

Aus dem Institut für Humangenetik  
(Prof. Dr. med. B. Wollnik)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Genetische Ursachen syndromaler und  
nicht-syndromaler Formen der Lippen-  
Kiefer-Gaumenspalte und funktionelle  
Analyse möglicher Kandidatengene**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Jonas Herbert Fiedler**

aus

Bad Nauheim

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in Prof. Dr. med. B. Wollnik

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

### **Prüfungskommission**

Referent/in Prof. Dr. med. B. Wollnik

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 12.12.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Genetische Ursachen syndromaler und nicht-syndromaler Formen der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte und funktionelle Analyse möglicher Kandidatengene" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>II</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>III</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>IX</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Lippen-Kiefer-Gaumenspalten .....	2
1.1.1	Spaltformen .....	2
1.1.2	Embryologische Entwicklung des Mittel- und Untergesichts .....	4
1.1.3	Häufigkeit und Ursachen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.....	6
1.1.4	Genetische Grundlagen syndromaler und nicht-syndromaler Formen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.....	7
1.2	Phänotypische und genetische Spektren kraniofazialer Malformationen.....	10
1.2.1	Unspezifische Kraniosynostosen.....	10
1.2.2	Crouzon-Syndrom .....	13
1.2.3	Pierre-Robin-Syndrom.....	14
1.2.4	Saethre-Chatzen-Syndrom.....	14
1.2.5	Apert-Syndrom .....	15
1.2.6	Carpenter-Syndrom .....	16
1.3	<i>Next-generation sequencing</i> .....	16
1.4	Zielsetzung und Fragestellung.....	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1	Material.....	20
2.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmittel .....	20
2.1.2	Geräte.....	20
2.1.3.	Lösungen, Puffer und Medien .....	21
2.1.4	Enzyme .....	21

---

2.1.5	Restriktionsendonukleasen .....	22
2.1.6	Primer/Synthetische Oligonukleotide.....	22
2.1.7	Kits.....	25
2.1.8	Vektoren .....	26
2.1.9	Bakterien.....	26
2.1.10	Zelllinien.....	27
2.1.11	Datenbanken, Online-Tools und verwendete Software .....	27
2.1.12	Patientenmaterial .....	28
2.2.	Methoden .....	31
2.2.1	Isolierung von DNA/RNA aus Blut.....	31
2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen .....	31
2.2.3	Erststrang-cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA .....	31
2.2.4	Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrads von Nukleinsäure ....	32
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	32
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	35
2.2.7	Enzymatische Aufreinigung von PCR-Produkten mittels ExoI/TSAP-Verdau	36
2.2.8	Sanger-Sequenzierung .....	36
2.2.9	Multigen-Panel-Analyse .....	38
2.2.10	Exomsequenzierung.....	39
2.2.11	Restriktionsverdau von DNA .....	40
2.2.12	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	41
2.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten.....	41
2.2.14	TOPO Klonierung von DNA-Fragmenten .....	42
2.2.15	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> TOP10F <sup>-</sup> -Bakterien .....	43
2.2.16	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> TOP10F <sup>-</sup> -Bakterien .....	44
2.2.17	Übernachtskultur .....	44
2.2.18	Plasmidpräparation (MiniPrep) .....	44
2.2.19	Kolonie-PCR .....	45

2.2.20	Zielgerichtete Mutagenese-PCR.....	45
2.2.21	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	46
2.2.22	Luciferase Reporter Assay.....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Mutationsanalyse bei Patienten mit klinisch diagnostizierter syndromaler oder isolierter Kraniosynostose .....	49
3.1.1	Identifizierung von <i>Hotspot</i> -Mutationen in bekannten Kraniosynostose-assoziierten Genen.....	49
3.1.2	Multigen-Panel-Analyse bei Patienten mit einer Kraniosynostose .....	55
3.1.3	Genetische Untersuchung eines Patienten mit der Verdachtsdiagnose eines Carpenter-Syndroms .....	64
3.2	Mutationsanalyse in Familien mit isolierten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten mittels Exomsequenzierung.....	66
3.2.1	Familie LKG8.....	67
3.2.2	Familie LKG11 .....	92
3.2.3	Genetische Analysen der Familien LKG12, LKG21 und LKG-Kamerun .....	118
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>144</b>
4.1	Mutationsanalyse bei Patienten mit syndromalen Formen der Kraniosynostose ....	144
4.1.1	Genetische Charakterisierung von Varianten in <i>MEGF8</i> .....	150
4.2	Mutationsanalyse mittels Multigen-Panels bei ausgewählten Patienten mit isolierter Kraniosynostose.....	151
4.3	Identifizierung molekulargenetischer Ursachen für isolierte, nicht-syndromale Lippen-Kiefer-Gaumenspalten .....	154
4.3.1	Identifizierung einer pathogenen Veränderung in <i>PAX7</i> als molekulare Ursache für isolierte Lippen-Kiefer-Gaumenspalten .....	154
4.3.2	Identifizierung einer pathogenen Veränderung in <i>NEDD4L</i> als molekulare Ursache für isolierte Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.....	158
4.3.3	Ergebnis der genetischen Analysen der Familien LKG12, LKG21 sowie LKG-Kamerun .....	160
4.4	Ausblick/Perspektive .....	162

---

<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>165</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>168</b>

## I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Spaltformen.....	4
Abbildung 2: <i>FGF</i> -Signalkaskade. ....	11
Abbildung 3: Unterschiedliche Formen der Kraniosynostose. ....	13
Abbildung 4: Stammbaum der Familie LKG8 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ....	29
Abbildung 5: Stammbaum der Familie LKG11 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ....	29
Abbildung 6: Stammbaum der Familie LKG12 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ....	30
Abbildung 7: Stammbaum der Familie LKG21 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ....	30
Abbildung 8: Stammbaum der Familie LKG-Kamerun mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ...	30
Abbildung 9: Elektropherogramme der identifizierten <i>FGFR2</i> -Mutationen in Patienten mit der Verdachtsdiagnose Apert-Syndrom. ....	52
Abbildung 10: Elektropherogramme der identifizierten <i>FGFR2</i> -Mutationen in Patienten mit der Verdachtsdiagnose Crouzon-Syndrom.....	53
Abbildung 11: Elektropherogramme der identifizierten <i>TWIST1</i> -Mutation im Patienten Gö238 mit der Verdachtsdiagnose Saethre-Chotzen-Syndrom. ....	54
Abbildung 12: Bestätigung der diagnostisch identifizierten Veränderungen in <i>MEGF8</i> mittels PCR und Sanger-Sequenzierung an genomischer DNA des Patienten Gö332. ....	65
Abbildung 13: Nachweis der heterozygoten Sequenzvariante c.5210C>A in <i>MEGF8</i> auf cDNA Ebene. ....	65
Abbildung 14: Nachweis des korrekten Übergangs zwischen Exon 13 und 14 in <i>MEGF8</i> auf cDNA-Ebene. ....	66
Abbildung 15: Stammbaum der Familie LKG8 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ....	67
Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der in Familie LKG8 identifizierten Sequenzveränderung c.229C>T im <i>PAX7</i> -Gen.....	86
Abbildung 17: Stammbaum der Familie LKG8 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte; Ko-Segregation.....	86
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors <i>PAX7</i> sowie der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Veränderungen p.Arg77Cys (rot) und der von Leslie et al. beschrieben Variante p.Ala259Val (schwarz) in <i>PAX7</i> . ....	87
Abbildung 19: Konservierung der Aminosäureposition 77 in <i>PAX7</i> im Vergleich zu anderen Mitgliedern der humanen <i>PAX</i> -Familie. ....	88
Abbildung 20: Speziesübergreifender Vergleich der Konservierung der Aminosäureposition 77 des humanen <i>PAX7</i> -Proteins. ....	88



---

Abbildung 21: Graphische Darstellung der gemittelten, normalisierten relativen Luciferase-Aktivität.....	91
Abbildung 22: Stammbaum der Familie LKG11 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ....	92
Abbildung 23: Exemplarische Darstellung der in Familie LKG11 identifizierten Sequenzveränderung c.551C>T im <i>NEDD4L</i> -Gen.....	118
Abbildung 24: Stammbaum der Familie LKG11 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte; Ko-Segregation.....	118
Abbildung 25: Stammbaum der Familie LKG12 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ....	119
Abbildung 26: Stammbaum der Familie LKG21 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ....	120
Abbildung 27: Stammbaum der Familie LKG-Kamerun mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.	121
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors <i>PAX7</i> .....	157
Abbildung 29: NEDD4L-Protein. ....	160

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgewählte syndromale Erkrankungen mit verschiedenen Formen der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. ....	8
Tabelle 2: Ausgewählte genetische Ursachen nicht-syndromaler Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. ....	9
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte. ....	20
Tabelle 4: Allgemein genutzte Puffer. ....	21
Tabelle 5: Enzyme. ....	21
Tabelle 6: Restriktionsendonukleasen. ....	22
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Primer. ....	22
Tabelle 8: Kits. ....	25
Tabelle 9: Vektoren. ....	26
Tabelle 10: Bakterien. ....	26
Tabelle 11: Zelllinien. ....	27
Tabelle 12: Datenbanken, Online-Tools und verwendete Software. ....	27
Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Polymerasen. ....	33
Tabelle 14: Zusammensetzung der PCR-Ansätze in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase. ....	33
Tabelle 15: PCR-Programme für unterschiedliche Polymerasen. ....	34
Tabelle 16: Verwendete Puffer zur Gelelektrophorese. ....	35
Tabelle 17: Zusammensetzung eines ExoI/TSAP-Ansatzes zur Aufreinigung von PCR-Produkten. ....	36
Tabelle 18: Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes. ....	37
Tabelle 19: PCR-Programm zur Sanger-Sequenzierung. ....	37
Tabelle 20: Übersicht der Gene, die mittels des CRANIO-QXT-Panels untersucht wurden. .	38
Tabelle 21: Standard-Ansatz eines Restriktionsverdau. ....	41
Tabelle 22: Standard-Ansatz einer Ligationsreaktion. ....	42
Tabelle 23: Standard-Ansatz einer TOPO Klonierung. ....	42
Tabelle 24: Benötigte Reaktionsansätze zur Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> TOP10F'-Bakterien. ....	43
Tabelle 25: Herstellung von LB-Agarplatten. ....	44
Tabelle 26: Standard-Ansatz einer Kolonie-PCR. ....	45
Tabelle 27: Standard-Ansatz einer Mutagenese-PCR. ....	46

Tabelle 28: Standard-Transfektionsansatz (24-well-Maßstab) mittels FuGENE HD.....	47
Tabelle 29: Transfektionsansatz zur funktionellen Analyse der <i>PAX7</i> -Mutation.....	48
Tabelle 30: Zusammensetzung des molekulargenetisch charakterisierten Kraniosynostose-Patientenkollektivs. ....	49
Tabelle 31: Übersicht über die getesteten <i>Hotspot</i> -Regionen, die Anzahl der getesteten Patienten sowie die identifizierten Varianten.....	50
Tabelle 32: Übersicht über die Anzahl der identifizierten ursächlichen Varianten aufgeschlüsselt nach der initialen klinischen Verdachtsdiagnose.....	50
Tabelle 33: Übersicht aller identifizierten Mutationen. ....	51
Tabelle 34: Patient K4081, Sequenzvarianten. ....	56
Tabelle 35: Patient Gö224, Sequenzvarianten. ....	60
Tabelle 36: Übersicht der im Rahmen der diagnostischen Analyse bei Patient Gö332 identifizierten Varianten in <i>MEGF8</i> . ....	64
Tabelle 37: Filterungsergebnis nach heterozygoten Varianten bei betroffenen Individuen aus Familie LKG8. ....	69
Tabelle 38: Filterungsergebnis nach heterozygoten Varianten bei betroffenen sowie nicht betroffenen Individuen aus Familie LKG8. ....	76
Tabelle 39: Übersicht der in Familie LKG8 identifizierten Variante in <i>PAX7</i> und ihre Charakterisierung mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme. ....	87
Tabelle 40: Tabellarische Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität. ....	90
Tabelle 41: Tabellarische Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität normalisiert auf die relative Luciferase-Aktivität der Kontrolle (K) pGL3-basic-Id3 eines jeden Experiments.....	90
Tabelle 42: Filterungsergebnis in Familie LKG11. ....	93
Tabelle 43: Übersicht der in Familie LKG11 identifizierten Varianten und ihre Charakterisierung mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme. ....	117
Tabelle 44: Übersicht der in Familie LKG12 identifizierten Varianten und ihre Charakterisierung mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme. ....	119
Tabelle 45: Filterungsergebnis in Familie LKG-Kamerun. ....	122
Tabelle 46: Übersicht der in Familie LKG-Kamerun LKG12 identifizierten Varianten und ihre Charakterisierung mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme. ....	143

**III Abkürzungen**

Array-CGH	<i>Array-based Comparative Genomic Hybridization</i>
bp	Basenpaare
CCG	Cologne Center for Genomics
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ddNTP	<i>dideoxynucleotide triphosphate,</i> Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid,</i> Desoxyribonukleinsäure
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate,</i> Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ExoI	Exonuclease I
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HeLa	Henriette Lacks, humane Epithel-Zelllinie etabliert aus einem Zervixkarzinom

---

HGMD <sup>®</sup>	Human Gene Mutation Database
Kb	Kilobasen
LB	<i>lysogeny broth</i>
LKG	Lippen-Kiefer-Gaumenspalte innerhalb familiärer Bezeichnungen
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NP 40	<i>Nonident P-40</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> Polymerase-Kettenreaktion
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
Pfi	<i>Platinum SuperFi</i>
PNH	Periventrikuläre Heterotopie
RNA	<i>ribonucleic acid,</i> Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
TSAP	<i>Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE

TRIS-Borat-EDTA

WES

*whole-exome sequencing*

## 1 Einleitung

Die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte ist eine Fehlbildung des Gesichtsbereiches beim Menschen (Schwenzer und Arold 1998; Bhattacharya et al. 2009), die nach Dixon et al. (2011) mit einer mittleren Inzidenz von etwa 1:700 Lebendgeborenen auftritt.

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten umfassen eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder mit unterschiedlichen Ausprägungsformen. Spalten können isoliert die Lippe, den harten Gaumen, den weichen Gaumen sowie die Uvula betreffen. Auch der Kiefer kann in Kombination mit einzelnen oder mehreren anderen Segmenten von einer Spalte betroffen sein. Hierbei sind unterschiedliche Kombinationen und Schweregrade der genannten Segmente möglich (Moore et al. 2007; Ehrenfeld et al. 2011).

Eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte kann mit diversen Einschränkungen einhergehen. So können unter anderem Probleme in den Bereichen Ernährung, Atmung, Sprache und Sprechen, Kieferwachstum, Zahnstellung und Gehör auftreten (Ehrenfeld et al. 2011; Cavalheiro et al. 2019). Neben physischen Einschränkungen kann eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte bei Betroffenen auch psychische Beeinträchtigungen, wie zum Beispiel Angstzustände, Verhaltensauffälligkeiten oder ästhetische Unzufriedenheit mit dem eigenen Gesicht bis hin zu Depressionen, auslösen (Kapp-Simon 2004; Grollemund et al. 2010; Feragen et al. 2016). Aufgrund der Vielschichtigkeit der Probleme, die mit einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte einhergehen können, ist eine multiprofessionelle Behandlung indiziert, die eine interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedener Professionen erfordert (Schwenzer und Arold 1998).

In den vergangenen Jahren konnten verschiedene Faktoren ermittelt werden, die ursächlich für eine Spaltbildung sein können. Hierbei kann es sich sowohl um äußere Faktoren als auch genetische Ursachen handeln, die die Spaltbildung hervorrufen. Zu den äußeren Einflussfaktoren, die die häufigste Ursache für diese Art der Fehlbildungen darstellen, zählen zum Beispiel unterschiedliche Einflüsse während der Schwangerschaft, wie etwa der Kontakt zu Giftstoffen, zum Beispiel zu Nikotin, oder zu Medikamenten, wie Kortikosteroiden oder aber auch Überdosierungen von Vitamin A und E, wobei der genaue Pathomechanismus und der konkrete Beitrag der einzelnen Faktoren bislang in den meisten Fällen nicht detailliert geklärt werden konnte. Auch verschiedene Mängel, wie zum Beispiel Sauerstoff- oder auch Nährstoffmängel, können mit dafür verantwortlich sein (Schwenzer und Arold 1998; Ehrenfeld et al. 2011). Daneben können auch genetische Einflussfaktoren ursächlich für die Spaltbildung sein (Dixon et

al. 2011; Ehrenfeld et al. 2011). Hierauf soll in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk gelegt werden.

Trotz des breiten Spektrums an bekannten Einflussfaktoren, die zu einer Spaltbildung führen können, ist eine gänzliche Vermeidung einer Spaltbildung bisher nicht möglich. Prophylaxe-Maßnahmen, die eine Spaltbildung bei Ungeborenen suffizient unterbinden können, sind demnach – und vor allem aufgrund der vielschichtigen Ursachen – noch nicht bekannt. Daher kommen der Therapie und der Behandlung der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte nach der Geburt eine besondere Bedeutung zu.

