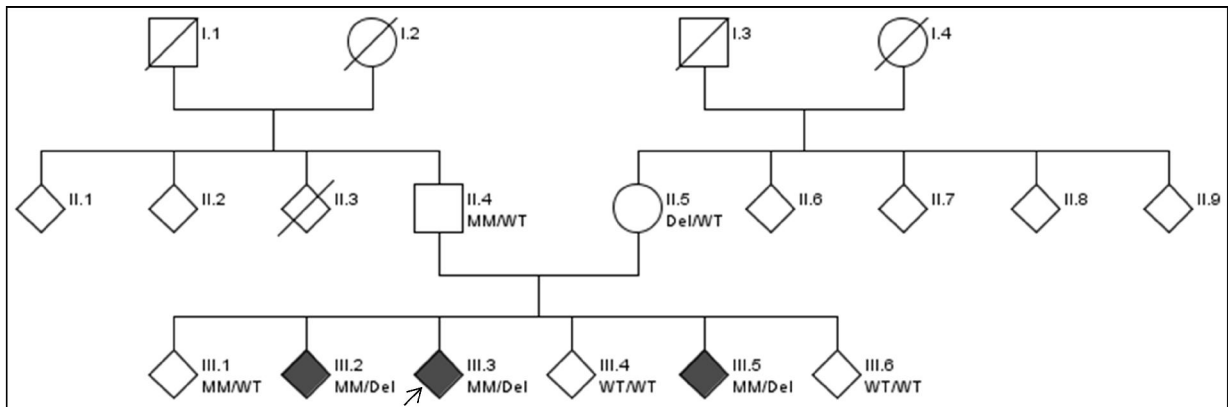


Abbildung 9: Stammbaum der Familie DYS7. Der Indexpatient (III.3) ist durch einen Pfeil markiert. Dunkle Symbole: Von der Erkrankung betroffen, helle Symbole: nicht betroffen. MM = missense Mutation, Del = Deletion, WT = Wildtyp.

Die Mutation p.G301VfsX19 führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit zu einem frühzeitigen Stopp-Codon in Exon 8. Die zweite Mutation p.V2716A befindet sich innerhalb des ATP-Bindungsmotivs und beeinflusst so die Kinaseaktivität des ATM-Proteins. Da letztere Mutation in der Literatur bereits bei Patienten mit Ataxia-Teleangiectasia (AT) beschrieben wurde, können beide Veränderungen als höchstwahrscheinlich pathogen und damit ursächlich eingestuft werden (Keimling et al. 2011; Scott et al. 2002). Dies wurde auch durch die in der Familie durchgeführte Segregationsanalyse unterstützt, die außerdem das Vorliegen beider Mutationen im compound-heterozygoten Zustand nachweisen konnte (Abbildung 9).

Mutationen in *ATM* können einem autosomal-rezessiven Erbgang folgend Ataxia-Teleangiectasia verursachen, welche neben einer zerebellären Ataxie und typischen Hautveränderungen vor allem durch eine schwere Immunschwäche, eine verwaschene Sprache und eine abnorme Okulomotorik sowie Choreoathetose gekennzeichnet ist. Zudem geht die Erkrankung aufgrund der Funktion des ATM-Proteins in der Reparatur von DNA-Schäden auch mit einem erhöhten Tumorrisiko einher (Gatti 2010).

4. Ergebnisse und Diskussion

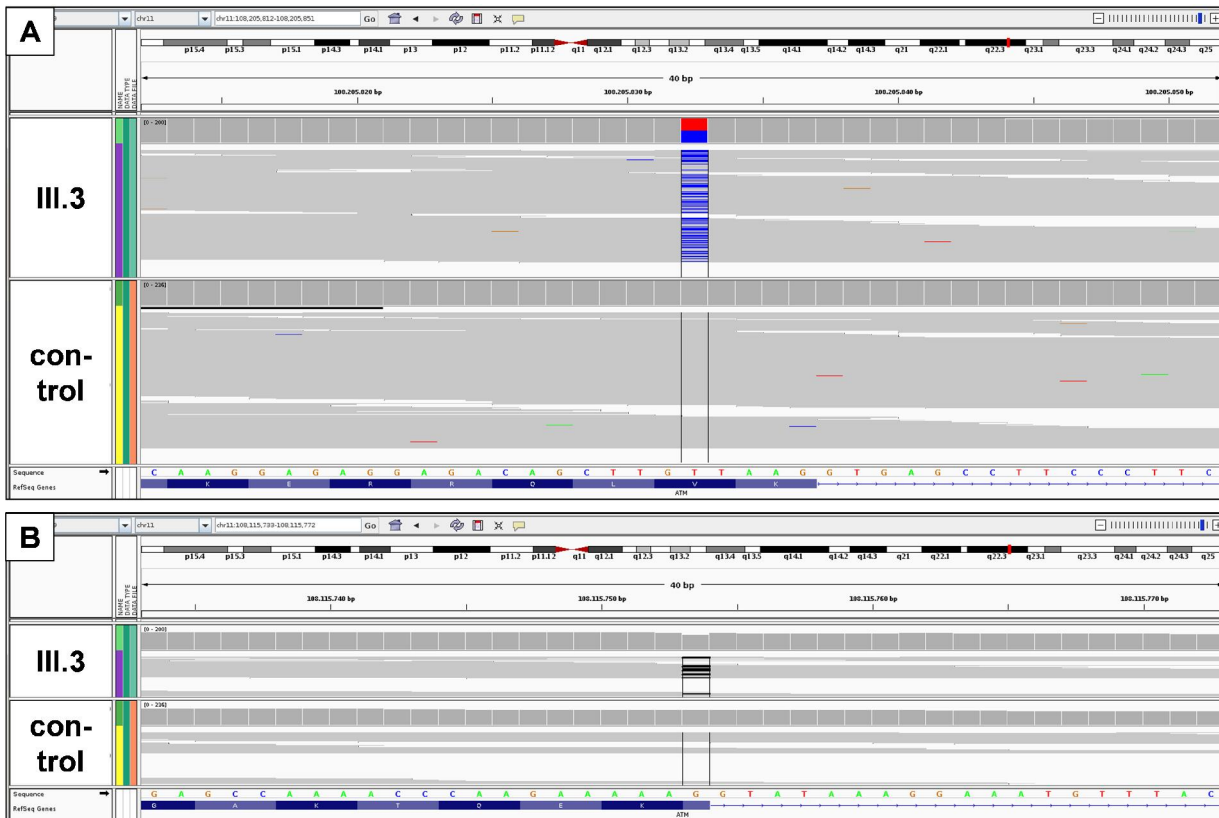


Abbildung 10: Darstellung der beim Indexpatienten der Familie DYS7 nachgewiesenen Veränderungen im *ATM*-Gen basierend auf der Exom-Sequenzierung. Oben: c.8147T>C; p.V2716A (heterozygot) in Exon 55, unten: c.1279delA; p.G301VfsX19 (heterozygot) in Exon 7.

Bereits in der Vergangenheit wurde beispielsweise durch Kuhn und Kollegen (2015) oder Charlesworth und Kollegen (2013) von atypischen Formen der AT berichtet, die sich ausschließlich in einer dystonen Bewegungsstörung manifestierten. Der Phänotyp der drei Betroffenen innerhalb der hier beschriebenen Familie erstreckt sich von einer reinen zervikalen Dystonie und zusätzlichem Handtremor bis hin zu einer generalisierten Dystonie. Das α -Fetoprotein, ein diagnostischer Marker für AT war jeweils erhöht (Lohmann et al. 2015 [A4]). Der beschriebene Fall zeigt auf eindrückliche Art, dass die klinische Manifestation von *ATM*-Mutationen eine große inter- und auch intrafamiliäre phänotypische Variabilität aufweisen kann. Zumindest die interfamiliäre Variabilität könnte einer Studie von Verhagen und Kollegen (2012) zufolge im Ausmaß der Beeinträchtigung der Kinaseaktivität begründet sein, die wiederum in Abhängigkeit zum Mutationstyp steht. Im beschriebenen Fall beispielsweise könnte die nachgewiesene

trunkierende Mutation zu einem nicht-funktionalen Protein führen, wohingegen die identifizierte missense-Mutation lediglich einen einschränkenden Einfluss auf die Proteinfunktion ausüben könnte. Die Frage, wie eine mögliche Dominanz eines Allels gegenüber dem anderen zustande kommt und damit den Phänotyp definiert, könnte einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Forschungen darstellen. In Bezug auf die beobachtete intrafamiliäre Variabilität lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulieren, da das Wissen über genetische Risikofaktoren oder Modifikatoren für Dystonie aktuell noch limitiert ist (Brüggemann und Klein 2013). Möglicherweise liegt in der Identifikation solcher genetischer Risikofaktoren oder Modulatoren der Schlüssel zum Verständnis der großen phänotypischen Variabilität und der reduzierten Penetranz einiger erblicher Formen der Dystonie.

Zusammenfassend stellt dieser Fall somit ein Beispiel dafür dar, wie mit Hilfe der gleichzeitigen Untersuchung von Genen, welche mit Differentialdiagnosen assoziiert sind, eine genetische Ursache der vorliegenden Erkrankung identifiziert werden kann.

Bei den sechs weiterhin untersuchten Familien konnten jeweils keine potentiell pathogenen Varianten innerhalb der mit Dystonie assoziierten Gene (Dystonie-Panel) nachgewiesen werden (Abbildung 8).

Familie DYS11

Bei der Indexpatientin der konsanguinen Familie DYS11, die im Alter von einem Jahr an einer Dopa-responsiven Dystonie erkrankte, konnte die homozygote missense-Variante c.242A>G; p.D81G in Exon 4 des *DNAJC6*-Gens (NM_014787.3) identifiziert werden, die innerhalb der konservierten N-terminalen PTEN-ähnlichen Domäne des Proteins liegt und damit essentiell für dessen Funktion ist (nicht abgebildet). Es handelt sich um ein neuronales Protein, dessen Funktion in der Clathrin-vermittelten Endozytose liegt (Yim et al. 2010). In einer Arbeit von Yim und Kollegen (2010) konnte unter anderem gezeigt werden, *Dnajc6*^{-/-}-Mäuse eine Beeinträchtigung im Recycling synaptischer Vesikel und in der Clathrin-vermittelten Endozytose von synaptischen Vesikeln aufweisen. Edvardson und Kollegen (2012) dagegen konnten keine Auffälligkeiten in der Substantia nigra oder dem Dopamin-Stoffwechsel bei Knockout-Mäusen feststellen.

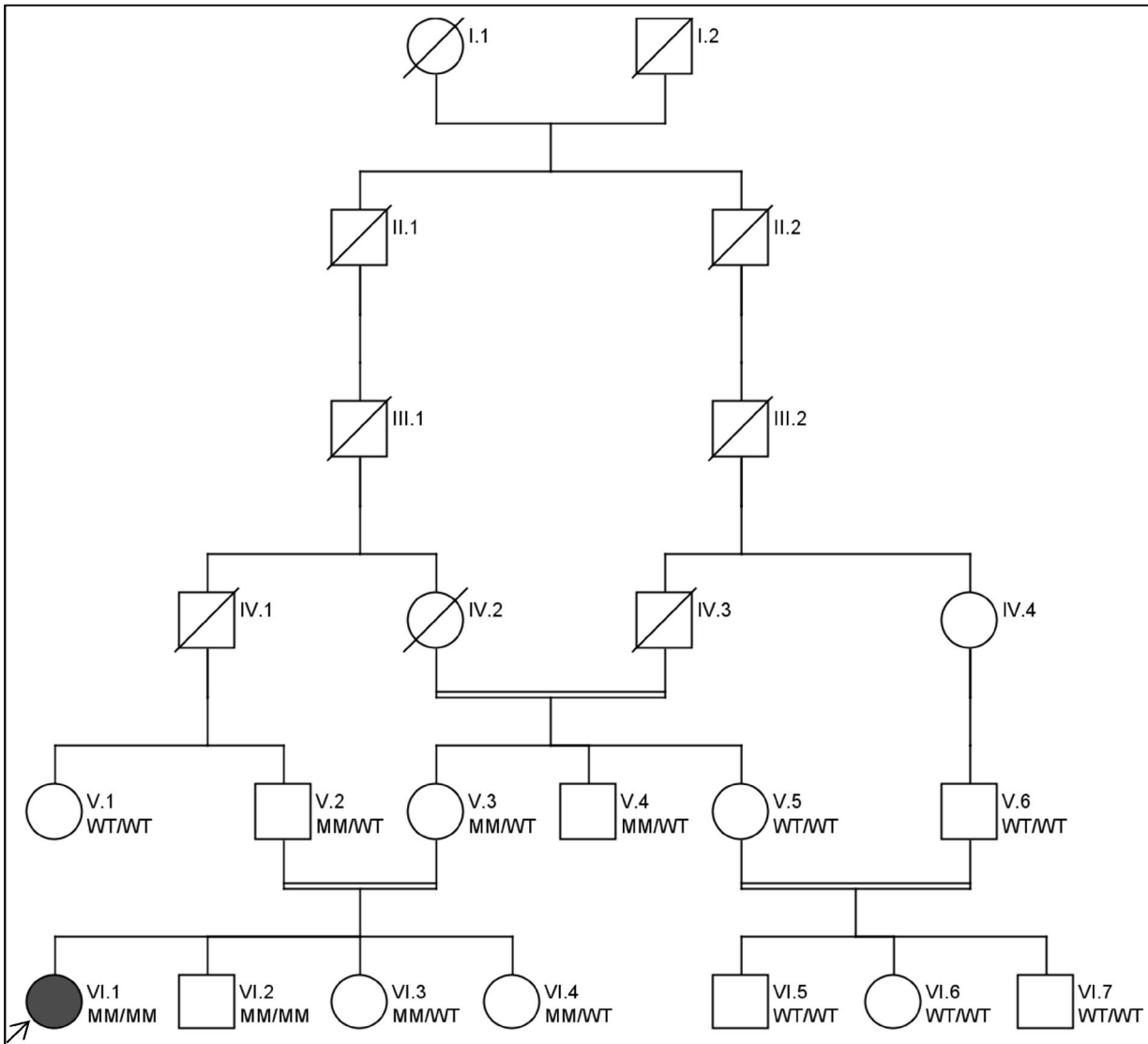


Abbildung 11: Stammbaum der Familie DYS11. Der Indexpatient (VI.1) ist durch einen Pfeil markiert. Dunkles Symbol: Von der Erkrankung betroffen, helle Symbole: nicht betroffen. MM = missense Mutation, WT = Wildtyp.

Die Autoren beurteilen dies als in Übereinstimmung mit dem Fehlen von Gang- oder Bewegungsstörungen in den untersuchten Mäusen.