## 1.1 Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Die nachfolgenden Kapitel geben einen kurzen Überblick über die verschiedenen Formen, Ursachen und genetischen Grundlagen der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.

### 1.1.1 Spaltformen

Betrachtet man die internationale Klassifikation, auf die sich Wissenschaftler 1967 in Rom einigten, so lassen sich drei Gruppen der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten unterscheiden (Schwenzer und Arold 1998):

1. Embryonale Spalten des vorderen Gaumens, die die Lippen- bzw. die Lippen-Kieferspalten einer Seite (rechts oder links) sowie beider Seiten umfassen.
2. Embryonale Spalten des hinteren und vorderen Gaumens, die die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte rechts, links oder beider Seiten beinhalten.
3. Embryonale Spalten des hinteren Gaumens, die die Gaumenspalte des harten Gaumens rechts, links oder beider Seiten sowie die des weichen Gaumens (mittig) umfassen.

Nach Sadler et al. (2008), Ehrenfeld et al. (2011) sowie Moore et al. (2007) gibt es verschiedene Erscheinungsformen von Spalten im Gesichtsbereich. Die Ausprägungsformen reichen von kompletten über partielle bis hin zu sehr kleinen Spalten.

In Bezug auf das *Foramen incisivum* werden durch Moore et al. (2007) zwei große Gruppen von Lippen- und Gaumenspalten unterschieden: Die Gruppe der vorderen sowie die Gruppe der hinteren Spalten. Die vorderen Spalten betreffen den Oberkiefer bis zum *Foramen incisivum*



und die obere Lippe. Zurückzuführen sind diese Spalten meist auf einen Mangel an Mesenchym im Oberkieferfortsatz und im Zwischenkiefersegment. Die hinteren Spalten erstrecken sich vom hinteren Ende des Gaumens bis zum *Foramen incisivum*. Ursache ist hierbei meist eine mangelnde Entwicklung der lateralen Gaumenfortsätze. Auch eine mechanische Verlegung beispielsweise durch die Zungenanlage kann ein Annähern der Gaumenplatten verhindern und so zu einer Spalte, meist im sekundären Gaumen, führen (Moore et al. 2007).

Moore et al. (2007) unterscheiden weiterhin zwischen unilateralen Lippenspalten, bilateralen Lippenspalten, medianen Oberlippenspalten sowie medianen Spalten der Unterlippe. Unilaterale Lippenspalten entstehen dadurch, dass sich der Oberkieferfortsatz der entsprechenden Seite nicht ausreichend mit dem Nasenfortsatz verbindet. Als Grund wird eine unzureichende Proliferation des Mesenchyms innerhalb der jeweiligen Fortsätze diskutiert. Bilaterale Lippenspalten sind bedingt durch ein Ausbleiben der Verschmelzung der Oberkieferfortsätze mit den Nasenfortsätzen auf beiden Seiten. Die mediane Lippenspalte im Bereich des Oberkiefers ist eine seltene Erscheinungsform der Lippenspalte. Sie ist vermutlich durch einen Mangel an Mesenchym bedingt. Das Zwischenkiefersegment kann sich aufgrund einer ausbleibenden Verschmelzung der medialen Nasenfortsätze nicht richtig ausbilden. Ist die mediane Unterlippe betroffen, so wird von einem Ausbleiben der Verschmelzung der Unterkieferfortsätze ausgegangen.

Neben den Lippen kann auch der Gaumen eine Spalte tragen. Dementsprechende Entwicklungsstörungen können auf das Gaumenzäpfchen (*Uvula*) beschränkt sein, aber auch den harten und den weichen Gaumen (*Palatum molle und Palatum durum*) betreffen. Der Grund für eine Gaumenspalte ist auf eine fehlende Verschmelzung der Gaumenfortsätze zurückzuführen (Moore et al. 2007). Hartgaumenspalten treten in der Regel nur in Kombination mit Weichgaumenspalten oder als durchgehende Lippen-Kiefer-Gaumenspalten auf. Dabei können diese einseitig rechts oder links oder beidseitig auftreten (Ehrenfeld et al. 2011).

Kieferspalten treten nach Ehrenfeld et al. (2011) nicht isoliert auf. Sie kommen mit Lippenbeteiligung als Lippen-Kieferspalte vor. Außerdem können sie mit einer Gaumenspalte im Sinne einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte auftreten. Dabei kann die jeweilige Kieferspalte nur eine, aber auch beide Seiten betreffen. In Abbildung 1 werden die verschiedenen Spaltformen zusammengefasst.

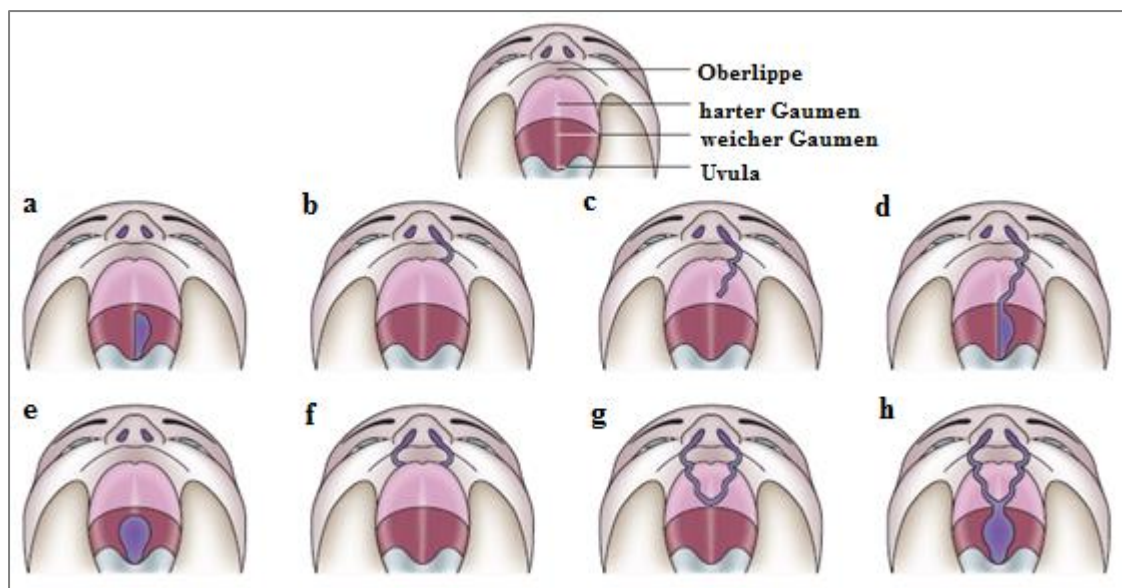


Abbildung 1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Spaltformen.

(Quelle: modifiziert nach Dixon et al. (2011)). (a) unilaterale Gaumenspalte (weicher Gaumen), (b-d) unterschiedlich ausgeprägte unilaterale Lippen-, Kiefer- sowie Gaumenspalten und deren Kombinationen, (e) bilaterale Gaumenspalte (weicher Gaumen), (f-h) unterschiedlich ausgeprägte bilaterale Lippen-, Kiefer-, sowie Gaumenspalten und deren Kombinationen.

Wie in Abbildung 1 deutlich wird, können Spalten isoliert auftreten und sich nur im Bereich der Lippe oder des Gaumens manifestieren. Auch können Kombinationen von Spalten in verschiedenen Segmenten auftreten. Es ist ein unilaterales (auch medianes) und bilaterales Auftreten möglich (Moore et al. 2007). Dabei ist die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte die häufigste Erscheinungsform (40 – 65%). Die linke Hälfte ist doppelt so häufig betroffen wie die rechte Seite (Schwenzer und Arold 1998; Ehrenfeld et al. 2011).

In seltenen Fällen kann es zu Gesichtsspalten kommen, die neben dem Kiefer, dem Gaumen und den Lippen auch weitere Teile des Kopfes bis hin zum Ohr betreffen können und in unterschiedlichen Ausprägungsformen zu finden sind (Moore et al. 2007).

### 1.1.2 Embryologische Entwicklung des Mittel- und Untergesichts

Um die Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten verstehen zu können, ist ein Blick auf die Entwicklung des Embryos im Mutterleib und diesbezüglich insbesondere die Entwicklung des Mittel- und Untergesichts nötig. Wichtige Entwicklungsschritte werden im Folgenden erläutert.

Am 28. Tag der embryonalen Entwicklung sind die ersten drei Schlundbögen entstanden. Die Schlundbögen definieren die spätere Hals- und Kopfreion (Sadler et al. 2008). Für die Gesichtsentwicklung, die in der vierten Embryonalwoche beginnt und in der achten Embryonalwoche bereits eindeutig differenzierte Züge aufweist, sind unter anderem der erste und zweite Schlundbogen wichtig (Sadler et al. 2008). Aus dem ersten Schlundbogen gehen der Oberkieferfortsatz und der Unterkieferfortsatz hervor. Kranial und weiter medial gelegen im Vergleich zum Oberkieferfortsatz ist der Stirnfortsatz zu finden. Somit sind fünf Fortsätze (unpaariger Stirnfortsatz, paariger Oberkieferfortsatz und paariger Unterkieferfortsatz) an der Entstehung des Stomatodeum (primäre Mundhöhle) beteiligt (Moore et al. 2007; Sadler et al. 2008). Der Unterkiefer und die Unterlippe entstehen aus dem Unterkieferfortsatz. Der Oberkieferfortsatz enthält das Anlagenmaterial für den Oberkiefer, Teile des *Os temporale* und des *Os zygomaticum* (Moore et al. 2007; Sadler et al. 2008). Auf den ventrolateralen seitlichen Flächen des Stirnfortsatzes tritt aus dem Ektoderm die sogenannte Riechplakode hervor. Das Gewebe proliferiert und es entsteht ein Wulst auf beiden Seiten, der dann aus einem lateralen sowie einem medialen Nasenwulst besteht. Die Riechplakode verlagert sich in die Tiefe und es entsteht die Riechgrube (Moore et al. 2007).

Die medialen Nasenwülste bewegen sich im weiteren Verlauf aufeinander zu und verschmelzen miteinander. Ebenfalls nähern sich die Oberkieferfortsätze an. Es entsteht das sogenannte Zwischenkiefersegment, welches aus dem Philtrum der oberen Lippe, dem Oberkieferanteil, der die Anlage für die Schneidezähne trägt, und einem Teil des Gaumens, der den primären Gaumen hervorbringt, besteht. Das Zwischenkiefersegment geht mit seinem kranialen Anteil in den rostralen Anteil des Nasenseptums über, welches aus dem Stirnfortsatz entsteht. Die Gaumenplatten, welche ein Teil des Oberkieferwulstes sind, bilden sich in der sechsten Entwicklungswoche aus. In der siebten Embryonalwoche entwickelt sich aus den Gaumenplatten der sekundäre Gaumen. Dieser verschmilzt am *Foramen incisivum* mit dem primären Gaumen. Das Nasenseptum wächst weiter nach kaudal und vereinigt sich mit dem entstandenen Gaumen (Moore et al. 2007; Sadler et al. 2008).

Im Verlauf dieser Entwicklung kann es zu Komplikationen kommen, die eine Spaltbildung auslösen können. Nach Moore et al. (2007) sind dabei hauptsächlich drei Punkte relevant, die im Laufe der beschriebenen embryonalen Entwicklung die Grundlage der Spaltbildung darstellen:

1. Sich aufeinander zubewegende Epithelien haben nicht genug Kontakt.
2. Die Proliferation, Wanderung und Durchmischung des Mesenchyms reichen nicht aus.
3. Bereits entstandene Verschmelzungszonen reißen wieder auf.

Alle drei genannten Entwicklungskomplikationen können dazu führen, dass im embryonalen Gesicht ein Spalt gebildet wird, der wiederum die oben genannten unterschiedlichen Segmente betreffen kann.

### 1.1.3 Häufigkeit und Ursachen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte gehört zu den an häufigsten auftretenden angeborenen Fehlbildungen des Menschen. Je nach sozioökonomischer Lage, Ethnie und geografischer Verteilung ist die Frequenz für eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte unterschiedlich hoch. Im Mittel liegt sie bei ungefähr 1:700 Lebendgeborenen. Somit zählen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten nicht zu den seltenen Erkrankungen, deren Prävalenz geringer als 1:2.000 definiert ist, es sei denn sie treten zum Beispiel im Rahmen eines Syndroms auf, wenn dieses per Definition zu seltenen Erkrankungen zählt. In der asiatischen und amerikanischen Bevölkerung wird die höchste Inzidenz für das Auftreten einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte mit etwa 1:500 Lebendgeborenen angegeben. In Europa liegt sie bei ungefähr 1:1.000 Lebendgeborenen, in der afrikanischen Bevölkerung bei ca. 1:2500. Neben geographischen Unterschieden gibt es zusätzlich auch geschlechtsspezifische Unterschiede. So liegt das Verhältnis bei 2:1 (Mann zu Frau) für die Spalten mit Beeinflussung der Lippe. Hingegen ist das Verhältnis für eine isolierte Gaumenspalte ohne Lippenbeteiligung mit 1:2 (Mann zu Frau) angegeben (Christensen und Mitchell 1996; Moore et al. 2007; Mossey et al. 2009; Beaty et al. 2010; Dixon et al. 2011; Thompson et al. 2016).

Es gibt verschiedene Ursachen, die zu einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte führen können. Neben teratogenen Ursachen kann mütterliches Rauchen, vor allem im ersten Trimester der Schwangerschaft, bei einem ungeborenen Kind zu einer Hypoxie führen, welche die Entstehung von Spalten im orofazialen Bereich begünstigen kann. Neben dem Rauchen kann auch Alkoholkonsum die Entstehung einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte begünstigen (Romitti et al. 1999). Ebenso kann ein Folsäuremangel oder die Einnahme von bestimmten Medikamenten (zum Beispiel Kortikosteroide, Überdosen von Vitamin A und E) oder auch ionisierende Strahlung während der Schwangerschaft das Risiko auf die Bildung einer orofazialen Spalte beim ungeborenen Kind erhöhen (Schwenzer und Arold 1998; Brooklyn et al. 2014).

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten können auch durch genetische Varianten und Veränderungen hervorgerufen werden. Dabei unterscheidet man syndromale und nicht-syndromale Formen. Etwa 70% aller Lippen-Kiefer-Gaumenspalten sind nicht-syndromal, treten also unabhängig von zusätzlichen Fehlbildungen und Dismorphien auf. Bei den isolierten Gaumenspalten liegt

die Häufigkeit für nicht-syndromale Fälle bei ungefähr 50% (Jones 1988; FitzPatrick et al. 1994; Marazita et al. 2002; Dixon et al. 2011; Welzenbach et al. 2021).

Es gibt Familien, in denen ein gehäuftes Auftreten einer speziellen Spaltform zu beobachten ist, was darauf hindeutet, dass es eine genetische Komponente in Bezug auf die Entstehung einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte gibt. Die Wiederholungswahrscheinlichkeit richtet sich danach, wer in der Familie mit welcher Spaltform betroffen ist und nach dem jeweiligen Vererbungsmodus.

Neben nicht-syndromalen Fällen sind über 400 Syndrome beschrieben, die mit einer Lippenpalte, einer Gaumenspalte oder einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte assoziiert sind. Die ursächlichen genetischen Veränderungen reichen dabei von strukturellen Veränderungen, die große genomische Regionen betreffen, bis hin zu Punktmutationen einzelner Basen in bestimmten Genen. (Schwenzer und Arold 1998; Dixon et al. 2011).

#### **1.1.4 Genetische Grundlagen syndromaler und nicht-syndromaler Formen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten**

Der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte als Fehlbildung liegen, wie bereits beschrieben, multifaktorielle Ursachen zugrunde. Prinzipiell unterschieden werden diese in äußerliche Faktoren – wie zum Beispiel Noxen und genetische Faktoren oder Prädispositionen. Neben Genen, die mit einer syndromalen Form der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte einhergehen können, kann eine durch genetische Ursachen hervorgerufene Fehlbildung auch isoliert, also nicht-syndromal, auftreten. Eine Übersicht über ausgewählte, bisher identifizierte, genetische Ursachen, die zur Entstehung einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte beitragen können, ist in Tabelle 1 (syndromale Form der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte) und Tabelle 2 (nicht-syndromale Form der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte) zusammengefasst (Dixon et al. (2011)).

Tabelle 1: Ausgewählte syndromale Erkrankungen mit verschiedenen Formen der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

(Quelle: modifiziert nach Dixon et al. (2011)).

Erkrankung	Gen	Quelle
Van-der-Woude-Syndrom	<i>IRF6</i> (autosomal dominant)	Kondo et al. (2002)
Roberts-Syndrom	<i>ESCO2</i> (autosomal rezessiv)	Vega et al. (2005)
Hydrolethalus-Syndrom	<i>HYLS1</i> (autosomal rezessiv)	Mee et al. (2005)
Crouzon-Syndrom	<i>FGFR2</i> (autosomal dominant)	Reardon et al. (1994)
Saethre-Chatzen-Syndrom	<i>TWIST1</i> (autosomal dominant)	el Ghouzzi et al. (1997); Howard et al. (1997)
Kabuki-Syndrom	<i>KMT2D, KDM6A</i> (autosomal dominant)	Ng et al. (2010); Miyake et al. (2013); Van Laarhoven et al. (2015); Carla und Maria (2017)
Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i> (autosomal dominant)	Wilkie et al. (1995)
Frontonasale Dysplasie	<i>ALX1, ALX4</i> (autosomal rezessiv)	Kayserili et al. (2009); Uz et al. (2010); Bertola et al. (2013)

Tabelle 2: Ausgewählte genetische Ursachen nicht-syndromaler Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.