Mutationen in *DNAJC6* können beim Menschen einem autosomal-rezessiven Erbgang folgend eine juvenile Parkinson-Erkrankung von Typ 19 verursachen, die neben der typischen Parkinson-Symptomatik unter anderem charakterisiert ist durch pyramidale

Auffälligkeiten, Störungen der Okulomotorik, psychiatrische Symptome sowie eingeschränkte kognitive Fähigkeiten (Edvardson et al. 2012; Köroğlu et al. 2013).

Köroğlu und Kollegen (2012) beschreiben die homozygote Mutation p.Q734* im *DNAJC6*-Gen als kausal in einer Familie mit vier von leichter mentaler Retardierung, Haltungsinstabilität, Tremor, Bradykinesie, Rigidität, Krampfanfällen und mittelgradiger Dystonie betroffenen Mitgliedern. Träger einer Spleiß-Variante in *DNAJC6* aus einer anderen beschriebenen Familie zeigten dagegen keine Anzeichen einer dystonen Bewegungsstörung (Edvardson et al. 2012). Die Häufigkeit der in der hier untersuchten Familie nachgewiesenen Variante in der Allgemeinbevölkerung ist nicht bekannt, da p.D81G in den Online-Datenbanken ExAC, EVS und 1000 Genomes nicht aufgeführt wird (Zugriff am 14.10.2015) und die Sanger-Sequenzierung einer türkischen Kontrollkohorte (n = 192, durchgeführt durch eine Mitarbeiterin des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung, AG Prof. Gasser, Tübingen) nicht zum Nachweis weiterer Träger von p.D81G führte. Die Vorhersage-Programme MutationTaster, PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN stufen die Variante einheitlich als pathogen ein (Zugriff am 14.10.2015).

Da die Indexpatientin neben einer Dopa-responsiven Dystonie mit einem Erkrankungsalter von einem Jahr keine Parkinson-Symptomatik zeigt und eine durchgeführte Segregationsanalyse zur Identifikation eines nicht betroffenen homozygoten Trägers der beschriebenen Veränderung (Abbildung 11, VI.2) führte, bleibt die Pathogenität der nachgewiesenen *DNAJC6*-Variante unklar (Abbildung 11). Möglicherweise könnte dies in einer reduzierten Penetranz von Mutationen im *DNAJC6*-Gen begründet liegen, wenngleich Informationen über einen derartigen Effekt in der Literatur bisher nicht vorliegen. Alternativ könnte sich die nachgewiesene Variante lediglich modulierend auf den Phänotyp der Indexpatienten auswirken. Folglich konnte anhand der Exom-Sequenzierung keine eindeutige genetische Ursache für die Erkrankung der Indexpatientin nachgewiesen werden.

Familie DYS54

Beim Indexpatienten (Abbildung 12, IV.1) der Familie DYS54 (Abbildung 12), der von einer langsam progredienten segmentalen Dystonie betroffen ist, konnte keine potentiell

pathogene Veränderung in einem der mit Dystonie assoziierten Gene oder in einem der Gene, die mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben sind, nachgewiesen werden.

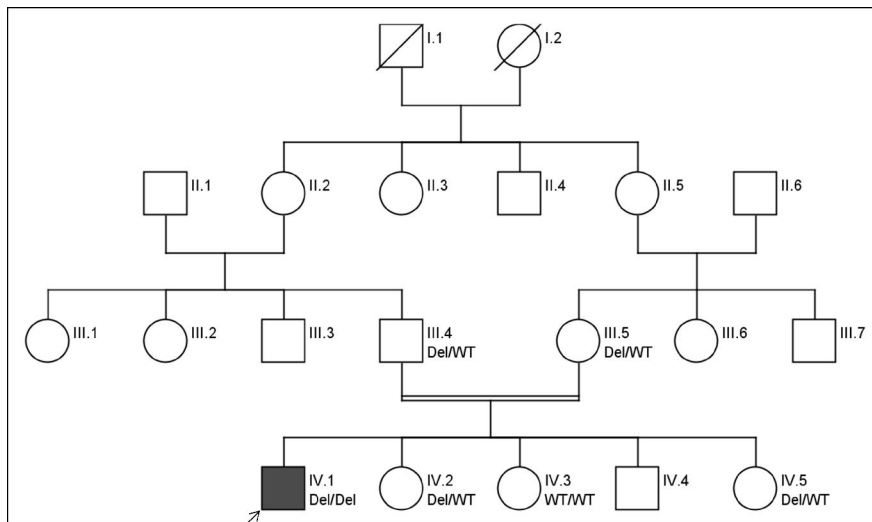


Abbildung 12: Stammbaum der Familie DYS54. Der Indexpatient ist durch einen Pfeil markiert. Graues Symbol: Von der Erkrankung betroffen, helle Symbole: nicht betroffen. Del = Deletion, WT = Wildtyp.

Daraufhin wurde die Analyse auf das komplette Exom ausgeweitet (siehe Abbildung 8 und Kapitel 3.12) und die 15bp Deletion c.1644_1658delGCTGCAGAAGGAGCG; p.Q550_L554del (rs372335775, MAF_EA <0,01%) im *INPP4A*-Gen (NM_001134224.1) im homozygoten Zustand identifiziert (Abbildung 13). Eine durchgeführte Segregationsanalyse ergab, dass sowohl die gesunden Eltern als auch gesunde Geschwister des Indexpatienten die Deletion lediglich im heterozygoten Zustand oder zwei Wildtyp-Allele tragen. Das *INPP4A*-Gen kodiert für das Protein Typ1 Inositol-3,4-bisphosphate 4-Phosphatase, welchem unter anderem eine Rolle in der Signaltransduktion zukommt. *INPP4A* reguliert die Lokalisation synaptischer NMDA-Rezeptoren und damit den NMDA-Rezeptor-abhängigen exzitatorischen post-synaptischen Strom. Auf diese Weise schützt *INPP4A* Neurone vor dem exzitatorisch bedingten Zelltod (Sasaki et al. 2010). Um die physiologische Funktion von *Inpp4a* zu untersuchen, generierten Sasaki und Kollegen (2010) *Inpp4a*^{-/-}-Mäuse und berichteten,

dass die Tiere im Alter von 2 Wochen schwerwiegende unwillkürliche Bewegungen zeigten, die mit menschlichen Bewegungsstörungen wie der Huntington-Erkrankung oder Dystonie vergleichbar waren. Histopathologisch konnten die Autoren Läsionen im Striatum der *Inpp4a*^{-/-}-Mäuse nachweisen, welche sie mit den beobachteten motorischen Defiziten in Verbindung brachten. Sasaki und Kollegen (2015) schlussfolgerten, dass *Inpp4a* über die Herabregulierung von NMDA-Rezeptoren und damit der zellulären Sensitivität gegenüber Glutamat die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität unterdrückt.

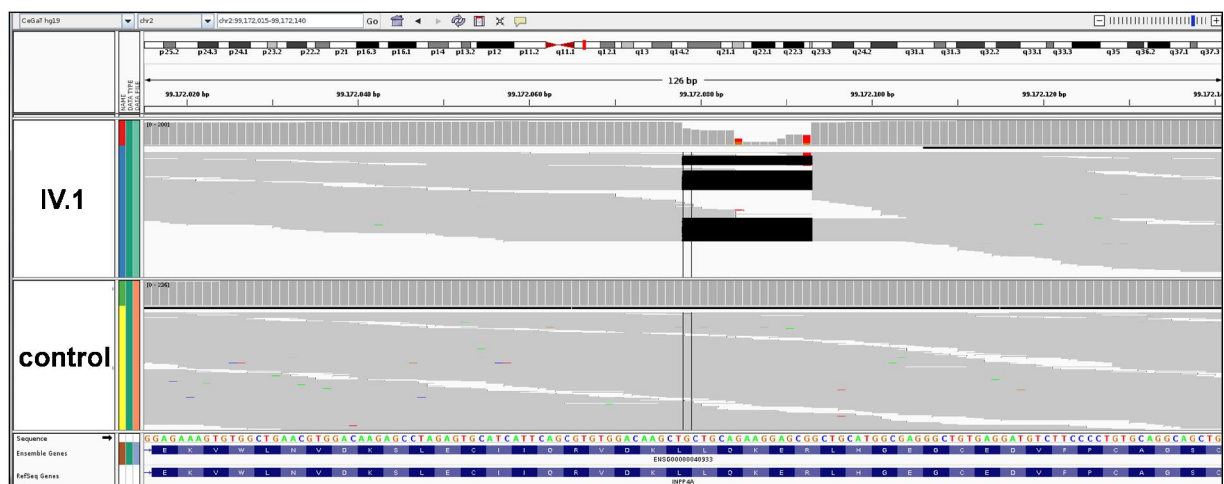


Abbildung 13: Darstellung der beim Indexpatienten der Familie DYS54 nachgewiesenen homozygoten Deletion im *INPP4A*-Gen.

Inwieweit sich die beim Indexpatienten der Familie DYS54 nachgewiesene Deletion tatsächlich auf die Proteinfunktion auswirkt, kann aktuell nicht beurteilt werden. Sollte die Proteinfunktion tatsächlich beeinträchtigt sein, könnte die Variante möglicherweise relevant für den Phänotyp des Patienten sein und als Kandidatengen für Dystonie gelten. Zukünftige funktionelle Studien und Kohortenscreenings zur Identifikation möglicher weiterer Mutationsträger könnten darüber Aufschluss geben.

Familien DYS3, DYS4, DYS11, DYS26 und DYS37

In den verbleibenden vier beziehungsweise fünf Familien (inklusive DYS11) konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine weiteren eindeutigen Kandidatengene für Dystonie

identifiziert werden. Es wurden pro Familie mehrere Varianten (ca. 5 bis 10), welche den beschriebenen strengen Filterkriterien standhalten konnten, bezüglich ihrer Segregation innerhalb der Familie überprüft (durchgeführt von einer Mitarbeiterin des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung, AG Prof. Gasser, Tübingen). Anhand der Recherche aktueller Literatur, möglicher labordiagnostischer Untersuchungen oder weiterer *in silico* Analysen müssen in einem nächsten Schritt diejenigen Varianten, die mit der Erkrankung innerhalb der einzelnen Familien segregieren, weiter evaluiert werden. Denkbar ist dabei auch, die maximale Allelfrequenz zu erhöhen, die mit 0,1% sehr niedrig angesetzt war, da von sehr seltenen potentiell pathogenen Mutationen ausgegangen wurde. Entsprechend der Abbildung 8 wurde auch der anhand des Stammbaums vermutete Vererbungsmodus der jeweiligen Familie in der Pipeline zur Detektion möglicher pathogener Varianten abgebildet, indem beispielsweise der Fokus bei konsanguinen Familien auf homozygoten Varianten lag. Es ist jedoch vor allem bei konsanguinen Familien mit einem Betroffenen/einer Betroffenen nicht auszuschließen, dass *de novo* Varianten ursächlich sein könnten. Die gezielte Identifikation solcher *de novo* Varianten kann am effektivsten per Trio-Exom-Analyse erreicht werden, die bisher jedoch nicht initiiert wurde.

Zusammenfassend erlaubte die Exom-Sequenzierung bei sieben türkischen, von Dystonie betroffenen Familien den genetischen Nachweis einer Differentialdiagnose durch zwei compound-heterozygote Mutationen im *ATM*-Gen innerhalb der Familie DYS7 sowie die Detektion einer homozygoten Veränderung im *DNAJC6*-Gen bei Familie DYS11, deren tatsächliche Pathogenität bislang jedoch nicht eindeutig beurteilt werden kann. Zusätzlich konnte bei Familie DYS54 eine 15bp Deletion im *INPP4A*-Gen identifiziert werden, welches anhand eines Mausmodells bereits mit Glutamat-vermittelter Exzitotoxizität und Dystonie verknüpft wurde und somit ein mögliches neues Kandidatengen darstellen könnte, wenngleich die Identifikation weiterer Mutationsträger sowie umfassende funktionelle Studien erst noch weitere Hinweise liefern müssen.

Gleichzeitig verdeutlicht das beschriebene Projekt jedoch auch die bereits in Kapitel 1.5 beschriebenen Herausforderungen, welche mit der Exom-Sequenzierung zum Nachweis kausaler Mutationen oder in diesem Fall zur Identifikation neuer Krankheitsgene

einhergehen, da in vier beziehungsweise fünf der untersuchten Familien bisher kein vielversprechendes Kandidatengen ausgemacht werden konnte.

5. Ausblick

Die vorliegende Dissertation zeigt anhand der Bearbeitung diagnostischer und wissenschaftlicher Fragestellungen das enorme Potential auf, welches trotz technischer und analytischer Herausforderungen von der Panel- und der Exom-Sequenzierung mittels NGS ausgeht.

Obwohl die NGS-Technologie im Rahmen dieser Arbeit im Kontext unterschiedlicher Erkrankungen aus dem neurodegenerativen Spektrum vielfach erfolgreich eingesetzt wurde wie beispielsweise zur Identifikation kausaler Mutationen, zum genetischen Nachweis von Differentialdiagnosen, zur Erweiterung des Mutationsspektrums und der Evaluierung aktuell diskutierter Hypothesen sowie zur Identifikation von Kandidatengenen, bleiben dennoch einige Fragen und erforderliche weiterführende Bemühungen offen. Dies gilt insbesondere für diejenigen Projekte, die auf die Suche nach Kandidatengenen für NBIA-Erkrankungen (Kapitel 4.3) und Dystonie (Kapitel 4.5) abzielen. Um weitere Evidenz bezüglich der Relevanz von Mutationen im *HEPH*-Gen bei neurodegenerativen Erkrankungen mit Eisenablagerungen zu gewinnen, sind einerseits Mutationsscreenings in unabhängigen Patienten- und Kontroll-Kohorten sowie andererseits umfassende funktionelle Studien beispielsweise anhand von Fibroblasten von Variantenträgern nötig. Zur Steigerung der Effizienz hinsichtlich der Suche nach Kandidatengenen für Dystonie innerhalb der untersuchten türkischen Familien wäre in einem ersten Schritt die zusätzliche Exom-Sequenzierung der Eltern (klassische Trio-Exom-Analyse) oder weiterer Familienmitglieder (modifizierte Trio-Exom-Analyse) der jeweiligen Indexpatienten denkbar. Unabhängig davon müssen vielversprechende Kandidatengene in jedem Fall auch hier funktionellen Studien standhalten und Screenings in Patienten- und Kontrollkohorten von übereinstimmender ethnischer Herkunft initiiert werden.