(Quelle: modifiziert nach Dixon et al. (2011)).

<b>Gen</b>	<b>Forschungsstand</b>	<b>Quelle</b>
<i>VAX1</i>	Bestätigt (autosomal rezessiv)	Beaty et al. (2010); Mangold et al. (2010)
<i>IRF6</i>	Bestätigt (autosomal dominant)	Zucchero et al. (2004); Rahimov et al. (2008); Birnbaum et al. (2009)
<i>FGFR2</i>	Kandidatengen (autosomal dominant)	Riley et al. (2007); Riley und Murray (2007); Osoegawa et al. (2008)
<i>MSX1</i>	Kandidatengen (autosomal dominant)	Lidral et al. (1998); van den Boogaard et al. (2000); Jezewski et al. (2003); Vieira et al. (2003); Suzuki et al. (2004); Zucchero et al. (2004)
<i>BMP4</i>	Kandidatengen (autosomal dominant)	Suzuki et al. (2009); Jianyan et al. (2010)
<i>FGF8</i>	Gegenstand weiterer Forschung (autosomal dominant)	Riley et al. (2007); Riley und Murray (2007)
<i>TGFB3</i>	Gegenstand weiterer Forschung (autosomal dominant)	Lidral et al. (1998); Beaty et al. (2002); Vieira et al. (2003); Suazo et al. (2010)
<i>GSTT1</i>	Gegenstand weiterer Forschung (keine Daten über Vererbungsmuster)	Shi et al. (2007)

## **1.2 Phänotypische und genetische Spektren kraniofazialer Malformationen**

Kraniofaziale Fehlbildungen können unterschiedliche phänotypische Züge annehmen. Dabei gibt es verschiedene genetische Ursachen, die den jeweiligen Malformationen zugrunde liegen. Der folgende Abschnitt gibt eine Übersicht über ausgewählte Erkrankungen und Syndrome dieses Spektrums, die in der vorliegenden Arbeit behandelt werden.

### **1.2.1 Unspezifische Kraniosynostosen**

Die Kraniosynostose – auch Kraniosynostose genannt – charakterisiert einen vorzeitigen Verschluss einer oder mehrerer Schädelnähte (Moore et al. 2007). Kraniosynostosen können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden, nämlich in syndromale und nicht-syndromale Kraniosynostosen. Nicht-syndromale Kraniosynostosen betreffen in der Regel nur die Suturen des Kopfes, während bei syndromalen Kraniosynostosen häufig auch das Gesicht, das Skelettsystem oder andere Organsysteme beeinflusst sind (Vlad Ciurea und Toader 2009).

Nach French et al. (1990); Kimonis et al. (2007); Akingbola et al. (2011); Rachwalski et al. (2013) liegt die Inzidenz für eine Kraniosynostose bei etwa 1:2.000 bis 1:3.000. Die Ursache wird bei nicht-syndromalen Kraniosynostosen, die etwa 80% der Fälle ausmachen, als multifaktoriell angenommen. Letztlich ist die Ätiologie von nicht-syndromalen Kraniosynostosen weitestgehend ungeklärt. Der frühzeitige Verschluss der Schädelnähte kann zu Deformationen des Schädels- bzw. der Gesichtsknochen führen. Hier sind nicht nur ästhetische Beeinträchtigungen möglich, auch können die Atmung, das Sehen, das Hören und weitere physiologisch wichtige Eigenschaften beeinträchtigt sein (Rachwalski et al. 2013).



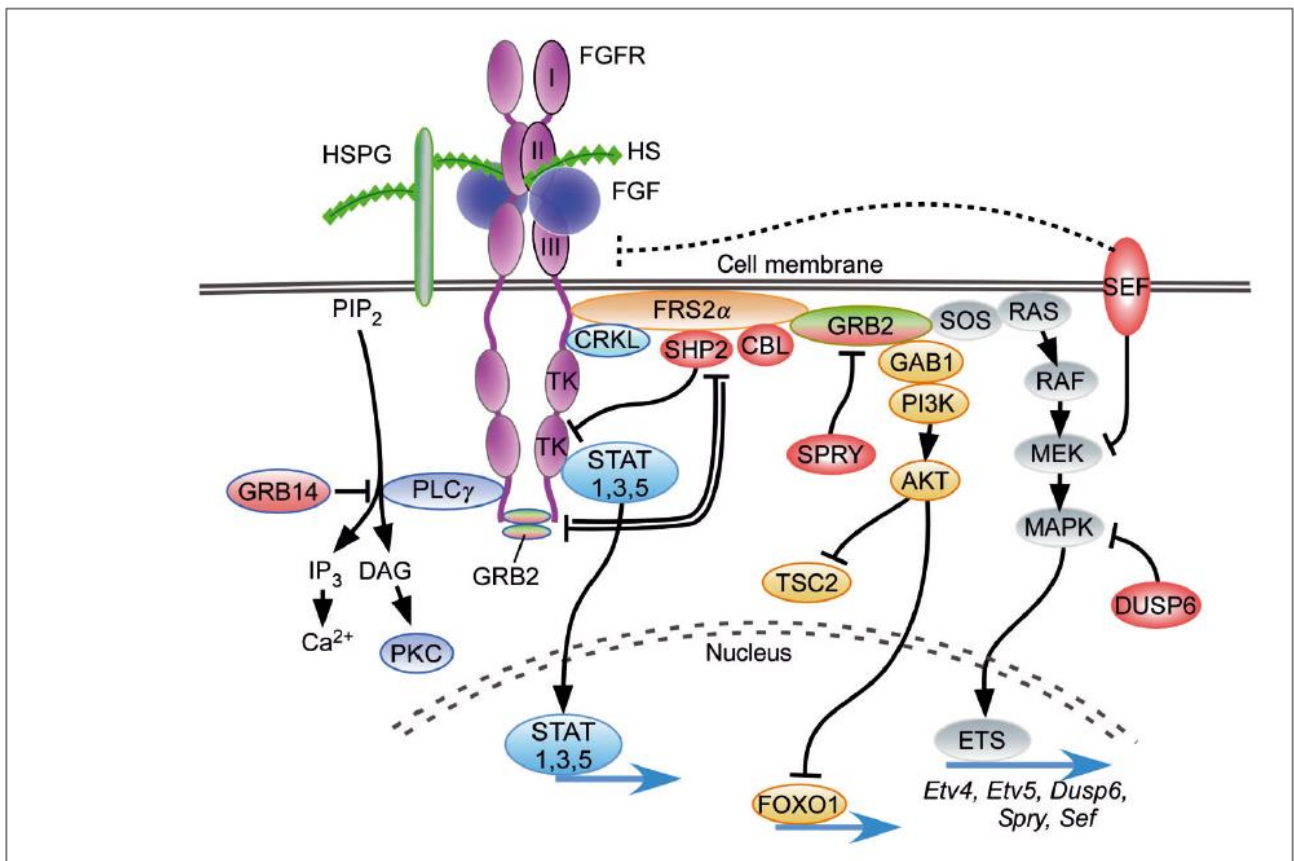


Abbildung 1: FGF-Signalkaskade.

(Quelle: modifiziert nach Ornitz und Itoh (2015)).

In der Pathogenese der Kraniosynostose spielt auf zellulärer Ebene im Rahmen der embryonalen Entwicklung insbesondere die *fibroblast growth factor*-(FGF-)Signalkaskade, eine wichtige Rolle, die für die Entwicklung des Schädels von entscheidender Bedeutung ist (Moosa und Wollnik 2016). Nach Beenken und Mohammadi (2009); Drafa et al. (2010); Teven et al. (2014) sind 18 FGF-Liganden im Säugetier bekannt. Diese können mit unterschiedlichen FGF-Rezeptoren (FGFR) interagieren, die durch die vier unterschiedlichen Gene *FGFR1-4* kodiert werden. Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA kann die Rezeptordiversität erhöht werden. FGFR haben eine strukturelle Ähnlichkeit zur Klasse der Rezeptor-Tyrosinkinase, welche unterschiedliche Signalkaskaden in der Zelle regulieren. Dabei handelt es sich um Transmembran-Rezeptoren, die über ihre extrazellulären Domänen unterschiedliche Liganden binden können. Die Ligandenbindung führt dabei im intrazellulären Teil des Rezeptors zur Dimerisierung der Tyrosinkinase-Domäne, wodurch die Autophosphorylierung von Tyrosinresten in unterschiedlichen Zielproteinen induziert wird, was seinerseits deren Aktivierung hervorruft und somit den Ausgangspunkt verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden darstellt. Hierzu zählen die

*RAS/MAPK*-Signalkaskade, *PI3K/AKT*- und die *PLC $\gamma$* -Signalkaskade (Drafahl et al. 2010; Terven et al. 2014; Ornitz und Itoh 2015), welche unter anderem mit Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder auch Zellapoptose einhergehen und wichtige Signalkaskaden bei der embryonalen Entwicklung des Schädels darstellen (vgl. Abbildung 2). Die Signalkaskaden beeinflussen insbesondere die Wachstumsgeschwindigkeit und Feinabstimmung im Rahmen der Entwicklung des embryonalen Schädels und sind entscheidend für die Verknöcherung der Suturen. Liegt in diesen Signalwegen eine Störung vor, häufig in Form einer *gain-of-function*-Mutation in den *FGFRs*, welche zu einer erhöhten katalytischen Aktivität der Rezeptoren führt, so können verschiedene Erkrankungen bzw. Fehlbildungen aus dem Spektrum der Kraniosynostosen die Folge sein (Belov und Mohammadi 2013; Rachwalski et al. 2013).

Je nachdem welche Sutura frühzeitig verschließt bzw. welche Suturen verschließen, kann der Schädel kompensatorisch in eine andere, nicht regelrechte Richtung wachsen und es entstehen die für Kraniosynostosen typischen Schädeldeformitäten. Die Ausprägungen können verschieden stark und unterschiedlicher Art sein. Wenn sich die *Sutura sagittalis* (Pfeilnaht) vorzeitig verschließt, so wird der Schädel schmal und keilförmig. Dieses Phänomen wird Kahn Schädel (Scaphocephalus) genannt (Moore et al. 2007). Nach Vlad Ciurea und Toader (2009) macht diese Form etwa 40 – 58% der Kraniosynostosen aus. Ein sogenannter Plagiocephalus entsteht, wenn sich die *Sutura coronalis* (Plagiocephalus anterior, 20 – 29% der Kraniosynostosen) oder die *Sutura lambdoidea* (Plagiocephalus posterior, 2 – 4% der Kraniosynostosen) nur auf einer Seite vorzeitig verschließt. In diesen Fällen entwickelt sich der Schädel im weiteren Entwicklungsverlauf asymmetrisch. Verschließt sich die *Sutura Coronalis* (Kranznaht) auf beiden Seiten, so kommt es zur Entstehung eines Brachycephalus (Kurzschädel). Die *Sutura Coronalis* ist bei der Entstehung einer Kraniosynostose nach Vlad Ciurea und Toader (2009) zu 20 – 29% betroffen. Um ausreichend Platz zu haben, kann sich bei entsprechender Beeinträchtigung ein Turricephalus (Turmschädel) entwickeln. Der vorzeitige Verschluss der *Sutura frontalis* (Stirnnaht) kann wiederum zu einem Trionocephalus (Dreieckschädel) führen. Dies betrifft ca. 4 – 10% aller Kraniosynostosen (Moore et al. 2007; Vlad Ciurea und Toader 2009; Zöller 2011). Veranschaulicht werden die möglichen Ausprägungsformen von Kraniosynostosen in Abbildung 3.

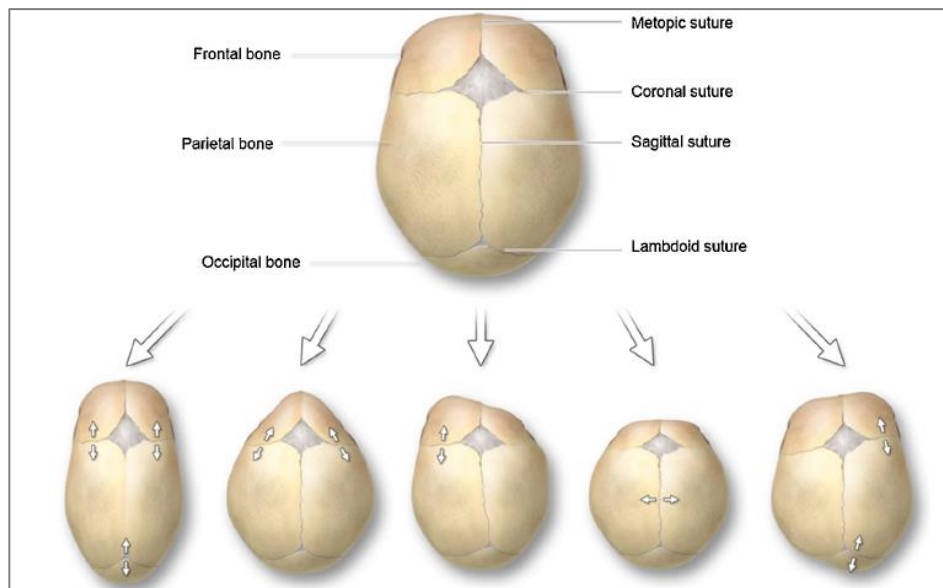


Abbildung 3: Unterschiedliche Formen der Kraniosynostose.

(Quelle: modifiziert nach Moosa und Wollnik (2016)). Oberes Bild: Normocephalus; Untere Reihe von links nach rechts: Scaphocephalus, Trionocephalus, Plagiocephalus anterior, Brachycephalus, Plagiocephalus posterior.

### 1.2.2 Crouzon-Syndrom

Das Crouzon-Syndrom ist eine seltene genetische Erkrankung, welche autosomal dominant vererbt wird (Meyers et al. 1995). Als ursächlich für dieses Syndrom sind in den meisten Fällen dominante, ursächliche Mutationen im *FGFR2*-Gen beschrieben. Selten wird das Syndrom autosomal rezessiv über das *IL1RA*-Gen vererbt (Jabs et al. 1994; Oldridge et al. 1995; Nieminen et al. 2011; Keupp et al. 2013; Rachwalski et al. 2013; Ko 2016). Das Crouzon-Syndrom ist dadurch gekennzeichnet, dass die Schädelnaht oder die Schädelnähte der betroffenen Personen vorzeitig zusammenwachsen und so eine normale Entwicklung des Schädels nicht möglich ist. So sind etwa 5% aller Kraniosynostose-Fälle auf das Crouzon-Syndrom zurückzuführen. Mit den Fehlbildungen des Schädels einhergehen können unter anderem Gesichtsfehlbildungen ebenso wie ein Exophthalmus, Strabismus, Wirbelverwachsungen, Verkalkungen der Stylhoid-Ligamente und weitere Anomalien (Zöller 2011). Je nach Ausprägung der Schädelnahtverschließung kann in seltenen Fällen auch die geistige Entwicklung beeinträchtigt sein (Zöller 2011; Kumar et al. 2013).

Etwa einer von 25.000 Lebendgeborenen ist von diesem Syndrom betroffen. Nach Bowling und Burstein (2006); Kaur et al. (2006); Kumar et al. (2013) sind weder das Geschlecht noch die geographische Herkunft für ein gehäuftes Auftreten des Crouzon-Syndroms ausschlaggebend.

Jones et al. (1975) beschreiben, dass das Alter des Vaters mit dem Auftreten des Crouzon-Syndroms in Verbindung gebracht werden kann. Es wird beschrieben, dass *de novo* Mutationen mit erhöhtem väterlichen Alter assoziiert sind und die Vielzahl der *FGFR*-Mutationen auf dem väterlichen Allel entstehen (Glaser et al. 2000; Martin et al. 2014). Das Crouzon-Syndrom zeigt überlappende Merkmale zu dem Apert-Syndrom, dem Pfeiffer-Syndrom und dem Saethre-Chatzen-Syndrom. Allerdings zeigen sich bei Patienten mit Crouzon-Syndrom in der Regel keine Anomalien an den Extremitäten, die häufig im Zusammenhang mit den übrigen Syndromen dieses Spektrum auftreten (Kumar et al. 2013).