Zusammenfassend argumentiert die vorliegende Dissertation einerseits für einen verstärkten Einsatz der NGS-Technologie in der molekulargenetischen Diagnostik bis hin zu einem Paradigmenwechsel, wonach die Suche nach kausalen Mutation bereits zu einem viel früheren Zeitpunkt in den diagnostischen Prozess eingebunden werden sollte. Andererseits muss die NGS-Technologie im Rahmen der humangenetischen

Forschung auch weiterhin zur Entschlüsselung der genetischen Grundlagen hereditärer Erkrankungen eingesetzt werden, um ein noch detailliertes Verständnis der grundlegenden Pathomechanismen zu ermöglichen, welches als Voraussetzung nicht nur für die Etablierung personalisierter Therapieoptionen gilt. Dies wird zukünftig auch vermehrt die Analyse nicht-kodierender Bereiche mittels Genom-Sequenzierung (WGS) und die Beurteilung deren Relevanz im Kontext erblicher Erkrankungen mit einschließen. Möglicherweise könnte dieser Ansatz auch zur Aufklärung bisher ungelöster diagnostischer Fragestellungen beitragen (z. B. im Fall von Ganos et al. 2014 [A2]). In diesem Zusammenhang ist vor allem die andauernde Optimierung effizienter bioinformatischer und analytischer Methoden essentiell und stellt die Anwender von WGS vor große Herausforderungen. Mit der Überwindung dieser Hürden verspricht die Genom-Sequenzierung zukünftig jedoch eine außerordentliche Leistungsfähigkeit bezüglich Diagnostik und Erforschung hereditärer Erkrankungen.

Literaturverzeichnis

1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012 Nov 1; 491(7422):56-65.

Abel O, Powell JF, Andersen PM, Al-Chalabi A. ALSod: A user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Hum Mutat*. 2012 Sep;33(9):1345-51.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr; 7(4):248-9.

Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VS, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord*. 2013 Jun 15; 28(7):863-73.

Armstrong RA. On the 'classification' of neurodegenerative disorders: discrete entities, overlap or continuum? *Folia Neuropathol*. 2012; 50(3):201-8.

Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(W1):W597-W603.

Association for Clinical Genetic Science, Part of the British Society for Genetic Medicine. Practice guidelines for Targeted Next Generation Sequencing Analysis and Interpretation. Birmingham: Association for Clinical Genetic Science; 2014.

Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*. 2011 Sep 27; 12(11):745-55. doi: 10.1038/nrg3031.

Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, Berg-Alonso L, Kageyama Y, Serre V, Moore DG, Verschueren A, Rouzier C, Le Ber I, Augé G, Cochaud C, Lespinasse F, N'Guyen K, de Septenville A, Brice A, Yu-Wai-Man P, Sesaki H, Pouget J, Paquis-Flucklinger V. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*. 2014 Aug; 137(Pt 8):2329-45.

Bento-Abreu A, Van Damme P, Van Den Bosch L, Robberecht W. The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci*. 2010 Jun; 31(12):2247-65.

Bettencourt C, Houlden H. Exome sequencing uncovers hidden pathways in familial and sporadic ALS. *Nat Neurosci*. 2015 May; 18(5):611-3.

Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganie SA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother.* 2015 Aug; 74:101-10.

Bird TD. Early-Onset Familial Alzheimer Disease. 1999 Sep 24 [Updated 2012 Oct 18]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1236/>

Biskup S, Gasser T. Genetic testing in neurological diseases. *J Neurol.* 2012 Jun; 259(6):1249-54.

Biskup S. Hochdurchsatz-Sequenzierung in der Humangenetischen Diagnostik. *LaboratoriumsMedizin.* Band 34, Heft 6, Seiten 305-309, ISSN (Online) 1439-0477, ISSN (Print) 0342-3026, DOI: 10.1515/jlm.2010.056, November 2010.

Bonn F, Pantakani K, Shoukier M, Langer T, Mannan AU. Functional evaluation of paraplegin mutations by a yeast complementation assay. *Hum Mutat.* 2010 May; 31(5):617-21.

Bossy-Wetzell E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med.* 2004 Jul; 10 Suppl:S2-9.

Brownstein CA, Beggs AH, Homer N, Merriman B, Yu TW, Flannery KC, DeChene ET, Towne MC, Savage SK, Price EN, Holm IA, Luquette LJ, Lyon E, Majzoub J, Neupert P, McCallie D Jr, Szolovits P, Willard HF, Mendelsohn NJ, Temme R, Finkel RS, Yum SW, Medne L, Sunyaev SR, Adzhubey I, Cassa CA, de Bakker PI, Duzkale H, Dworzyński P, Fairbrother W, Francioli L, Funke BH, Giovanni MA, Handsaker RE, Lage K, Lebo MS, Lek M, Leshchiner I, MacArthur DG, McLaughlin HM, Murray MF, Pers TH, Polak PP, Raychaudhuri S, Rehm HL, Soemedi R, Stitzel NO, Vestrecka S, Supper J, Gugenmus C, Klocke B, Hahn A, Schubach M, Menzel M, Biskup S, Freisinger P, Deng M, Braun M, Perner S, Smith RJ, Andorf JL, Huang J, Ryckman K, Sheffield VC, Stone EM, Bair T, Black-Ziegelbein EA, Braun TA, Darbro B, DeLuca AP, Kolbe DL, Scheetz TE, Shearer AE, Sompallae R, Wang K, Bassuk AG, Edens E, Mathews K, Moore SA, Shchelochkov OA, Trapane P, Bossler A, Campbell CA, Heusel JW, Kwitek A, Maga T, Panzer K, Wassink T, Van Daele D, Azaiez H, Booth K, Meyer N, Segal MM, Williams MS, Tromp G, White P, Corsmeier D, Fitzgerald-Butt S, Herman G, Lamb-Thrush D, McBride KL, Newsom D, Pierson CR, Rakowsky AT, Maver A, Lovrečić L, Palandačić A, Peterlin B, Torkamani A, Wedell A, Huss M, Alexeyenko A, Lindvall JM, Magnusson M, Nilsson D, Stranneheim H, Taylan F, Gilissen C, Hoischen A, van Bon B, Yntema H, Nelen M, Zhang W, Sager J, Zhang L, Blair K, Kural D, Cariaso M, Lennon GG, Javed A, Agrawal S, Ng PC, Sandhu KS, Krishna S, Veeramachaneni V, Isakov O, Halperin E, Friedman E, Shomron N, Glusman G, Roach JC, Caballero J, Cox HC, Mauldin D, Ament SA, Rowen L, Richards DR, San Lucas FA, Gonzalez-Garay ML, Caskey CT, Bai Y, Huang Y, Fang F, Zhang Y, Wang Z, Barrera J, Garcia-Lobo JM, González-Lamuño D, Llorca J, Rodriguez MC, Varela I, Reese MG, De La Vega FM, Kiruluta E, Cargill M, Hart RK, Sorenson JM, Lyon GJ, Stevenson DA, Bray BE, Moore BM, Eilbeck K,

Yandell M, Zhao H, Hou L, Chen X, Yan X, Chen M, Li C, Yang C, Gunel M, Li P, Kong Y, Alexander AC, Alvertyn ZI, Boycott KM, Bulman DE, Gordon PM, Innes AM, Knoppers BM, Majewski J, Marshall CR, Parboosingh JS, Sawyer SL, Samuels ME, Schwartzentruber J, Kohane IS, Margulies DM. An international effort towards developing standards for best practices in analysis, interpretation and reporting of clinical genome sequencing results in the CLARITY Challenge. *Genome Biol.* 2014 Mar 25; 15(3):R53.