### 1.2.3 Pierre-Robin-Syndrom

Das Pierre-Robin-Syndrom – synonym als Pierre-Robin-Sequenz bekannt – wurde erstmals 1923 von Pierre Robin beschrieben (zur Übersicht Sesenna et al. (2012)). Es ist auch als Syndrom „des ersten Kiemenbogens“ (Moore et al. 2007) bekannt. Ursächlich für das Auftreten des Syndroms soll eine nicht ausreichende Einwanderung von Neuralleistenzellen in den ersten Schlundbogen sein (Moore et al. 2007). Das Pierre-Robin-Syndrom ist durch folgende Symptomtrias gekennzeichnet: Gaumenspalte, Glossoptose (die Zunge ist in den Pharyngealbereich zurückverlagert) und Hypoplasie der Mandibula (Mikrogenie). Diese Symptomtrias kann vor allem zu einer respiratorischen Dysfunktion führen. Deshalb ist es auch Ziel der Behandlung, die Atemwege frei zu machen (Kreiborg et al. 1992; Mantilla-Capacho et al. 2005; Metodiev et al. 2011; Zöllner 2011). Die Inzidenz des Pierre-Robin-Syndroms wird mit 1:8500 angegeben (Bush und Williams 1983). Da die Diagnostik aber bisher nicht immer eindeutig ist, ist diese angenommene Inzidenz fraglich (Tan et al. 2013). Die genetische Ursache des Pierre-Robin-Syndrom ist Gegenstand aktueller Forschung. Es gibt starke Hinweise darauf, dass unter anderem eine Beeinträchtigung der Gene bzw. des nicht kodierenden Bereichs um die Gene *SOX9* bzw. *KCNJ2* ursächlich für das Pierre-Robin-Syndrom ist (Jakobsen et al. 2007; Benko et al. 2009).

### 1.2.4 Saethre-Chatzen-Syndrom

Bei dem Saethre-Chatzen-Syndrom handelt es sich um eine autosomal dominante vererbte Erkrankung. Es wird eine Inzidenz von 1:25.000 – 50.000 bei Lebendgeborenen angegeben (Gripp et al. 2000; Ko 2016). Phänotypisch fallen Saethre-Chatzen-Syndrom-Patienten durch Kraniosynostosen, Syndaktylien, tiefsitzenden Ohren, und weitere Symptome wie zum Beispiel

Hirndrucksteigerung, Atrophie des *Nervus opticus* oder Hörverlust auf. Die Intelligenz kann unter Umständen beeinträchtigt sein (Saethre 1931; Rachwalski et al. 2013). Auf genetischer Ebene sind ursächliche Varianten in den Genen *TWIST1* sowie *TCF12* bekannt, welche zu dem Saethre-Chatzen-Syndrom führen können (Sharma et al. 2013). Eine Abgrenzung zu anderen Syndromen wie zum Beispiel dem Muenke-Syndrom sind schwierig, aber dennoch möglich. Deshalb ist eine gute klinische Untersuchung äußerst wichtig (Rachwalski et al. 2013). *TWIST1* ist dafür verantwortlich, dass sich das Mesenchym im Schädel richtig entwickelt. Dabei wird auch ein Zusammenhang zu *FGFR2* angenommen (El Ghouzzi et al. 1999; Ko 2016). Studien von Shishido et al. (1993) in *Drosophila* legen nahe, dass *TWIST1* die Transkription von *FGFR2* verändert, so dass eine Beeinflussung der *FGFR*-Signalkaskade möglich wäre. Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, hat die *FGF*-Signalkaskade erheblichen Einfluss auf die Entwicklung der Schädelregion. Ein Blick auf die Art der Veränderung in *TWIST1* lässt erkennen, dass Deletionen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für Entwicklungsverzögerung bei betroffenen Patienten einhergeht als andere Mutationen (Kilcoyne et al. 2019).

### 1.2.5 Apert-Syndrom

Beim Apert-Syndrom handelt es sich um eine autosomal dominante Erkrankung. Mutationen treten oft *de novo* auf. Das Apert-Syndrom wurde erstmals vor ca. 100 Jahren beschrieben (zur Übersicht Poggiani et al. (2007)). Phänotypisch tritt das Apert-Syndrom meist mit Kraniosynostosen, Gesichtsdysmorphien, Hypertelorismus, typischen Syndaktylien an Händen (sogenannte Löffelhände) und Füßen sowie diversen Skelett- und Körper-Malformationen, wie zum Beispiel der Fusion von Wirbelkörpern, vor allem der Wirbelkörper C5 und C6, auf. Seltener werden Anomalien der Lunge bzw. Trachea, des Herzens, der Niere oder des Uterus beschrieben (Kreiborg et al. 1992; Mantilla-Capacho et al. 2005; Metodiev et al. 2011; Zöllner 2011). Cohen et al. (1992) geben an, dass das Apert-Syndrom bei ungefähr 15,5:1.000.000 Lebendgeborenen auftritt. Aufgrund der körperlichen Entwicklung kann es auch zu geistigen Fehlewicklungen kommen. Das Apert-Syndrom tritt in der Regel *de novo* auf und wird unter anderem durch paternale Keimzellmosaik getriggert (Ko 2016). Dabei ist das Apert-Syndrom vornehmlich mit zwei Mutationen im *FGFR2*-Gen verknüpft. Es treten die Mutation p.Pro253Arg in 33% und p.Ser252Trp in 66% aller Fälle des Apert-Syndroms auf. Dabei neigt p.Pro253Arg zur Ausprägung von Syndaktylien und p.Ser252Trp zum Entstehen einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (Cohen et al. 1992; Wilkie et al. 1995; Lajeunie et al. 1999; Von Gernet et al. 2000; Michael Cohen Jr. 2011; Agochukwu et al. 2012; Ko 2016)

### 1.2.6 Carpenter-Syndrom

Das Carpenter-Syndrom wurde 1901 erstmalig von George Carpenter beschrieben (zur Übersicht (Twigg et al. 2012)). Das Carpenter-Syndrom kann unter anderem mit Herzfehlbildungen, mentaler Retardierung, Nabelbruch/-Hernie, kraniofazialen Malformationen, Syndaktylien der Extremitäten oder auch erhöhtem Geburtsgewicht einhergehen und wird autosomal rezessiv vererbt (Cohen et al. 1987; Jenkins et al. 2007; Twigg et al. 2012). Das Carpenter-Syndrom wird durch ursächliche Mutationen in *RAB23* hervorgerufen (Jenkins et al. 2007; Haye et al. 2014). Es gibt auch eine überlappende Form, die ähnliche phänotypische Züge wie das Carpenter-Syndrom aufweist. Hierbei gibt es ursächliche Veränderungen in *MEGF8* (Twigg et al. 2012). Engelhard et al. (2013) konnten zeigen, dass *MEGF8* unter anderem eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Herzens, des Skeletts oder auch der Körpersymmetrie übernimmt.

### 1.3 *Next-generation sequencing*

Für Patienten und Familienangehörige ist die Entschlüsselung der genetischen Ursache einer vererbten Erkrankung von herausragender Bedeutung. So beeinflusst die Bestimmung der molekulargenetischen Ursache von Erkrankungen nicht nur mögliche Therapieoptionen, sondern sie ist auch von entscheidender Bedeutung für die genetische Beratung der Betroffenen und ihrer Angehörigen, insbesondere hinsichtlich eines möglichen Wiederholungsrisikos. Auch die molekulare Diagnosestellung bei fehlender klinischer Zuordnung hat eine große Bedeutung. Neben der Testung von bekannten genetischen Veränderungen im Rahmen routinediagnostischer Anwendungen kommt dabei der Entschlüsselung neuer genetischer Komponenten, die ursächlich für genetische Erkrankungen sind, eine wichtige Rolle zu. Dies war bislang äußerst zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Durch die Entwicklung und Etablierung von Methoden aus dem Bereich des *next-generation sequencing* ist es seit über zehn Jahren möglich, große genetische Bereiche parallel oder aber das gesamte menschliche Genom zu sequenzieren und dadurch auf Veränderungen zu untersuchen.

Dabei zeichnen sich *next-generation-sequencing*-basierte Analysemethoden durch eine hohe Flexibilität und im Vergleich zu konventionellen Methoden geringeren Kosten pro analysierter Base aus. So kann, basierend auf der zugrundeliegenden Fragestellung, eine unterschiedlich große Zahl an Genen analysiert werden. Dies kann bis hin zum sogenannten „Exom“ erfolgen, also der Sequenzierung der proteinkodierenden Bereiche aller etwa 19.000 menschlichen Gene. Ebenso ist die Untersuchung des gesamten humanen Erbguts, also aller etwa 3,2 Milliarden Basenpaare, innerhalb weniger Wochen möglich (Markl et al. 2018). Neben Veränderungen auf

Einzelbasen-Ebene können mittels *next-generation sequencing* auch kleinere und größere Insertionen oder Deletionen, CNVs (*copy number variations*; Veränderungen der Kopienzahl) sowie Translokationen detektiert werden.

Eine große Herausforderung stellt die Analyse der generierten genetischen Daten dar. Pro Exom werden durchschnittlich etwa 20.000 Varianten detektiert, die Abweichungen zum humanen Referenzgenom darstellen und hinsichtlich einer möglichen Kausalität und des Einflusses auf das Krankheitsbild beurteilt werden müssen. Eine Filterung dieser Varianten kann basierend auf der Qualität der detektierten Varianten, dem zugrundeliegenden Vererbungsmuster, der Frequenz der Varianten in nicht betroffenen Kontrollkollektiven sowie des Effekts der Varianten auf Proteinebene erfolgen. Die Anwendung dieser Filterkriterien und ihre spezifische Anpassung an den zu untersuchenden Fall ermöglicht die Reduzierung der enormen Variantenzahl auf wenige Hundert, die mittels weiterer Analysen wie zum Beispiel der kopplungsbasierten Strategie, Ko-Segregationsanalysen, Homozygotie-Untersuchungen, *de-novo*-Analysen oder Kandidatengen-Strategien weiter reduziert und gezielt untersucht werden können (Neveling und Hoischen 2012). Diese Flexibilität und die Effizienz *next-generation-sequencing*-basierter Verfahren hat dazu geführt, dass in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer krankheitsverursachender Gene und ursächlicher Varianten identifiziert werden konnten, welche dann in der Praxis im Rahmen routine-diagnostischer Analysen am Patienten untersucht werden können.

#### **1.4 Zielsetzung und Fragestellung**

Krankheiten und deren Ursachen besser zu verstehen, Therapiemöglichkeiten abzuleiten sowie Patienten adäquat beraten und behandeln zu können, sind verschiedene Aufgaben von hoher Relevanz im Bereich der Medizin. Hierzu leistet die Humangenetik einen entscheidenden Beitrag, denn neben zahlreichen äußeren Einflussfaktoren sind es vor allem auch genetische Gegebenheiten, die ein Krankheitsbild mitbestimmen. Diesen Aufgaben widmet sich die vorliegende Arbeit auf verschiedenen Ebenen. Unterschiedliche Krankheiten und Ausprägungsformen sollen anhand von bestehenden und dafür ausgewählten Patientenkollektiven näher betrachtet und in Bezug auf genetische Zusammenhänge analysiert werden. Über verschiedene humangenetische Verfahrensansätze sollen Ursachen entschlüsselt und genetische Zusammenhänge hergestellt sowie Mutationen herausgearbeitet und analysiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte für Patienten mit genetischen Formen nicht-syndromaler Lippen-Kiefer-Gaumenspalten sowie Erkrankungen aus dem Spektrum der Kraniosynostosen die

genetische Ursache mittels neuester *next-generation-sequencing*-basierter Analysemethoden ermittelt und nachfolgend charakterisiert werden. Die vorliegende Arbeit lässt sich dazu in zwei Unterpunkte gliedern:

### 1. Untersuchung eines Patientenkollektivs mit der klinisch bestätigten Diagnose „Kraniosynostose“

Im ersten Teil dieser Arbeit soll ein Patientenkollektiv mit den klinischen Verdachtsdiagnosen aus dem Formenkreis der Kraniosynostosen untersucht und die genetische Ursache der Erkrankung entschlüsselt werden. Dafür stand ein Patientenkollektiv von 32 Patienten und ihrer Angehörigen zur Verfügung, welches die Verdachtsdiagnosen Crouzon-Syndrom, Pierre-Robin-Syndrom, unbestimmte Formen der Kraniosynostosen, Saethre-Chatzen-Syndrom und Apert-Syndrom umfasst. Die Untersuchung sollte initial mittels Sanger-Sequenzierung von *Hotspot*-Mutationen in bekannten genetischen Faktoren erfolgen. Für ausgewählte Fälle, für die auf diesem Wege keine pathogenen Veränderungen identifiziert werden konnten, sollen weitergehende *next-generation-sequencing*-basierte Analysemethoden, wie zum Beispiel Multigen-Panel-Analysen, Mendeliom oder Exomanalysen durchgeführt werden.

Bei einem weiteren Patienten wurden in der Diagnostikabteilung des Instituts für Humangenetik Göttingen zwei Varianten im *MEGF8*-Gen entdeckt, wobei sich bei einer Veränderung um eine intronische Variante handelt. Da Krankheiten im Zusammenhang mit *MEGF8* als autosomal rezessiv beschrieben sind ergibt sich die Frage, ob die zwei Varianten für die Symptomatik des Patienten (unter anderem Kraniosynostose) ursächlich sind oder nicht, weshalb durch Analysen auf cDNA- und genomischer Ebene betrachtet werden soll, ob die jeweiligen Transkripte vorhanden sind oder ob sich hier eine Unregelmäßigkeit ergibt.

### 2. *Next-generation-sequencing*-basierte Analyse von fünf Familien mit nicht-syndromalen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Im zweiten Teil meiner Arbeit soll für fünf Familien mit nicht-syndromalen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten die genetische Ursache der Erkrankung ermittelt werden. Mittels Exomanalysen sollten die genetischen Daten unterschiedlicher betroffener Individuen aus diesen Familien generiert und verglichen werden mit dem Ziel, neue Kandidatengene für nicht-syndromale Lippen-Kiefer-Gaumenspalten zu ermitteln. Identifizierte Varianten sollen mit Hilfe verschiedener Prädiktionsprogramme auf ihren funktionellen Effekt untersucht und mittels Sanger-Sequenzierung auf ihrer Ko-Segregation in den Familien analysiert werden. Für neue, ausgewählte



---

Kandidatengene sollen mittels funktioneller Analysen der Einfluss der identifizierten Varianten auf die Proteinfunktion untersucht und charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmittel

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Fresenius Kabi (Bad Homburg), Sigma-Aldrich (Hamburg), J.T. Baker (Teil von Fisher Scientific, Schwerte) und Merck (Darmstadt) bezogen und, sofern nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität eingesetzt. Zellkultur-Materialien und Plastikwaren wurden von den Firmen Greiner (Solingen), Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht), Nunc (Wiesbaden), Th. Geyer GmbH (Renningen), Sigma-Aldrich (Hamburg) und NIPPON Genetics EUROPE GmbH (Düren) bezogen.

#### 2.1.2 Geräte

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent
3500xL Genetic Analyzer (Sequenzier)	Thermo Fisher Scientific
Autoklav	Thermo Scientific/Integra Bioscience
Chemagic MSM I (DNA-Isolation)	Perkin Elmer
Geldokumentationssystem	Nippon Genetics EUROPE
HiSeq4000 Sequenziergerät	Illumina
Inkubator HERA cell 240	Heraeus
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Mikrowelle	Panasonic
NanoDrop One C	Thermo Fisher Scientific
Präzisionswaage	VWR International
Qubit 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank HeraSafe	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler C1000 und S1000 Touch	BIO RAD Laboratories
Thermomixer compact	Eppendorf AG
Tischzentrifuge Ministar Silverline	VWR International
Vortex Genie 2	Scientific Industries

Gerät	Hersteller
Wasserbad SW22	Julabo
Gefriertruhe (-80°C)	Panasonic
Schwenktisch/Schüttler	VWR
Synergy Mx	BioTek

### 2.1.3. Lösungen, Puffer und Medien

Die Zusammensetzungen sämtlicher verwendeter Puffer und Lösungen sind in Kapitel 2.2 bezogen auf ihre jeweilige experimentelle Verwendung aufgeführt. Alle Puffer und Lösungen werden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt und wurden, sofern nicht anders aufgeführt, bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Tabelle 4: Allgemein genutzte Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH ~ 7,3
Tris/HCl	0,5 – 1,5 M Tris; pH 6,8 – 8,8 mit HCl
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0

### 2.1.4 Enzyme

Tabelle 5: Enzyme.

Enzym	Hersteller
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific
ExoI	New England Biolabs
TSAP	Promega
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
Pfi-Polymerase (Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase)	Thermo Fisher Scientific
Pfu-DNA Polymerase	Promega

### 2.1.5 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 6: Restriktionsendonukleasen.

Restriktionsendonukleasen	Hersteller
EcoRI (FastDigest)	Thermo Fisher Scientific
DpnI	Thermo Fisher Scientific
NotI (FastDigest)	Thermo Fisher Scientific
HindIII (FastDigest)	Thermo Fisher Scientific
KpnI	Thermo Fisher Scientific
BamHI	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.6 Primer/Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg) hergestellt und im lyophilisierten Zustand bezogen. Die Oligonukleotide wurden mittels dH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 pmol/μl (Stammlösung) eingestellt und bei -20°C gelagert. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden Arbeitslösungen von 10 pmol/μl hergestellt und eingesetzt.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')
<i>ABCA4_42_Forward</i>	TACTCACACACCTCTGTGC
<i>ABCA4_42_Reverse</i>	TTCTCATGTGGCTAGTGGAAG
<i>ARHGAP33_20_Forward</i>	AGGAGATGTGCAGCAAGC
<i>ARHGAP33_20_Reverse</i>	AACTGGGCTGGAAGGATG
<i>FGFR1_17+18_Forward</i>	AAGAGTGGGCTTGAGGGG
<i>FGFR1_17+18_Reverse</i>	GACGGACAGGTGGTGGG
<i>FGFR2c_7_Forward</i>	GTGGACAGCCAATAACCT
<i>FGFR2c_7_Reverse</i>	ATCAACACTGGCACAATG
<i>FGFR2c_8c_Forward</i>	TCAGTGTGCTCCGTGTCTC
<i>FGFR2c_8c_Reverse</i>	TAAATGTGAGTGTGGGATCTC
<i>FGFR3_16_Forward</i>	CTCCTGGGTGTGGTTTCT
<i>FGFR3_16_Reverse</i>	ACAGCCACCTCTGTGCC
<i>FGFR3_7_Forward</i>	ATCCGGCAGACGTACAC
<i>FGFR3_7_Forward</i>	TGGACGTGCTGGGTGAG
<i>FGFR3_7_Reverse</i>	GACTTGGCCCCACAAGC

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' -&gt; 3')</b>
<i>FGFR3_7_Reverse</i>	AACCCCTAGACCCAAATCC
<i>GLI1_Ex12_1_FWD</i>	CAGAATAGGCATGGGAGAAG
<i>GLI1_Ex12_1_REV</i>	CTCGCTCCATAAGGCTCAG
<i>GLIPR1L2_Ex5_Forward</i>	AAGTCCAGTTTCTTAACCCG
<i>GLIPR1L2_Ex5_Reverse</i>	AGATGATACTGTGTCAACCATCC
<i>HOXC4_2_Forward</i>	CTGAGGATGGGGTGAGG
<i>HOXC4_2_Reverse</i>	GTCAATTTGTGTGTGAGGGG
<i>HOXC4_4_Forward</i>	GCTTGATGACTTTATTTCACC
<i>HOXC4_4_Reverse</i>	CTGACAAGGGACAAGGTGAG
<i>LETM1_Exon1_FWD</i>	GCCTCTGTCAGCCGTCC
<i>LETM1_Exon1_REV</i>	CCTAAGGTCACAACACACGG
<i>M13 Primer Forward</i>	CAGGAAACAGCTATGAC
<i>M13 Primer Reverse</i>	GTAAAACGACGGCCAG
<i>MEGF8_DNA_Ex14f</i>	TCTCAGGATCTAAGGAGCTC
<i>MEGF8_DNA_Ex14r</i>	AGAGTTAAGGAGTCCGAGG
<i>MEGF8_Ex11_f</i>	CTGGGCTGGTGCGTGC
<i>MEGF8_EX12_f</i>	AGCAGATCTCAGGCACTGT
<i>MEGF8_EX12f_neu</i>	GTCACCCAGAGCTTCCTG
<i>MEGF8_Ex13r</i>	GCTGCCTCCTGGCACAC
<i>MEGF8_Ex14_r</i>	ACAGCCCTGGTCTGCCA
<i>MEGF8_Ex14r_neu</i>	AGCCAGGCAGGAAGAATA
<i>MEGF8_Ex15_r</i>	GCTGGTGCTCTGATGCC
<i>MEGF8_Ex2_3f</i>	TTCCTCAGGCAAGATGCTG
<i>MEGF8_Ex27_28_f</i>	CCACAGGTCTCTATGGTCA
<i>MEGF8_Ex29_f</i>	CGTATGAGGAATGTGCGTG
<i>MEGF8_Ex3_4r</i>	CAGGGGCGAGGCGCA
<i>MEGF8_Ex31_r</i>	AGGGGTCAGGGGGCAG
<i>MEGF8_Ex32_33_r</i>	GGGGGTGGACGCCTC
<i>MEGF8-Exon31-fwd</i>	TGAAGAGGGTTAGGATTGGG
<i>MEGF8-Exon31-rev</i>	ATAATCCAGAAGAGCGGGAG
<i>mID3-prom-BamHI-rev</i>	GGAACCGGATCCAGCGCCTTCATGTTG- GAGAGTAGAGAT

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' -&gt; 3')</b>
<i>mID3-prom-KpnI-fwd-2</i>	GGAACCGGTACCTTTGGTTCTATGTAT-GCCCGTGGA
<i>mID3-prom-Seq1</i>	CTTCTGCAATCTCAGCGCC
<i>mID3-prom-Seq2</i>	GCCTCTCCTCGGTATCAG
<i>NEDD4L_9_Forward</i>	GGGAATTTACTCAAATGTGGC
<i>NEDD4L_9_Reverse</i>	TACCACACCACCATCTGCTC
<i>PAX7-NotI-Flag-R (inkl. Flag-Tag)</i>	GGAACCGCGGCCGCTTACT-TATCGTCGTCATCCTTGTAATCG-TAGGCCTGGCCAGTTTCCAC
<i>PAX 7 NotI-Flag-rev-n (inkl. Flag-Tag)</i>	CCGCGGCCGCTTACTTATCGTCGTCA-TCCTTGTAATCGGTGAACTGTT-CCATCTGGCT
<i>PAX6_12_Forward</i>	TACCAACCAATTCCACAACC
<i>PAX6_12_Reverse</i>	ACTGTCTCCGACTTGACTGG
<i>PAX7_1000</i>	TGCACCAGGGCGGGCT
<i>PAX7_1000rev</i>	AGCCCGCCCTGGTGCA
<i>PAX7_500</i>	AATCAAGTTCGGGAAGAAAGAG
<i>PAX7_500rev</i>	TCCTCCTCCTCTTTCTTCC
<i>PAX7_EX2_Forward</i>	ATTGCTGTCTGAGGTCTTGG
<i>PAX7_EX2_Reverse</i>	GGGAGTAGAAGACACCCTCC
<i>PAX7_ins_fwd</i>	GACCGAAGCACTGTGCCCTCAGGTT-TAGTGAGTTCGATTAGCCGCG
<i>PAX7_ins_rev</i>	CGCGGCTAATCGAACTCACTAAACCT-GAGGGCACAGTGCTTCGGTC
<i>PAX7_Mut_F</i>	GACAGCTGTGTGTCTCCAC
<i>PAX7_Mut_F_länger</i>	CAGCTGTGTGTCTCCACGGCTGCGTC
<i>PAX7_Mut_R</i>	GTGGGAGACACACAGCTGTC
<i>PAX7_Mut_R_länger</i>	AGACACACAGCTGTCGGGAGATGACAC
<i>PAX7-HindIII-F</i>	GGAACCAAGCTTATGGCGGCCCTT-CCCGGCAC
<i>TG_Ex_9_1_Forward</i>	GGTTTCAAACGTAGGTGTCC
<i>TG_Ex_9_1_Reverse</i>	ATTTGAGGGCATTTTGGTTC

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' -&gt; 3')</b>
<i>TMTC2_Ex_3_2_Forward</i>	ACTGGACTCCTTCTCCTTGC
<i>TMTC2_Ex_3_2_Reverse</i>	AAGAATGAAAGATACAGGTACTGC
<i>TWIST_1F</i>	CCGTCCGTCCTCCTGCTC
<i>TWIST_1R</i>	AAATCGAGGTGGACTGGGAAC
<i>TWIST1_Ex1_1_F</i>	ATCCACACCGTCCCCTC
<i>TWIST1_Ex1_1_R</i>	GTTCAGCGACTGGGTGC
<i>TWIST1_Ex1_2_F</i>	AAGAAGTCTGCGGGCTG
<i>TWIST1_Ex1_2_R</i>	GAGCGGAGAGTGGGAGAG
<i>TWIST1_F1a</i>	GGGAAGCTGGCGGGCTGAGGC
<i>TWIST1_R1a</i>	TGGACTGGGAACCGCGGCCTG
<i>ZNF655_7_Forward</i>	GTCAAACATCACAACCTTGCAAG
<i>ZNF655_7_Reverse</i>	CTCGAGACCTCAGGTGATC

### 2.1.7 Kits

Tabelle 8: Kits.

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Total RNA Kit, peqGOLD	Peqlab
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
NucleoSpin® Plasmid Transfection-grade	MACHEREY-NAGEL
QIAGEN Multiplex PCR Kit	QIAGEN
NucleoSpin® gDNA Clean-up Kit	Macherey-Nagel
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega GmbH

### 2.1.8 Vektoren

Tabelle 9: Vektoren.

Plasmid	Hersteller
pcDNA™3.1 (+) Mammalian Expression Vector	Thermo Fisher Scientific
pGL3 -basic	Promega GmbH
pGL3-control	Promega GmbH
pRL-TK	Promega GmbH

### 2.1.9 Bakterien

Tabelle 10: Bakterien.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung
TOP10F'	F-[lacIq Tn10 (TetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Amplifikation von Plasmiden



### 2.1.10 Zelllinien

Tabelle 11: Zelllinien.

Zelllinie	Merkmale/Referenz
HeLa	Hierbei handelt es sich um eine abgeleitete Zelllinie aus einem Zervixkarzinom. Benannt wurde diese nach einer 31-jährigen Patientin namens Henrietta Lacks, von der die Zelllinien-Probe stammt. Die Patientin verstarb im Jahr 1951 (Callaway 2013; Sigma-Aldrich 2020b).
HEK293T	Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie aus embryonalen Nierenzellen. HEK steht für <i>Human Embryo Kidney</i> . Die Zelllinie kann für wissenschaftliche Zwecke erworben werden (Sigma-Aldrich 2020a).

### 2.1.11 Datenbanken, Online-Tools und verwendete Software

Tabelle 12: Datenbanken, Online-Tools und verwendete Software.

Bezeichnung	Link
Blast	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Clustal Omega	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
ExAC	<a href="http://exac.broadinstitute.org/">http://exac.broadinstitute.org/</a>
FinchTV	<a href="https://finchtv.software.informer.com/1.4/">https://finchtv.software.informer.com/1.4/</a>
Genome aggregation database	<a href="https://gnomad.broadinstitute.org/">https://gnomad.broadinstitute.org/</a>
Human Gene Mutation Database	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php">http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php</a>
Human Splicing Finder	<a href="http://www.umd.be/HSF3/">http://www.umd.be/HSF3/</a>
Microsoft Office 365 ProPlus	<a href="https://www.microsoft.com/de-de">https://www.microsoft.com/de-de</a>
Microsoft Windows 10	<a href="https://www.microsoft.com/de-de">https://www.microsoft.com/de-de</a>
Microsoft Windows 7 Ultimate	<a href="https://www.microsoft.com/de-de">https://www.microsoft.com/de-de</a>
Mutationtaster	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>

Bezeichnung	Link
National Centre for Biotechnology Information	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Online Mendelian Inheritance in Man	<a href="https://omim.org/">https://omim.org/</a>
PolyPhen-2	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
RCSB Protein Data Bank	<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>
Sequence Pilot	jsi medical systems GmbH
SIFT	<a href="https://sift.bii.a-star.edu.sg/">https://sift.bii.a-star.edu.sg/</a>
UCSC Genome Browser	<a href="https://genome.ucsc.edu/">https://genome.ucsc.edu/</a>
Uniprot	<a href="https://www.uniprot.org/">https://www.uniprot.org/</a>
Varbank	<a href="https://varbank.ccg.uni-koeln.de/">https://varbank.ccg.uni-koeln.de/</a>
Zotero	<a href="https://www.zotero.org/">https://www.zotero.org/</a>

### 2.1.12 Patientenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden molekulargenetische Untersuchungen von *Hotspot*-Mutationen an DNA-Proben von insgesamt 32 Patienten und ihren Angehörigen mit Verdacht auf eine syndromale Kraniosynostose analysiert. Die Rekrutierung sowie die klinische Diagnostik der Patienten erfolgte über Dr. Krzysztof Dowgierd (Department of Maxillofacial, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Children's Hospital, Olsztyn, Polen). Eine verwendete Probe stammt aus dem Institut für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen) und wurde zuvor im Rahmen routinediagnostischer Untersuchungen analysiert.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit molekulargenetische Untersuchungen an verschiedenen Familien, welche eine isolierte (nicht-syndromale) Form der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte aufweisen, durchgeführt. Die klinische Diagnose und die Rekrutierung der Familien (Familien LKG8, LKG11, LKG12 und LKG21) erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Dr. Schliephake (Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Göttingen) sowie Dr. Abhilash Pasare Ravindranath (Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Oxford Dental College, Bangalore, Indien). Eine weitere Familie mit einer isolierten, nicht-syndromalen Form der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Rachwalski (Department of Maxillofacial and Plastic Surgery, National Reference Center for Cleft Lip and

Palate, Hopital Universitaire Necker-Enfants Malades, Paris, Frankreich) sowie Dr. Dr. Jürgen Lichtensteiner (MKG-Chirurgie, Uniklinik Kiel) rekrutiert (Familie LKG-Kamerun).

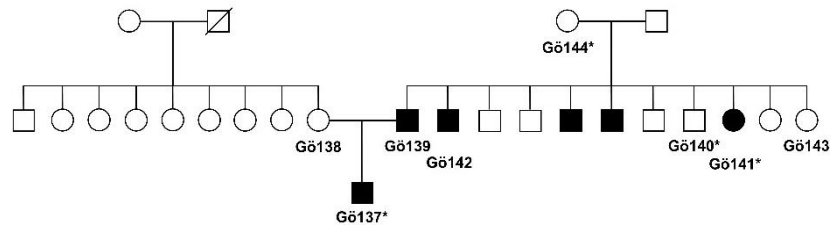


Abbildung 4: Stammbaum der Familie LKG8 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

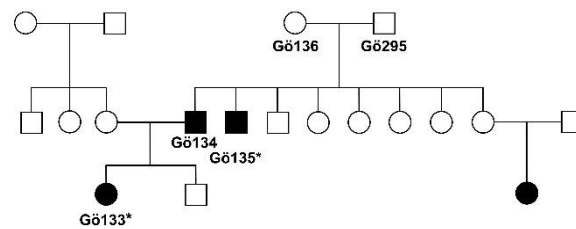


Abbildung 5: Stammbaum der Familie LKG11 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

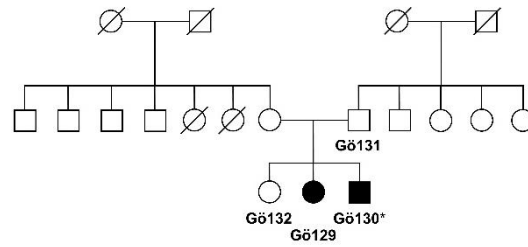


Abbildung 6: Stammbaum der Familie LKG12 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

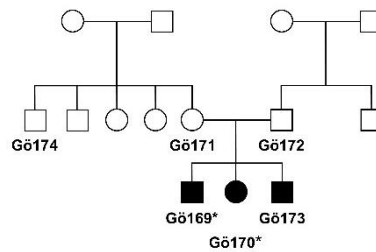


Abbildung 7: Stammbaum der Familie LKG21 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

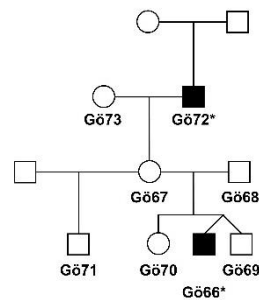


Abbildung 8: Stammbaum der Familie LKG-Kamerun mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

Die EDTA-Blutproben der Patienten, ihrer Eltern sowie Angehörigen wurden entnommen und zusammen mit deren Einverständnis zugesandt. Aus den erhaltenen EDTA-Blutproben wurde die genomische DNA aus peripheren Blutlymphozyten isoliert und bis zur molekulargenetischen Analyse bei  $-18^{\circ}\text{C}$  asserviert.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1 Isolierung von DNA/RNA aus Blut**

Bei allen Patienten wurden mittels venöser Punktionen EDTA-Blutproben gewonnen. In einem Standardverfahren wurde anhand dieser am Institut für Humangenetik Göttingen aus den Lymphozyten die DNA gewonnen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels des Chemagic MSM I (PerkinElmer) und die Proben wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Gewinnung von RNA aus peripherem Blut erfolgte mit Hilfe des PAXgene® Blood RNA Systems (PreAnalytix). Dazu wurde eine Blutprobe des jeweiligen Patienten unter Verwendung spezieller PAXgene-Monovetten abgenommen, für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert und anschließend unter Verwendung des Gesamt-RNA Kits, peqGOLD nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das RNA Kit, peqGOLD (Peqlab) verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangabe verfahren und die isolierte Gesamt-RNA entweder direkt für weitere Untersuchungen eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.3 Erststrang-cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA**

Die reverse Transkription und Erststrang-cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA, die aus humanen peripheren Lymphozyten oder eukaryotischen Zelllinien isoliert wurde, erfolgte mit dem Re-

vertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Für die Erststrangsynthese wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt und die reverse Transkription erfolgte mittels Oligo (dT)-Primer nach den Angaben des Herstellers. Jeweils 2 µl dieses cDNA-Ansatzes wurden nachfolgend pro PCR-Reaktion eingesetzt.