Brüggemann N, Klein C. Parkin Type of Early-Onset Parkinson Disease. 2001 Apr 17 [Updated 2013 Apr 4]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1478/>

Brugman F, Scheffer H, Wokke JH, Nillesen WM, de Visser M, Aronica E, Veldink JH, van den Berg LH. Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes. *Neurology.* 2008 Nov 4; 71(19):1500-5.

Bundesministerium für Gesundheit, Gendiagnostikgesetz, http://www.bmg.bund.de/glossar_begriffe/g_gendiagnostikgesetz.html, letzter Zugriff: 22.12.2015

Cady J, Allred P, Bali T, Pestronk A, Goate A, Miller TM, Mitra RD, Ravits J, Harms MB, Baloh RH. Amyotrophic lateral sclerosis onset is influenced by the burden of rare variants in known amyotrophic lateral sclerosis genes. *Ann Neurol.* 2015 Jan; 77(1):100-13.

Cannon A, Fujioka S, Rutherford NJ, Ferman TJ, Broderick DF, Boylan KB, Graff-Radford NR, Uitti RJ, Rademakers R, Wszolek ZK, Dickson DW. Clinicopathologic variability of the GRN A9D mutation, including amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2013 May 7; 80(19):1771-7.

Casari G, Marconi R. Spastic Paraplegia 7. 2006 Aug 24 [Updated 2010 Dec 23]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1107/>

Charlesworth G, Mohire MD, Schneider SA, Stamelou M, Wood NW, Bhatia KP. Ataxia telangiectasia presenting as dopa-responsive cervical dystonia. *Neurology.* 2013 Sep 24; 81(13):1148-51.

Charlesworth G, Plagnol V, Holmström KM, Bras J, Sheerin UM, Preza E, Rubio-Agusti I, Ryten M, Schneider SA, Stamelou M, Trabzuni D, Abramov AY, Bhatia KP, Wood NW. Mutations in ANO3 cause dominant craniocervical dystonia: ion channel implicated in pathogenesis. *Am J Hum Genet.* 2012 Dec 7; 91(6):1041-50.

Chaussonot A, Le Ber I, Ait-El-Mkadem S, Camuzat A, de Septenville A, Bannwarth S, Genin EC, Serre V, Augé G; French research network on FTD and FTD-ALS, Brice A, Pouget J, Paquis-Flucklinger V. Screening of CHCHD10 in a French cohort confirms the

involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Aging*. 2014 Dec; 35(12):2884.e1-4.

Chen S, Sayana P, Zhang X, Le W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol Neurodegener*. 2013 Aug 13; 8:28.

Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012; 7(10):e46688.

Couthouis J, Raphael AR, Daneshjou R, Gitler AD. Targeted exon capture and sequencing in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet*. 2014 Oct 9; 10(10):e1004704.

Cozzolino M, Rossi S, Mirra A, Carri MT. Mitochondrial dynamism and the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 2015 Feb 10; 9:31.

Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat*. 2012 Sep; 33(9):1340-4.

Dauer W. Inherited isolated dystonia: clinical genetics and gene function. *Neurotherapeutics*. 2014 Oct; 11(4):807-16.

dbSNP Homepage. NCBI National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, letzter Zugriff: 22.12.2015.

Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*. 1996 Oct 24; 383(6602):710-3.

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

Exome Aggregation Consortium (ExAC), Cambridge, MA (URL: <http://exac.broadinstitute.org>)

Exome Variant Server. NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)

Foo JN, Liu J, Tan EK. Next-generation sequencing diagnostics for neurological diseases/disorders: from a clinical perspective. *Hum Genet*. 2013 Jul; 132(7):721-34.

Foo JN, Liu JJ, Tan EK. Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases. *Nat Rev Neurol*. 2012 Sep; 8(9):508-17.

Fuchs T, Saunders-Pullman R, Masuho I, Luciano MS, Raymond D, Factor S, Lang AE, Liang TW, Trosch RM, White S, Ainehsazan E, Hervé D, Sharma N, Ehrlich ME, Martemyanov KA, Bressman SB, Ozelius LJ. Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nat Genet.* 2013 Jan; 45(1):88-92.

Ganos C, Biskup S, Kleinmichel S, Zittel S, Schunke O, Gerloff C, Münchau A. Progressive ataxia associated with scarring skin lesions and vertical gaze palsy. *Mov Disord.* 2013 Apr; 28(4):443-5.

Ganos C, Biskup S, Krüger S, Meyer-Osores A, Hodecker S, Hagel C, Schöls L, Bhatia KP, Münchau A. Dystonia with aphonia, slow horizontal saccades, epilepsy and photic myoclonus: a novel syndrome? *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Mar; 20(3):328-31.

Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, Boeve B, Baker M, Adamson J, Crook R, Melquist S, Kuntz K, Petersen R, Josephs K, Pickering-Brown SM, Graff-Radford N, Uitti R, Dickson D, Wszolek Z, Gonzalez J, Beach TG, Bigio E, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, White CL 3rd, Woodruff B, Caselli R, Hsiung GY, Feldman H, Knopman D, Hutton M, Rademakers R. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet.* 2006 Oct 15; 15(20):2988-3001.

Gatti R. Ataxia-Telangiectasia. 1999 Mar 19 [Updated 2010 Mar 11]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26468/>

Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol.* 2013 Aug; 133(8):e11.

Gregory A, Hayflick S. Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders Overview. 2013 Feb 28 [Updated 2014 Apr 24]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK121988/>

Haack TB, Hogarth P, Kruer MC, Gregory A, Wieland T, Schwarzmayr T, Graf E, Sanford L, Meyer E, Kara E, Cuno SM, Harik SI, Dandu VH, Nardocci N, Zorzi G, Dunaway T, Tarnopolsky M, Skinner S, Frucht S, Hanspal E, Schrandt-Stumpel C, Héron D, Mignot C, Garavaglia B, Bhatia K, Hardy J, Strom TM, Boddaert N, Houlden HH, Kurian MA, Meitinger T, Prokisch H, Hayflick SJ. Exome sequencing reveals de novo WDR45 mutations causing a phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA. *Am J Hum Genet.* 2012 Dec 7; 91(6):1144-9.

Hersheson J, Mencacci NE, Davis M, MacDonald N, Trabzuni D, Ryten M, Pittman A, Paudel R, Kara E, Fawcett K, Plagnol V, Bhatia KP, Medlar AJ, Stanescu HC, Hardy J, Kleta R, Wood NW, Houlden H. Mutations in the autoregulatory domain of β -tubulin 4a cause hereditary dystonia. *Ann Neurol.* 2013 Apr; 73(4):546-53.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004 Oct 21; 431(7011):931-45.

Jacob HJ. Next-generation sequencing for clinical diagnostics. *N Engl J Med.* 2013 Oct 17; 369(16):1557-8.

Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.* 2004 Jan 15; 13(2):159-70.

Jiang R, Hua C, Wan Y, Jiang B, Hu H, Zheng J, Fuqua BK, Dunaief JL, Anderson GJ, David S, Vulpe CD, Chen H. Hephaestin and ceruloplasmin play distinct but interrelated roles in iron homeostasis in mouse brain. *J Nutr.* 2015 May; 145(5):1003-9.