#### **2.2.4 Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrads von Nukleinsäure**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte spektralphotometrisch mit Hilfe des NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific). Dazu wurde 1 µl einer DNA-/RNA-Lösung eingesetzt. Nach initialer Null-Eichung des Geräts mittels einer geeigneten Referenzlösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm die Konzentration der DNA-/RNA-Lösung bestimmt. Die Bestimmung des Reinheitsgrades der Lösungen wurde durch die simultane Messung der Absorptionen bei 230 nm (Detektion organischer Substanzen) sowie 280 nm (Detektion von Proteinen und Phenolen) ermittelt.

#### **2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur selektiven Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte und bildet die Basis für die *in vitro* Analyse der Nukleotidabfolge eines DNA-Abschnitts. Grundlage der PCR bilden thermostabile, DNA-abhängige Polymerasen, die mittels spezifischer Oligonukleotidprimer, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, durch die Verknüpfung einzelner Desoxynukleotide komplementäre einzelsträngige DNA-Moleküle synthetisieren. Bei der PCR handelt es sich um eine zyklische Reaktion, bei der sich die drei Grundprozesse Denaturierung, Hybridisierung und Elongation mehrfach wiederholen.

Im ersten Schritt eines jeden Zyklus, der Denaturierung, wird das Reaktionsgemisch für drei Minuten auf 94°C erhitzt. Dadurch denaturiert der DNA-Doppelstrang, was bedeutet, dass sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basenpaaren lösen und zwei komplementäre Einzelstränge entstehen. Diese Einzelstränge dienen nachfolgend als Vorlage für die weitere Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes.

Im zweiten Schritt, dem Annealing (Hybridisierung), wird die Temperatur auf 50 – 65°C herabgesetzt, um die Anlagerung der Oligonukleotide (Primer) an ihre komplementären Bereiche in den DNA-Einzelsträngen zu gewährleisten. Die genaue Hybridisierungstemperatur ergibt sich dabei aus der Länge der Oligonukleotide sowie ihrer Basenzusammensetzung.

Im letzten Schritt eines PCR-Zyklus, der Elongation, findet die Synthese des komplementären DNA-Stranges statt. Dieser Schritt wird in der Regel bei 72°C durchgeführt, kann allerdings, je nach verwendeter DNA-Polymerase, auch bei abweichender Temperatur durchgeführt werden. Die Elongationszeit wird durch die Länge des zu amplifizierenden Abschnitts bestimmt und ist darüber hinaus ebenfalls abhängig von der Syntheserate der verwendeten Polymerase.

Dieser PCR-Zyklus wird 25- bis 35-mal wiederholt, wobei sich in jedem Schritt eines PCR-Zyklus die Menge des spezifischen PCR-Produkts verdoppelt. Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die verwendeten DNA-Polymerasen sowie ihre spezifischen Eigenschaften. In Tabelle 14 ist die Zusammensetzung der PCR-Ansätze für verschiedenen Polymerasen dargestellt.

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Polymerasen.

Polymerase	Syntheserate	Annealing-Temperatur	Anwendung
Taq-Polymerase	2,5 kb/min	72°C	Standard-PCR
Pfi-Polymerase	2 kb/min	72°C	Klonierungen, Mutagenesen
HotStarTaq-Polymerase	2 – 4 kb/min	72°C	Standard-PCR

Tabelle 14: Zusammensetzung der PCR-Ansätze in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase.

	Taq-Polymerase	Pfi-Polymerase	HotStarTaq-Polymerase
DNA (20 ng/µl)	2 µl	2 µl	2 µl
Puffer (10 x)	2,5 µl	5 µl	5 µl*
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 µl	-	-
dNTPs (je 10 mM)	4 µl	8 µl	-
Fwd-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Rev-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Polymerase	0,3 µl	0,5 µl	-
DNA (20 ng/µl)	2 µl	2 µl	2 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 25 µl	ad 50 µl	ad 20 µl

\*enthält zusätzlich dNTPs, MgCl<sub>2</sub> sowie die HotStarTaq-Polymerase.

In Tabelle 15 sind die PCR-Programme für unterschiedliche Polymerasen und Ansätze zusammengefasst. Die Annealing-Temperatur (X) sowie die Elongationszeit (Y) wurden für jede PCR in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der verwendeten Primer, der Größe des Amplicons sowie der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase zuvor separat berechnet. Alle PCRs wurden mit *Touch down*-Programmen durchgeführt. Bei diesem Vorgehen wird die Annealing-Temperatur im Laufe der PCR schrittweise gesenkt, was dazu führt, dass initial aufgrund der stringenteren Bedingungen hochspezifisch die gewünschten DNA-Abschnitte amplifiziert werden und keine unspezifischen Nebenprodukte entstehen. In späteren Zyklen wird dann die Annealing-Temperatur herabgesetzt und somit eine hohe Amplifikation der initial angereicherten Matrizen gewährleistet.

Tabelle 15: PCR-Programme für unterschiedliche Polymerasen.

	Taq-Polymerase		Pfi-Polymerase		HotStarTaq-Polymerase	
	°C	Zeit (min)	°C	Zeit (min)	°C	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	95	30 – 35	3	30 – 35	95	15
Denaturierung	95	0.5	95	0.5	95	0.5
Annealing	X+4	0.5	X+4	0.5	X+4	0.5
Elongation	72	Y	72	Y	72	Y
Zyklenzahl	3		3		3	
Denaturierung	95	0.5	95	0.5	95	0.5
Annealing	X+2	0.5	X+4	0.5	X+4	0.5
Elongation	72	Y	72	Y	72	Y
Zyklenzahl	3		3		3	
Denaturierung	95	0.5	95	0.5	95	0.5
Annelaling	X	0.5	X	0.5	X	0.5
Elongation	72	Y	72	Y	72	Y
Zyklenzahl	30 – 35		30 – 35		30 – 35	
Finale Elongation	72	10	72	10	72	10
Reaktionsstopp	4	10	4	10	4	10



### 2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten auf der Grundlage ihrer Größe dar. DNA-Fragmente, welche aufgrund ihres anionisch vorliegenden Phosphats des Zucker-Phosphat-Rückgrates eine negative Gesamtladung aufweisen, wandern in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1%ige oder 1,5%ige Agarose-Gele verwendet. Für ein 1,5%iges Gel wurden 2,25 g Agarose mit 150 ml TBE vermischt und bis zum vollständigen Lösen der Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurden 7,5 µl des Farbstoffs Gel-Red hinzugegeben, per Schütteln des Reaktionsgefäßes gut miteinander gemischt und das Gemisch zum Aushärten auf einen Gelträger mit einem entsprechenden Kamm gegossen. Bei Gel-Red handelt es sich um einen Farbstoff, welcher sich an die DNA anlagert und somit die Visualisierung einzelner DNA-Fragmente ermöglicht. Das flüssige Gel wurde nachfolgend bis zum vollständigen Aushärten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 5 µl des zu untersuchenden PCR-Produktes zur Beschwerung der Probe mit 1 µl 6x Ladepuffer versetzt und gemischt. Das Gemisch wurde nachfolgend in eine Tasche des Gels pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer mit TBE-Puffer befüllten Elektrophorese-Kammer (Tabelle 16). Zur Beurteilung der Größe der einzelnen DNA-Fragmente des PCR-Produktes wurde zusätzlich ein Größenstandard aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 140 Volt für eine Dauer von 25 – 45 Minuten und die aufgetrennten Banden wurden nachfolgend mittels eines LED-Transilluminators visualisiert und das Ergebnis dokumentiert.

Tabelle 16: Verwendete Puffer zur Gelelektrophorese.

Puffer	Reagenzien
10x TBE-Puffer	1 M Tris, 0,9 M Borsäure, 0,01 M EDTA; pH 8.0
6x Ladepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.03 % Bromphenolblau, 0.03 % Xylen- cyanol; 60 mM EDTA; 60 % Glycerol

### 2.2.7 Enzymatische Aufreinigung von PCR-Produkten mittels ExoI/TSAP-Verdau

Die Aufreinigung von PCR-Produkten, die einer Sanger-Sequenzierreaktion zugeführt werden sollen, ist ein notwendiger Schritt, um überschüssige Primer und Nukleotide zu entfernen, die zuvor für die PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Ihre Entfernung ist notwendig, da sie ansonsten die Sequenzierreaktion beeinflussen können. Die enzymatische Aufreinigung wurde mittels Inkubation der PCR-Produkte mit Exonuklease I (ExoI), einem Enzym, welches freie DNA-Einzelstränge zwischen der 5`Phosphatgruppe und der 3`Hydroxylgruppe des benachbarten Nukleotids hydrolytisch spaltet, und der thermosensitiven alkalischen Phosphatase (TSAP), die die Phosphatgruppe am 5`Ende freier Nukleotide entfernt, durchgeführt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammensetzung eines ExoI/TSAP-Ansatzes zur Aufreinigung von PCR-Produkten.

Komponente	Volumen
dH <sub>2</sub> O	1,625 µl
TSAP	0,3 µl
ExoI	0,075 µl
PCR-Produkt	8 µl

Anschließend wurde der Reaktionsansatz zunächst für 20 min bei 37 °C und nachfolgend für 15 min bei 85°C inkubiert und, basierend auf der Menge des ursprünglich eingesetzten PCR-Produkts mit 10 – 50 µl dH<sub>2</sub>O versetzt. 0,5 µl dieser Verdünnung wurden zur Sequenzierreaktion eingesetzt.

### 2.2.8 Sanger-Sequenzierung

Die Bestimmung der genauen Basenabfolge von DNA-Abschnitten erfolgte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977). Bei diesem Verfahren wird im Gegensatz zu einer konventionellen PCR nur ein Oligonukleotid eingesetzt, wodurch eine lineare Amplifikation der Ziel-DNA, ausgehend von einer Seite der eingesetzten DNA, erfolgt. Zusätzlich werden bei der Sequenzreaktion nach Sanger neben dNTPs auch Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt, die ihrerseits mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Der Einbau eines ddNTP

führt zu einem Abbruch der Kettenverlängerung, da ddNTP aufgrund ihrer fehlenden 3'-Hydroxygruppe nicht in der Lage sind eine Bindung zu einem weiteren Nukleotid einzugehen. Der Einbau von ddNTPs anstelle dNTPs erfolgt zufällig und resultiert in der Synthese von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge. Diese Fragmente werden nachfolgend mittels Kapilarelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt. Die Fluoreszenzfarbstoffe der eingebauten ddNTPs werden dabei angeregt und die emittierten Fluoreszenzen detektiert. Jedes der vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) ist dabei mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, dessen Detektion die Bestimmung des zuletzt eingebauten ddNTPs erlaubt. Die Zusammensetzung der Sequenzierreaktion ist nachfolgend in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes.

Komponente	Volumen
dH <sub>2</sub> O	6,75 µl
Puffer V3.1 (5x)	2,25 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	0,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Big Dye-Mix V3.1	0,25 µl

Die Proben wurden anschließend mit folgenden PCR-Programm amplifiziert (Tabelle 19).

Tabelle 19: PCR-Programm zur Sanger-Sequenzierung.

	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	96°C	30 s
Denaturierung	96°C	10 s
Annealing	55°C	5 s
Elongation	60°C	4 min
Zykluszahl	40x	
Reaktionsstopp	10°C	5 min

Die Proben wurden nachfolgend mit 10 µl dH<sub>2</sub>O versetzt, über eine Sephadex-Säule zur Entfernung vorhandener Salzionen und nicht verbrauchter, mit Fluoreszenzfarbstoff markierter ddNTPs aufgereinigt und mittels eines 3500xl Genetic Analyzer analysiert.

### 2.2.9 Multigen-Panel-Analyse

Bei zwei Patienten mit einer diagnostizierten Kraniosynostose wurde mittels *next-generation-sequencing*-basierter Technologie ein erkrankungsspezifisches Multigen-Panel analysiert. Die Sequenzierung wurde in der Molekulargenetischen Diagnostik des Instituts für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt. Die Multigen-Panel-Analyse ermöglicht die parallele Anreicherung und Analyse einer großen Anzahl an Genen in einem einzelnen Reaktionsansatz. Mittels des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten CRANIO-QXT-Panels kann die Untersuchung auf Punktmutationen und kleinen Insertionen/Deletionen in den kodierenden Bereichen (einschließlich der Exon/Intron-Übergänge) von 29 Genen (Tabelle 20) durchgeführt werden.

Tabelle 20: Übersicht der Gene, die mittels des CRANIO-QXT-Panels untersucht wurden.

<i>ADAMTS10</i>	<i>FGFR3</i>	<i>MNI</i>	<i>SKI</i>
<i>ALX1</i>	<i>GLI3</i>	<i>P4HB</i>	<i>SMO</i>
<i>ALX3</i>	<i>IFT122</i>	<i>POR</i>	<i>TWIST1</i>
<i>ALX4</i>	<i>IFT43</i>	<i>RAB23</i>	<i>WDR19</i>
<i>EFNB1</i>	<i>IL11RA</i>	<i>RECQL4</i>	<i>WDR35</i>
<i>ERF</i>	<i>LRP2</i>	<i>RUNX2</i>	<i>ZIC</i>
<i>FGFR1</i>	<i>MEGF8</i>	<i>SEC24D</i>	<i>ZIC1</i>
<i>FGFR2</i>			

Die Multigen-Panel-Analyse wurde mittels des SureSelect<sup>QXT</sup> Anreicherungsverfahrens der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Dazu wurden die kodierenden Bereiche der 29 Gene aus genomischer DNA angereichert, amplifiziert und mittels *next-generation-sequencing*-Technologie mit dem Illumina MiSeq-System sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden nachfolgend mit der Sequence Pilot Software (jsi medical systems GmbH) ausgewertet und zur Detektion von Sequenzvarianten mit der jeweiligen Referenzsequenz der erfassten Gene verglichen.

### 2.2.10 Exomsequenzierung

Im Gegensatz zur Multigen-Panel-Analyse handelt es sich bei der Exomsequenzierung (*whole-exome sequencing*, WES) um eine Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung, die die parallele Sequenzanalyse der proteinkodierenden Bereiche aller etwa 19.000 humanen Gene in einem Reaktionsansatz ermöglicht (Shendure und Ji 2008; Illumina, Inc. 2019). Die Exomsequenzierung lässt sich dabei in drei Schritte unterteilen. In einem ersten Schritt wird die genomische DNA des Patienten zunächst definiert fragmentiert. Dies kann enzymatisch, mittels Transposasen oder Restriktionsendonukleasen, oder mechanisch erfolgen. An diese DNA-Fragmente werden anschließend Adapter ligiert, die Sequenzabschnitte enthalten, welche komplementäre Bereiche zu den später verwendeten Sequenzierprimern sowie den Oligonukleotid-Sequenzen auf der Oberfläche der Fließzelle (*flow cell*) enthalten, auf der die Sequenzierreaktion stattfindet. Zusätzlich sind in diesen Adaptern Sequenzen eingebracht, die individuelle Patienten- und Proben-spezifische Indizes erhalten, und so eine Zuordnung der generierten Sequenzinformation zu einem Patienten ermöglichen. Nach Amplifikation dieser so erstellten DNA-Bibliothek erfolgt anschließend im zweiten Schritt die Anreicherung der Zielsequenzen (*target enrichment*). Dieses erfolgt mittels Hybridisierung der DNA-Bibliothek mit einzelsträngigen, Biotin-markierten DNA-Sonden, die komplementär zu den exomischen Zielsequenzen sind. Über Streptavidin-markierte, magnetische *beads* können nachfolgend diese Biotin-markierten DNA-Sonden inklusive der exomischen Zielsequenzen aufgereinigt und von nicht-hybridisierten DNA-Fragmenten getrennt werden. Der dritte Schritt ist die Sequenzierung, die nach dem *sequencing-by-synthesis* Verfahren erfolgt. Dabei wird zunächst die DNA-Bibliothek auf die Fließzelle gegeben und mittels eines weiteren Amplifikationsschrittes, der sogenannten *bridge amplification*, klonal amplifiziert. Die so entstandenen DNA-Cluster bilden den Ausgangspunkt für die Sequenzierung, die nach dem *paired-end* Verfahren durchgeführt wird, bei der die DNA-Fragmente von beiden Enden her sequenziert werden, wodurch eine hohe Genauigkeit der DNA-Sequenzierung gewährleistet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Exomsequenzierungen mit genomischen DNAs von insgesamt elf Patienten durchgeführt. Die Exomsequenzierungen erfolgten dabei in Zusammenarbeit mit dem *Cologne Center for Genomics* (CCG, Universität zu Köln). Dazu wurden mit Hilfe des SureSelectXT-Verfahrens (Agilent Technologies) die kodierenden Bereiche aller humanen Gene inklusive der Exon-/Intron-Übergänge mittels des Agilent Human All Exon V6-Anreicherungskits angereichert, amplifiziert und nachfolgend auf einem HiSeq4000 Sequenziergerät (Illumina) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden nachfolgend mittels der Exom- und Genomanalysesoftware Varbank (v2.24, CCG, Univer-

sität zu Köln) ausgewertet und zur Detektion von Sequenzvarianten mit der jeweiligen Referenzsequenz der erfassten Gene verglichen. Im Institut für Humangenetik der Universität Göttingen kommt das Verfahren *sequencing-by-synthesis* von Illumina zu tragen. Diese Methode bietet die Möglichkeit des *massively parallel sequencing*. Dabei können das komplette Genom, Exom, Mendeliom oder auch einzelne Abschnitte der DNA dargestellt werden. Kurz zusammengefasst wird die zu untersuchende Probe in einzelsträngige Fragmente aufgebrochen. An diese Fragmente werden Adapter angebracht. Die angebrachten Adapter sind dabei komplementär zu Adaptern auf einem *Flow Cell* (glasähnlicher Objektträger) und binden an diesen Objektträger. Hier findet die eigentliche Sequenzierungsreaktion statt. Durch die sogenannte *Bridge Amplification* werden klonale Cluster von DNA-Abschnitten generiert. Ausgehend vom einzelsträngigen Fragment wird der komplementäre Strang generiert. Dabei kommen fluoreszierende Nukleotide zum Einsatz. Diese können erkannt und so die Basenabfolge bestimmt werden. Da diese Reaktion millionenfach und parallel stattfindet, können enorme Mengen an Daten generiert werden. In einem späteren Schritt können die einzelnen Fragmente anhand von beispielsweise einem Referenzgenom wieder in die richtige Reihenfolge gebracht werden (Shendure und Ji 2008; Illumina, Inc. 2019).

### 2.2.11 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen ermöglichen die sequenzspezifische, hydrolytische Spaltung von DNA. Dabei werden je nach verwendeter Restriktionsendonuklease spezifische, palindromische Tetra- bis Oktamersequenzen erkannt und nachfolgend der DNA-Doppelstrang innerhalb oder in Nähe dieser Erkennungssequenz gespalten. Die Spaltung der DNA kann dabei glatt erfolgen (Generierung von *blunt end* Fragmenten) oder es können Nukleotidüberhänge generiert werden (*sticky ends*). Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 6 (vgl. Kapitel 2.1.5) zusammengefasst und wurden gemäß den Herstellerangaben in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Ein Standardansatz für einen Restriktionsverdau ist in Tabelle 21 angegeben.

Tabelle 21: Standard-Ansatz eines Restriktionsverdaus.

Komponente	Volumen
DNA (1 – 5 $\mu\text{g}$ )	x $\mu\text{l}$
Enzym (10 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
Puffer (10x)	2 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	add 20 $\mu\text{l}$

### 2.2.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung und Trennung von Restriktionsendonuklease-verdauter DNA wurde der gesamte Ansatz des Restriktionsverdaus auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Das gewünschte Produkt wurde anhand seiner Größe identifiziert und nachfolgend mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus dem Gelfragment erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction-Kits (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben und die DNA wurde abschließend in 20 – 50  $\mu\text{l}$  eluiert.

### 2.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation eines DNA-Fragments (Insert) mit einem linearisierten Vektor wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet. Die Fragmente, welche kloniert werden sollten, wurden dazu zuvor mit jeweils den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, so dass komplementäre Überhänge in den Insert- und Vektorfragmenten vorhanden waren. Im Zuge der Ligationsreaktion wurden diese komplementären Enden durch die Ligase miteinander verbunden, was zur Bildung eines zirkulären Vektors führt. Das Verhältnis der eingesetzten Mengen von Insert zu Vektor betrug dabei etwa 3:1, wobei die Menge der jeweiligen Komponenten anhand der Bandenintensität unter Berücksichtigung der jeweiligen Größe der Fragmente in Zuge einer zuvor durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese bestimmt wurde. Ein Standard-Ansatz für einen Ligationreaktion ist in Tabelle 22 angegeben.

Tabelle 22: Standard-Ansatz einer Ligationsreaktion.

Komponente	Volumen
Vektor, linearisiert	x $\mu\text{l}$
Insert, linearisiert	y $\mu\text{l}$
Puffer (10x)	1 $\mu\text{l}$
T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	add 10 $\mu\text{l}$

Die Ligationsreaktion wurde für mindestens eine Stunde bei 22°C inkubiert. Parallel zum Ligationsansatz wurde zusätzlich ein Kontrollansatz hergestellt, der mit Ausnahme des Inserts alle Komponenten des Ligationsansatzes enthielt und als interne Negativkontrolle diente. Alle Reaktionsansätze wurden nachfolgend direkt für die Transformation kompetenter Bakterien (vgl. Kapitel 2.2.16) eingesetzt.

#### 2.2.14 TOPO Klonierung von DNA-Fragmenten

Die TOPO Klonierung ermöglicht eine direkte Insertion von DNA-Fragmenten mit beliebigen Enden in den pCR®4Blunt-Topo-Vektor (Invitrogen), ohne dass ein vorhergehender Restriktionsverdau erforderlich ist. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit das Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Für die TOPO Klonierung wurden zuvor aufgereinigte, lineare DNA-Fragmente (vgl. Kapitel 2.2.12) und PCR-Produkte eingesetzt. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Ein Standard-Ansatz für eine TOPO Klonierung ist in Tabelle 23 angegeben.

Tabelle 23: Standard-Ansatz einer TOPO Klonierung.

Komponente	Volumen
DNA-Fragment/PCR-Produkt	4 $\mu\text{l}$
<i>salt solution</i> (Puffer)	1 $\mu\text{l}$
TOPO Vektor	1 $\mu\text{l}$

Der Reaktionsansatz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt für die Transformation kompetenter Bakterien (vgl. Kapitel 2.2.16) eingesetzt.



### 2.2.15 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* TOP10F<sup>-</sup>-Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* TOP10F<sup>-</sup>-Bakterien wurde 5 ml LB-Medium mit *E. coli* TOP10F<sup>-</sup>-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 900 µl dieser Kultur wurden zum Animpfen von 150 ml LB-Medium verwendet und die Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0.45 – 0.55 über Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach bei 2.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml TFB I Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert, nachfolgend zentrifugiert und das Pellet anschließend in 6 ml eiskaltem TFB II Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in 50 µl Aliquots mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Ansätze werden wie in der nachfolgenden Tabelle 24 aufgeführt, hergestellt.

Tabelle 24: Benötigte Reaktionsansätze zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* TOP10F<sup>-</sup>-Bakterien.

Medium/Puffer	Reagenzien/Vorgehen
LB-Medium	10 g Pepton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen; autoklavieren; 4°C
TFB I Puffer	50 mM MnCl <sub>2</sub>
	100 mM KCl
	10 mM CaCl <sub>2</sub>
	30 mM KOAc
	15 % (v/v) Glycerin
	pH mit HOAc auf 6,1 einstellen; sterilfiltrieren; 4°C
TFB II Puffer	75 mM CaCl <sub>2</sub>
	10 mM KCl
	10 mM MOPS
	15 % (v/v) Glycerin
	pH mit KOH auf 7,0 einstellen; sterilfiltrieren; 4°C

### 2.2.16 Transformation kompetenter *E. coli* TOP10F<sup>-</sup>-Bakterien

Unter Transformation versteht man die natürliche Aufnahme von Fremd-DNA in eine Bakterienzelle. Dieses Prinzip wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um künstlich hergestellte Vektoren in transformationskompetente Bakterien einzubringen und diese Vektoren dadurch *in vivo* zu vervielfältigen.

Zur Transformation wurden 50 µl kompetenter *E. coli* TOP10F<sup>-</sup> Bakterien mit 10 µl eines Ligations-Ansatzes (vgl. Kapitel 2.2.13) oder 6 µl eines TOPO Klonierungsansatzes (vgl. Kapitel 2.2.14) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden. Anschließend wurde der Ansatz für zwei bis fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Es wurden 200 µl LB-Medium hinzugegeben und nachfolgend für 30 – 45 Minuten bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Abschließend wurde die Bakteriensuspension auf einer Agarplatte ausgestrichen, welche mit einem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin, Kanamycin) versetzt war, und über Nacht bei 37°C inkubiert (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Herstellung von LB-Agarplatten.

Medium	Reagenzien/Vorgehen
LB-Agarplatten	20 g Select Agar auf 1.000 ml LB-Medium autoklavieren und auf etwa 60 °C abkühlen lassen. Zugabe von 50 – 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 – 50 µg/ml Kanamycin, Lagerung mit Parafilm versiegelt bei 4 °C.

### 2.2.17 Übernachtskultur

Zur Herstellung von Bakterienkulturen wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (50 – 100 µg/ml Ampicillin/30 – 50 µg/ml Kanamycin) versetzt und mit einer einzelnen Bakterienkolonie oder einer Bakteriensuspension angeimpft. Anschließend wurde die Suspension über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

### 2.2.18 Plasmidpräparation (MiniPrep)

Die Aufreinigung und Isolierung von Plasmid-DNA im kleineren Maßstab wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) und des NucleoSpin® Plasmid Transfection-grade Mini Kits (Macherey-Nagel) durchgeführt. Dazu wurden 1,5 ml einer Bakterienkultur verwendet. Es

wurde nach Herstellerangabe verfahren. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten Plasmide (vgl. Kapitel 2.2.4) bestimmt und die Plasmide wurden bei Bedarf direkt für die Sequenzanalysen (vgl. Kapitel 2.2.8) eingesetzt.

### 2.2.19 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob einzelne Bakterienkolonien, die auf Agarplatten gewachsen sind, die gewünschten Konstrukte und Plasmide erfolgreich aufgenommen haben, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Bei dieser PCR wurde als *template* keine reine DNA, sondern ein Bakterienklon eingesetzt. Dazu wurde zunächst eine einzelne Bakterienkolonie mittels einer sterilen Impföse von einer Agarplatte entnommen und in 20  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O resuspendiert. 5  $\mu\text{l}$  dieser Bakteriensuspension wurden dann in einer Standard-PCR-Reaktion anstelle des DNA *templates* eingesetzt. Als Primer wurden in dieser PCR Oligonukleotide verwendet, die im jeweiligen Vektor nach einer erfolgreichen Ligation/TOPO Klonierung das eingebrachte Insert flankieren. Anhand der Größe des entstandenen PCR-Produkts konnte dann nachfolgend abgeschätzt werden, ob das Insert erfolgreich in den Zielvektor eingebracht werden konnte. Ein Standard-Ansatz für eine Kolonie-PCR ist in Tabelle 26 angegeben.

Tabelle 26: Standard-Ansatz einer Kolonie-PCR.

Komponente	Volumen
Bakteriensuspension	5 $\mu\text{l}$
Puffer (10 x)	2,5 $\mu\text{l}$
M13 Forward Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
M13 Reverse Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase	1 $\mu\text{l}$
dNTPs (je 10 mM)	4 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	add 25 $\mu\text{l}$

### 2.2.20 Zielgerichtete Mutagenese-PCR

Bei der zielgerichteten Mutagenese-PCR werden im Gegensatz zur herkömmlichen PCR Oligonukleotide verwendet, die nicht vollständig komplementär zur Matrizen-DNA sind, sondern an den gewünschten Nukleotidpositionen die spezifischen Veränderungen (Insertion/Deletion, Substitution) tragen. Die Mutagenese erfolgte im Rahmen dieser Arbeit auf Plasmid-DNA mit

Hilfe von Oligonukleotiden, in denen die gewünschte Mutation mittig zur ansonsten komplementären Sequenz platziert war. Ein Standard-Ansatz für eine Mutagenese-PCR ist in Tabelle 27 angegeben.

Tabelle 27: Standard-Ansatz einer Mutagenese-PCR.

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA (100 – 500 ng)	1 $\mu$ l
Puffer (10 x)	5 $\mu$ l
Mutagenese Primer fwd (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Mutagenese Primer rev (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Pfi-Polymerase	1 $\mu$ l
dNTPs (je 10 mM)	8 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	add 50 $\mu$ l

Parallel zum Mutageneseansatz wurde ein zweiter Reaktionsansatz pipettiert, der mit Ausnahme der Polymerase alle Komponenten des Mutageneseansatzes enthielt und als interne Negativkontrolle diente. Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurden 5  $\mu$ l der Reaktionsansätze auf ein Agarosegel aufgetragen. Im Falle einer erfolgreichen Mutagenese-PCR wurden die Reaktionsansätze zum Verdau der methylierten Template-Plasmid-DNA mit der Endonuklease DpnI versetzt, für mindesten zwei Stunden bei 37°C inkubiert und nachfolgend direkt für die Transformation kompetenter TOP10F'-Bakterien eingesetzt (vgl. Kapitel 2.2.16).

### 2.2.21 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Ist diese Fremd-DNA nur für eine begrenzte Zeit in den Zellen vorhanden, spricht man von einer transienten Transfektion. Die Transfektion ermöglicht die Expression von Genen und die Untersuchung der zellulären Effekte der kodierten Genprodukte in den Zielzellen. Das Einbringen der Fremd-DNA kann dabei durch unterschiedliche Methoden wie Elektroporation, Lipofektion oder durch virale Genfähren erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen mittels der Transfektionsreagenzien FuGENE HD (Promega) transfiziert. Dazu wurden HEK293T- oder HeLa-Zellen einen Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa eine Konfluenz von 70 % erreichten. Die Komponenten eines Transfektionsansatzes

(siehe Tabelle 28) wurden anschließend zusammengegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 28: Standard-Transfektionsansatz (24-well-Maßstab) mittels FuGENE HD.

Komponente	Volumen
Optimem	40µl
FuGENE HD	1,2 µl
DNA	0,3 µg

Parallel dazu wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz vorsichtig und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion entweder zur Isolierung der Gesamtproteine lysiert oder zu funktionellen Analysen mittels Luciferase Reporter Assays (vgl. Kapitel 2.2.22) eingesetzt.

### 2.2.22 Luciferase Reporter Assay

Die funktionelle Analyse einer Mutation im Transkriptionsfaktor *PAX7*, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurde, erfolgte mittels des Luciferase Reporter Assays. Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit das Dual-Luciferase Assay System Kit (Promega) verwendet. Dieses basiert auf der Firefly- und Renilla-Luciferase, deren Aktivitäten innerhalb eines Reaktionsansatzes parallel ermittelt werden können. Luciferasen sind Enzyme, die die Oxidation von Luciferine zu energiereichen Dioxetanen oder Dioxetanonen katalysieren (Oxidation). Diese Verbindungen sind instabil und setzen bei ihrem Zerfall Biolumineszenz frei, die mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden kann. Die Firefly-Luciferase ist ein Enzym, welches aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* stammt, während die Renilla-Luciferase ursprünglich aus der Seefeder *Renilla reniformis* kommt. Das in dieser Arbeit verwendete Firefly-Luciferase-Reporter-Konstrukt enthält die Promotorregion des murinen *Id3*-Gens, eines natürlichen Zielpromotors des *PAX7*-Transkriptionsfaktors. Die parallel verwendeten Expressionskonstrukte für humanes wildtypisches und mutiertes *PAX7* führen im Falle einer Bindung an den *Id3*-Promotor zur Transkription und somit zur Expression der Firefly-Luciferase, deren Aktivität nachfolgend luminometrisch gemessen werden.

Dazu wurden HeLa-Zellen in 24-well Platten ausgesät und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von etwa 70 % mit wildtypischen oder mutanten *PAX7*-Expressionskonstrukten sowie

dem *Id3*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt und dem Expressionskonstrukt der Renilla-Luciferase co-transfiziert. Alle Transfektionen wurden im Triplikate durchgeführt und die Zusammensetzung der einzelnen Transfektionsansätze ist in der Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Transfektionsansatz zur funktionellen Analyse der *PAX7*-Mutation.

Vektoren	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5
pcDNA3.1 <i>lac Z</i>	-	150 ng	-	-	-
pGL3-basic [ <i>luc+</i> ]	150 ng	-	-	-	
pGL3-basic- <i>Id3</i> [ <i>luc+</i> ]	-	150 ng	150 ng	150 ng	150 ng
pcDNA3 <i>PAX7</i> WT	150 ng	-	150 ng	-	-
pcDNA3 <i>PAX7</i> Arg77Cys	-	-	-	150 ng	-
pcDNA3 <i>PAX7</i> Ala259 Val	-	-	-	-	150 ng
pRL-TK [ <i>Rluc</i> ]	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
transfizierte Gesamt-DNA	310 ng	310 ng	310 ng	310 ng	310 ng

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Dazu wurde der vorhandene Überstand abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit etwa 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl des im Kit erhaltenen *Passive-Lysis*-Puffer lysiert. Die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert, nachfolgend bei -80°C über Nacht eingefroren und bis zur Messung bei -80°C gelagert. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Synergy Mx Microplate Readers (BioTek). Die hergestellten Zelllysate wurden zunächst auf Eis aufgetaut und 50 µl jedes Lysats wurden für die Messung in 96-well Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Substrate und Puffer für die Aktivitätsmessung der Firefly-Luciferase (LAR II) und der Renilla-Luciferase (Stop & Glow) wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und die Injektoren des Luminometers mit diesen befüllt. Mit Start der Messung wurden automatisch 100 µl der Puffer nacheinander durch die Injektoren zugegeben und jeweils die Aktivität der Luciferasen sequenziell gemessen. Die Bestimmung der relativen Aktivität des Firefly-Luciferase-Reporter-Gen-Konstruktes erfolgte durch Normalisierung der Messergebnisse für die Firefly-Luciferase mit den Messwerten der Renilla-Luciferase, wodurch Schwankungen in der Gesamtzellzahl sowie der Transfektionseffizienz ausgeglichen und berücksichtigt wurden. Pro Experiment wurden alle in Tabelle 29 angegebenen Ansätze im Triplikate durchgeführt und der gesamte Versuchsablauf wurde insgesamt vier Mal unabhängig voneinander wiederholt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mutationsanalyse bei Patienten mit klinisch diagnostizierter syndromaler oder isolierter Kraniosynostose

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben von 32 nicht miteinander verwandten Patienten untersucht, bei denen eine syndromale oder isolierte Form der Kraniosynostose diagnostiziert wurde. Bei den Patienten handelt es sich um betroffene Einzelpatienten klinisch unauffälliger Eltern, weitere betroffene Familienmitglieder wurden nicht beschrieben (vgl. Tabelle 30) und auch nicht analysiert. Zur Bestimmung der genetischen Ursache der Erkrankung wurden initial bereits beschriebene *Hotspot*-Mutationen in bekannten Kraniosynostose-Genen mittels molekulargenetischer Methoden untersucht.