Johnson JO, Glynn SM, Gibbs JR, Nalls MA, Sabatelli M, Restagno G, Drory VE, Chiò A, Rogaeva E, Traynor BJ. Mutations in the CHCHD10 gene are a common cause of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2014 Dec; 137(Pt 12):e311.

Kawamata H, Manfredi G. Introduction to neurodegenerative diseases and related techniques. *Methods Mol Biol.* 2011; 793:3-8.

Keimling M, Volcic M, Csernok A, Wieland B, Dörk T, Wiesmüller L. Functional characterization connects individual patient mutations in ataxia telangiectasia mutated (ATM) with dysfunction of specific DNA double-strand break-repair signaling pathways. *FASEB J.* 2011 Nov; 25(11):3849-60.

Keller A, Meese E, Durand C, Biskup S (2015). *Nucleic Acids as Molecular Diagnostics, Chapter 12: Genome, Exome, and Gene Panel Sequencing in a Clinical Setting.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

Kenna KP, McLaughlin RL, Byrne S, Elamin M, Heverin M, Kenny EM, Cormican P, Morris DW, Donaghy CG, Bradley DG, Hardiman O. Delineating the genetic heterogeneity of ALS using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet.* 2013 Nov; 50(11):776-83.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006.

Kinsley L, Siddique T. Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview. 2001 Mar 23 [Updated 2015 Feb 12]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1450/>

Klein C, Marras C, Münchau A. Dystonia Overview. 2003 Oct 28 [Updated 2014 May 1]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1155/>

- Klein C. Genetics in dystonia. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Jan; 20 Suppl 1:S137-42.
- Klein CJ. Adult Polyglucosan Body Disease. 2009 Apr 2 [Updated 2013 Dec 19]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5300/>
- Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER, Weinstock GM, Wilson RK, Ding L. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2009; 25 (17), 2283-5.
- Köroğlu Ç, Baysal L, Cetinkaya M, Karasoy H, Tolun A. DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013 Mar; 19(3):320-4.
- Kovacs GG, editor. *Neuropathology of Neurodegenerative Diseases: A Practical Guide*. Cambridge University Press 2015.
- Kovacs GG. Current concepts of neurodegenerative diseases. *EMJ Neurol*. 2014; 1:178-86.
- Ku CS, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R. Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann Neurol*. 2012 Jan; 71(1):5-14.
- Kuhm C, Gallenmüller C, Dörk T, Menzel M, Biskup S, Klopstock T. Novel ATM mutation in a German patient presenting as generalized dystonia without classical signs of ataxia-telangiectasia. *J Neurol*. 2015 Mar; 262(3):768-70.
- Kurzwelly D, Krüger S, Biskup S, Heneka MT. A distinct clinical phenotype in a German kindred with motor neuron disease carrying a CHCHD10 mutation. *Brain*. 2015 Sep; 138(Pt 9):e376.
- Lansbury PT, Lashuel HA. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*. 2006 Oct 19; 443(7113):774-9.
- Levi S, Finazzi D. Neurodegeneration with brain iron accumulation: update on pathogenic mechanisms. *Front Pharmacol*. 2014 May 7; 5:99.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*. 2009; 25:1754-60.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25, 2078-9.
- Lohmann E, Krüger S, Hauser AK, Hanagasi H, Guven G, Erginel-Unaltuna N, Biskup S, Gasser T. Clinical variability in ataxia-telangiectasia. *J Neurol*. 2015 Jul; 262(7):1724-7.

Lohmann K, Klein C. Genetics of dystonia: what's known? What's new? What's next? *Mov Disord*. 2013 Jun 15; 28(7):899-905.

Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics*. 2014 Oct; 11(4):699-707.

Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pampillet R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O; Chromosome 9-ALS/FTD Consortium; French research network on FTL/FTL/ALS; ITALSGEN Consortium, Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012 Apr; 11(4):323-30.

Müller K, Andersen PM, Hübers A, Marroquin N, Volk AE, Danzer KM, Meitinger T, Ludolph AC, Strom TM, Weishaupt JH. Two novel mutations in conserved codons indicate that CHCHD10 is a gene associated with motor neuron disease. *Brain*. 2014 Dec; 137(Pt 12):e309.

Németh AH, Kwasniewska AC, Lise S, Parolin Schnekenberg R, Becker EB, Bera KD, Shanks ME, Gregory L, Buck D, Zameel Cader M, Talbot K, de Silva R, Fletcher N, Hastings R, Jayawant S, Morrison PJ, Worth P, Taylor M, Tolmie J, O'Regan M; UK Ataxia Consortium, Valentine R, Packham E, Evans J, Seller A, Ragoussis J. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain*. 2013 Oct; 136(Pt 10):3106-18.

Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, Hoefsloot LH, Kamsteeg EJ, Mensenkamp AR, Rodenburg RJ, Yntema HG, Spruijt L, Vermeer S, Rinne T, van Gassen KL, Bodmer D, Lugtenberg D, de Reuver R, Buijsman W, Derks RC, Wieskamp N, van den Heuvel B, Ligtenberg MJ, Kremer H, Koolen DA, van de Warrenburg BP, Cremers FP, Marcelis CL, Smeitink JA, Wortmann SB, van Zelst-Stams WA, Veltman JA, Brunner HG, Scheffer H, Nelen MR. A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat*. 2013 Dec; 34(12):1721-6.

Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*. 2001 May; 11(5):863-74.

Peters OM, Ghasemi M, Brown RH Jr. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *J Clin Invest*. 2015 May; 125(5):1767-79.

Rabbani B, Tekin M, Mahdih N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*. 2014 Jan; 59(1):5-15.

- Redler RL, Dokholyan NV. The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012; 107:215-62.
- Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci.* 2014 Jan; 17(1):17-23.
- Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015 May 21; 58(4):586-97.
- Rohrer JD, Isaacs AM, Mizielińska S, Mead S, Lashley T, Wray S, Sidle K, Fratta P, Orrell RW, Hardy J, Holton J, Revesz T, Rossor MN, Warren JD. C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2015 Mar; 14(3):291-301.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung W-Y, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH Jr. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993 Mar 4; 362(6415):59-62.
- Rouault TA. Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Aug; 14(8):551-64.
- Sánchez-Ferrero E, Coto E, Beetz C, Gámez J, Corao AI, Díaz M, Esteban J, del Castillo E, Moris G, Infante J, Menéndez M, Pascual-Pascual SI, López de Munáin A, Garcia-Barcina MJ, Alvarez V; Genetics of Spastic Paraplegia study group. SPG7 mutational screening in spastic paraplegia patients supports a dominant effect for some mutations and a pathogenic role for p.A510V. *Clin Genet.* 2013 Mar; 83(3):257-62.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec; 74(12):5463-7.
- Sasaki J, Kofuji S, Itoh R, Momiyama T, Takayama K, Murakami H, Chida S, Tsuya Y, Takasuga S, Eguchi S, Asanuma K, Horie Y, Miura K, Davies EM, Mitchell C, Yamazaki M, Hirai H, Takenawa T, Suzuki A, Sasaki T. The PtdIns(3,4)P(2) phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature.* 2010 May 27; 465(7297):497-501.
- Schulz K, Vulpe CD, Harris LZ, David S. Iron efflux from oligodendrocytes is differentially regulated in gray and white matter. *J Neurosci.* 2011 Sep 14; 31(37):13301-11.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014 Apr; 11(4):361-2.
- Scott SP, Bendix R, Chen P, Clark R, Dork T, Lavin MF. Missense mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patients with breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 22; 99(2):925-30.

Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008 Oct; 26(10):1135-45.

Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan 1; 29(1):308-11.

Su XW, Broach JR, Connor JR, Gerhard GS, Simmons Z. Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical practice and research. *Muscle Nerve.* 2014 Jun; 49(6):786-803.

Swart C, Haylett W, Kinnear C, Johnson G, Bardien S, Loos B. Neurodegenerative disorders: dysregulation of a carefully maintained balance? *Exp Gerontol.* 2014 Oct; 58:279-91.

Synofzik M, Born C, Rominger A, Lummel N, Schöls L, Biskup S, Schüle C, Grasshoff U, Klopstock T, Adamczyk C. Targeted high-throughput sequencing identifies a TARDBP mutation as a cause of early-onset FTD without motor neuron disease. *Neurobiol Aging.* 2014 May; 35(5):1212.e1-5.

Takalo M, Salminen A, Soininen H, Hiltunen M, Haapasalo A. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis.* 2013; 2(1):1-14.

The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: D204-D212.

Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013; 14, 178-192.

Toft M. Advances in genetic diagnosis of neurological disorders. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2014; (198):20-5.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15):e115

van Blitterswijk M, van Es MA, Hennekam EA, Dooijes D, van Rheenen W, Medic J, Bourque PR, Schelhaas HJ, van der Kooij AJ, de Visser M, de Bakker PI, Veldink JH, van den Berg LH. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2012 Sep 1; 21(17):3776-84.

Verhagen MM, Last JI, Hogervorst FB, Smeets DF, Roeleveld N, Verheijen F, Catsman-Berrevoets CE, Wulffraat NM, Cobben JM, Hiel J, Brunt ER, Peeters EA, Gómez Garcia EB, van der Knaap MS, Lincke CR, Laan LA, Tijssen MA, van Rijn MA, Majoor-Krakauer D, Visser M, van 't Veer LJ, Kleijer WJ, van de Warrenburg BP, Warris A, de Groot IJ, de Groot R, Broeks A, Preijers F, Kremer BH, Weemaes CM, Taylor MA, van Deuren M, Willemsen MA. Presence of ATM protein and residual kinase activity correlates with the

- phenotype in ataxia-telangiectasia: a genotype-phenotype study. *Hum Mutat.* 2012 Mar; 33(3):561-71.
- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet.* 1999 Feb; 21(2):195-9.
- Walker LC, Diamond MI, Duff KE, Hyman BT. Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases. *JAMA Neurol.* 2013 Mar 1; 70(3):304-10.
- Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2014 Oct; 13(10):1045-60.
- Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1953; 18:123-31.
- White AR, Kanninen KM, Crouch PJ. Editorial: Metals and neurodegeneration: restoring the balance. *Front Aging Neurosci.* 2015 Jul 2; 7:127.
- Wu J, Jiang R. Prediction of deleterious nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms for human diseases. *ScientificWorldJournal.* 2013; 2013:675851.
- Xiao J, Uitti RJ, Zhao Y, Vemula SR, Perlmutter JS, Wszolek ZK, Maraganore DM, Auburger G, Leube B, Lehnhoff K, LeDoux MS. Mutations in CIZ1 cause adult onset primary cervical dystonia. *Ann Neurol.* 2012 Apr; 71(4):458-69.
- Yim YI, Sun T, Wu LG, Raimondi A, De Camilli P, Eisenberg E, Greene LE. Endocytosis and clathrin-uncoating defects at synapses of auxilin knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 2; 107(9):4412-7.
- Yu Y, Wu BL, Wu J, Shen Y. Exome and whole-genome sequencing as clinical tests: a transformative practice in molecular diagnostics. *Clin Chem.* 2012 Nov; 58(11):1507-9.
- Zerbino DR, Wilder SP, Johnson N, Juettemann T, Flicek PR. The ensembl regulatory build. *Genome Biol.* 2015 Mar 24; 16:56. doi: 10.1186/s13059-015-0621-5.
- Zhao L, Hadziahmetovic M, Wang C, Xu X, Song Y, Jinnah HA, Wodzinska J, Iacovelli J, Wolkow N, Krajacic P, Weissberger AC, Connelly J, Spino M, Lee MK, Connor J, Giasson B, Leah Harris Z, Dunaief JL. Cp/Heph mutant mice have iron-induced neurodegeneration diminished by deferiprone. *J Neurochem.* 2015 Aug 25. doi: 10.1111/jnc.13292.

Anhang

A1: Ganos C, Biskup S, Kleinmichel S, Zittel S, Schunke O, Gerloff C, Münchau A. Progressive ataxia associated with scarring skin lesions and vertical gaze palsy. *Mov Disord* 2013. 28(4):443-5.

A2: Ganos C, Biskup S, Krüger S, Meyer-Osores A, Hodecker S, Hagel C, Schöls L, Bhatia KP, Münchau A. Dystonia with aphonia, slow horizontal saccades, epilepsy and photic myoclonus: a novel syndrome? *Parkinsonism Relat Disord* 2014. 20(3):328-31.

A3: Kurzwelly D, Krüger S, Biskup S, Heneka MT. A distinct clinical phenotype in a German kindred with motor neuron disease carrying a CHCHD10 mutation. *Brain* 2015. 138(Pt 9):e376. *By permission of Oxford University Press.*

A4: Lohmann E, Krüger S, Hauser AK, Hanagasi H, Guven G, Erginel-Unaltuna N, Biskup S, Gasser T. Clinical variability in ataxia-telangiectasia. *J Neurol* 2015. 262(7):1724-7. *With permission of Springer.*

A5: Wilke C, Gillardon F, Deuschle C, Dubois E, Hobert MA, Vom Hagen JM, Krüger S, Biskup S, Blauwendraat C, Hruscha M, Kaeser S, Heutink P, Maetzler W, Synofzik M. Serum levels of progranulin do not reflect cerebrospinal fluid levels in neurodegenerative disease. *Curr Alzheimer Res* 2016. 13(6):654-62. *Reprinted by permission of Eureka Science Ltd.*

A6: Rempe T, Kühlenbäumer G, Krüger S, Biskup S, Matschke J, Hagel C, Deuschl G, van Eimeren T. Early-onset parkinsonism due to compound heterozygous POLG mutations. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016. Aug;29:135-7.

A7: Linnebank M, McDougall C, Krüger S, Biskup S, Neumann M, Weller M, Valavanis A, Prudlo J. Novel cases of ALS after treatment of cerebral arteriovenous malformations. *Swiss Med Wkly*. 2016 Nov 12;146:w14361. doi: 10.4414/smw.2016.14361. eCollection 2016.

A8: Dudsek A, Rimmele F, Funke C, Krüger S, Benecke R, Biskup S, Kamm C. Autosomal dominant inheritance in SPG18: Exome sequencing reveals a novel ERLIN2 missense mutation cosegregating with a pure form of HSP.

A9: Krüger S, Battke F, Sprecher A, Munz M, Synofzik M, Schöls L, Gasser T, Grehl T, Prudlo J, Biskup S. Rare variants in neurodegeneration associated genes revealed by targeted panel sequencing in a German ALS cohort. *Front Mol Neurosci*. 2016 Oct 13;9:92. eCollection 2016.

A10: Hermann A, Kitzler H, Biskup S, Krüger S, Funke C, Terrile C, Haack TB. A case of beta-propeller protein-associated neurodegeneration due to a heterozygous deletion of WDR45.