Tabelle 30: Zusammensetzung des molekulargenetisch charakterisierten Kraniosynostose-Patientenkollektivs.

Erkrankung	OMIM Referenz	Anzahl der Patienten
Apert-Syndrom	101200	11
Crouzon-Syndrom	123500	9
Pierre-Robin-Syndrom	261800	1
Saethre-Chotzen-Syndrom	101400	4
isolierte Kraniosynostose	keine Angabe	7

##### 3.1.1 Identifizierung von *Hotspot*-Mutationen in bekannten Kraniosynostose-assoziierten Genen

In einem ersten Schritt wurde das Patientenkollektiv auf bekannte *Hotspot*-Mutationen in den Genen *FGFR2*, *FGFR3* und *TWIST1* untersucht. Die Mutationsanalyse erfolgte dabei durch Amplifikation des entsprechenden Exons mittels PCR, der enzymatischen Aufreinigung der erhaltenen PCR-Produkte sowie der Sanger-Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte. Das Ergebnis dieser Mutationsanalyse ist in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tabelle 31: Übersicht über die getesteten *Hotspot*-Regionen, die Anzahl der getesteten Patienten sowie die identifizierten Varianten.

Gen	Exon	Anzahl getesteter Patienten	Patienten mit Mutationen
<i>FGFR2</i>	7	32	13
<i>FGFR2</i>	8	30	4
<i>FGFR3</i>	7	13	-
<i>TWIST1</i>	1	4	1

Insgesamt wurden bei 18 von 32 untersuchten Patienten (56,3 %) heterozygote dominante Sequenzveränderungen in den untersuchten, proteinkodierenden Bereichen der Gene *FGFR2*, *FGFR3* und *TWIST1* gefunden, die als ursächlich eingeschätzt wurden. Die Aufklärungsrate war dabei stark von der initialen klinischen Verdachtsdiagnose abhängig und variierte zwischen 100 % (11/11 Patienten bei mit Verdacht auf Apert-Syndrom) und 0 % (0/7 Patienten mit der klinischen Diagnose einer isolierten Kraniosynostose) (Tabelle 32).

Tabelle 32: Übersicht über die Anzahl der identifizierten ursächlichen Varianten aufgeschlüsselt nach der initialen klinischen Verdachtsdiagnose.

Erkrankung	Anzahl getesteter Patienten	Patienten mit Mutationen	
		absolut	[%]
Apert-Syndrom	11	11	100
Crouzon-Syndrom	9	6	66,6
Pierre-Robin-Syndrom	1	0	0
Saethre-Chatzen-Syndrom	4	1	25
isolierte Kraniosynostose	7	0	0

Tabelle 33 gibt eine Übersicht über die identifizierten Mutationen in *FGFR2* und *TWIST1* bei den 18 Patienten. Bei den gefundenen Mutationen in *FGFR2* handelt es sich um bereits zuvor in der Literatur beschriebene Mutationen. Die Mutation in *TWIST1* ist erstmalig im Rahmen dieser Arbeit identifiziert worden.



Tabelle 33: Übersicht aller identifizierten Mutationen.

Patient	Verdachtsdiagnose	Gen	Exon	Mutation		Vererbung	bekannt
				cDNA	Proteinebene		
K4084	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.755C>G	p.Ser252Trp	<i>de novo</i>	ja
K4089	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.755C>G	p.Ser252Trp	<i>de novo</i>	ja
K4092	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.755C>G	p.Ser252Trp	<i>de novo</i>	ja
K4100	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.758C>G	p.Pro253Arg	?	ja
Gö190	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.755C>G	p.Ser252Trp	<i>de novo</i>	ja
Gö230	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.755C>G	p.Ser252Trp	<i>de novo</i>	ja
Gö233	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.755C>G	p.Ser252Trp	<i>de novo</i>	ja
Gö236	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.758C>G	p.Pro253Arg	?	ja
Gö243	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.755C>G	p.Ser252Trp	?	ja
Gö464	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.758C>G	p.Pro253Arg	<i>de novo</i>	ja
Gö470	Apert-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.758C>G	p.Pro253Arg	<i>de novo</i>	ja
K4020	Crouzon-Syndrom	<i>FGFR2</i>	8	c.1025G>T	p.Cys342Phe	?	ja
K4038	Crouzon-Syndrom	<i>FGFR2</i>	8	c.1052C>G	p.Ser351Cys	<i>de novo</i>	ja
K4102	Crouzon-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.868T>G	p.Trp290Gly	<i>de novo</i>	ja
Gö193	Crouzon-Syndrom	<i>FGFR2</i>	7	c.833G>T	p.Cys278Phe	<i>de novo</i>	ja
Gö467	Crouzon-Syndrom	<i>FGFR2</i>	8	c.1026C>G	p.Cys342Trp	paternal	ja
Gö473	Crouzon-Syndrom	<i>FGFR2</i>	8	c.1025G>A	p.Cys342Tyr	?	ja
Gö238	Saethre-Chatzen-Syndrom	<i>TWIST1</i>	1	c.80_92del	p.Gln27Profs *94	<i>de novo</i>	neu

Die identifizierten ursächlichen Varianten wurden nachfolgend in einem zweiten, unabhängigen Sequenzier-Ansatz bestätigt und auf ihre Segregation in entsprechenden Familien hin überprüft. Für 5/18 Proben lagen keine elterlichen DNA-Proben oder DNA-Proben nur eines Elternteils vor, so dass die Segregationsanalyse nur unvollständig durchgeführt werden konnte (vgl. Tabelle 33, markiert mit „?“). In den 13/18 Fällen, in denen beide elterlichen Proben vorlagen, konnte für 12 Proben gezeigt werden, dass die bei den Patienten identifizierten Mutationen höchst wahrscheinlich *de novo* entstanden sind (Tabelle 33). Die Mutationen konnten in

diesen Fällen also nicht in den elterlichen DNA-Proben nachgewiesen werden. Für eine Probe, Gö467, konnte gezeigt werden, dass die Mutation c.1026C>G/p.Cys342Trp in *FGFR2* von dem initial als klinisch unauffällig beschriebenen Vater vererbt wurde. Eine nachfolgende klinische Reevaluation des Vaters ergab, dass dieser ebenfalls mild betroffen war, die identifizierte *FGFR2*-Variante in der Familie also mit der Erkrankung ko-segregiert. Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen sowie der Ko-Segregationanalyse für die identifizierten Mutationen sind in Abbildung 9, Abbildung 10 und Abbildung 11 für jede identifizierte Mutation exemplarisch zusammengefasst.

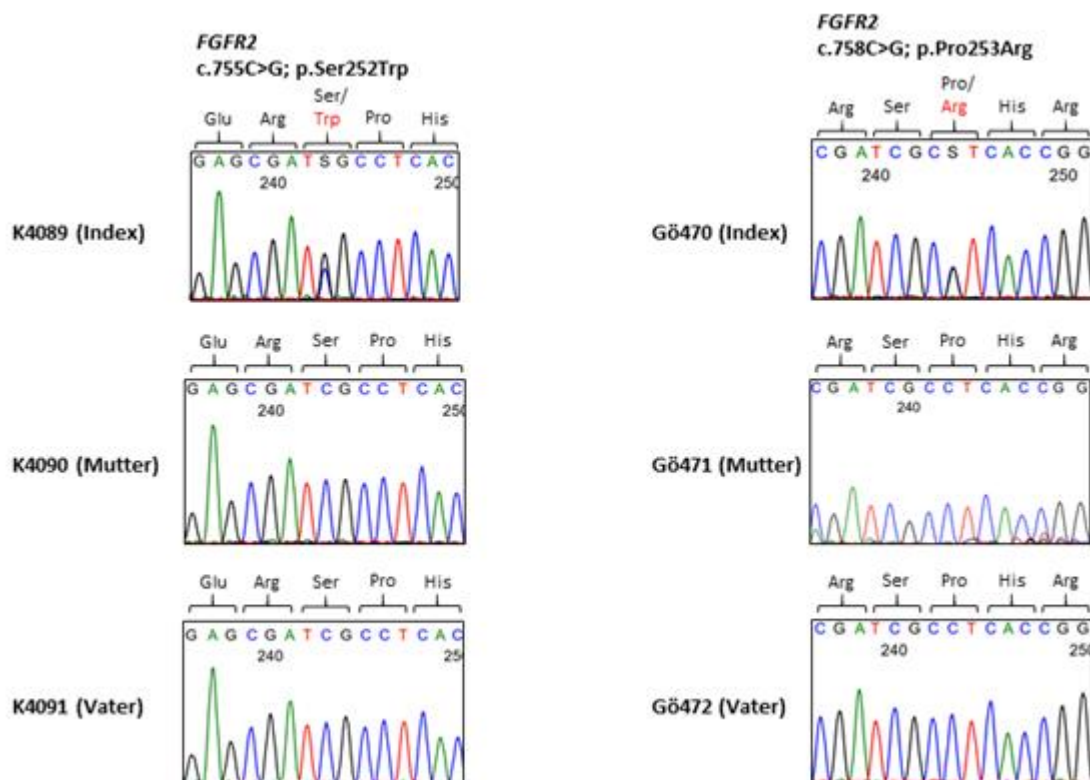


Abbildung 9: Elektropherogramme der identifizierten *FGFR2*-Mutationen in Patienten mit der Verdachtsdiagnose Apert-Syndrom.

Die oberen Elektropherogramme zeigen die heterozygoten Mutationen c.755C>G/p.Ser252Trp (links) bzw. c.758C>G/p.Pro253Arg (rechts) in *FGFR2*, die in den Patienten gefunden wurden. Die mittlere Elektropherogramme zeigen die Ergebnisse der Sequenzierungen an maternaler DNA, die unteren der Sequenzierung an paternaler DNA. Die Mutationen wurden insgesamt bei sieben (c.755C>G/p.Ser252Trp) bzw. vier (c.758C>G/p.Pro253Arg) Patienten mit Apert-Syndrom identifiziert.

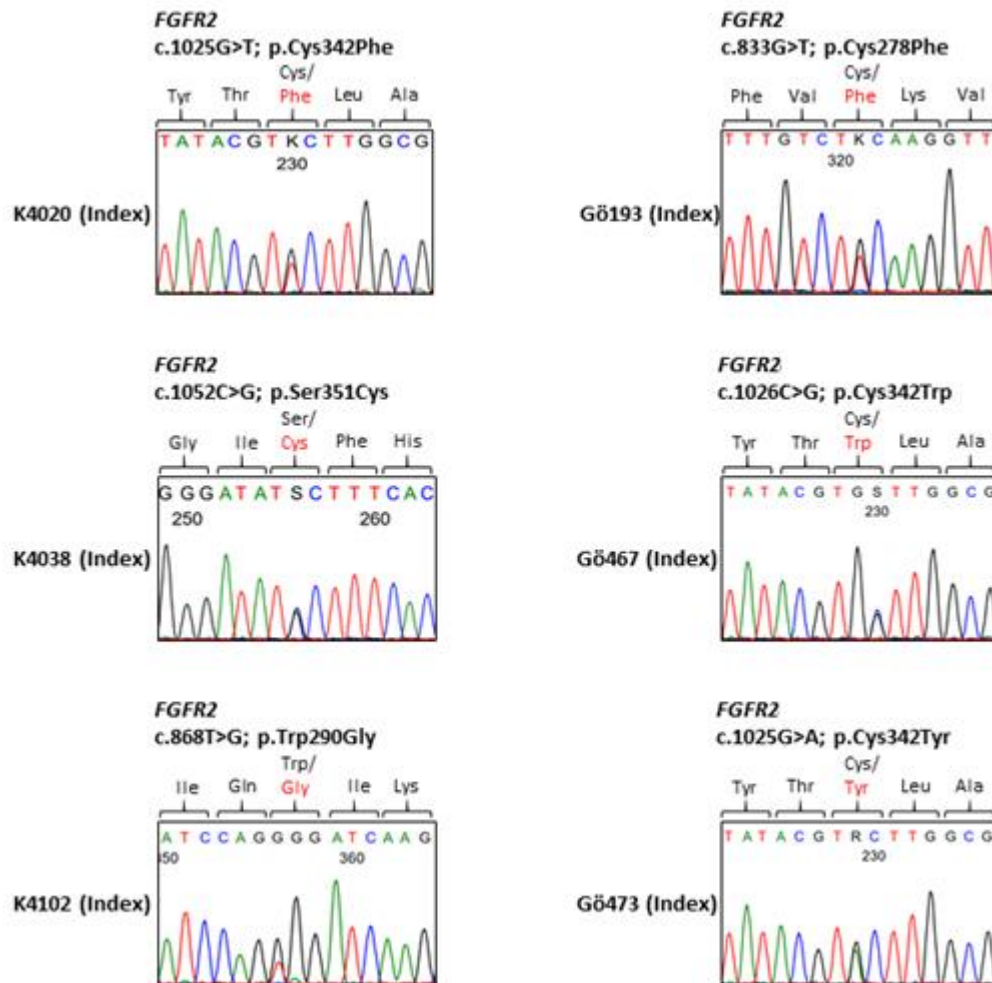


Abbildung 10: Elektropherogramme der identifizierten *FGFR2*-Mutationen in Patienten mit der Verdachtsdiagnose Crouzon-Syndrom.

Die Elektropherogramme zeigen die sechs unterschiedlichen, heterozygote Mutationen c.833G>T/p.Cys278Phe; c.868T>G/p.Trp290Gly; c.1025G>T/p.Cys342Phe; c.1025G>A/p.Cys342Tyr; c.1026C>G/p.Cys342Trp und c.1052C>G/p.Ser351Cys in *FGFR2*, die in den Patienten gefunden wurden.

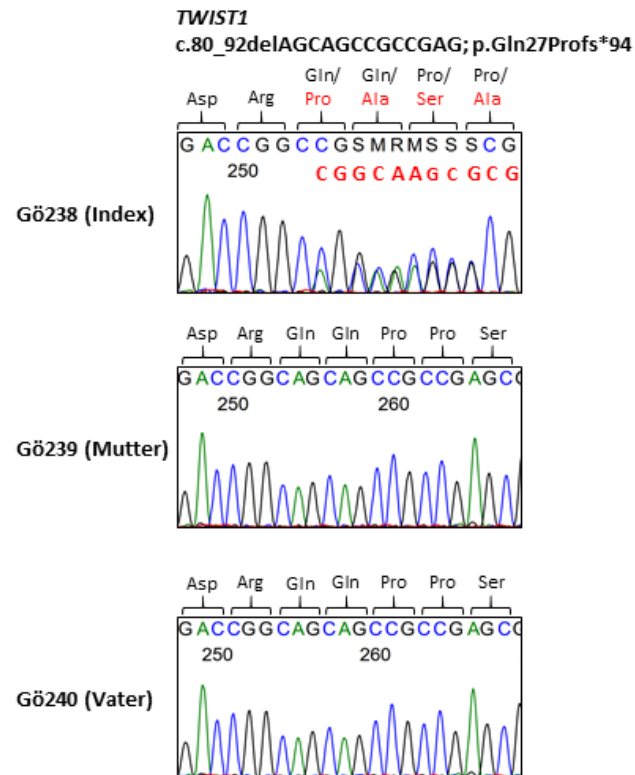


Abbildung 11: Elektropherogramme der identifizierten *TWIST1*-Mutation im Patienten Gö238 mit der Verdachtsdiagnose Saethre-Chotzen-Syndrom.

Das obere Elektropherogramm zeigt die heterozygote 13 bp Deletion in Exon1 des *TWIST1*-Gens, die im Patienten Gö238 gefunden wurden. Das mittlere Elektropherogramm zeigt das Ergebnis der Sequenzierungen an maternaler DNA, das untere der Sequenzierung an paternaler DNA.

### 3.1.2 Multigen-Panel-Analyse bei Patienten mit einer Kraniosynostose

In zwei Patienten des untersuchten Patientenkollektivs konnte keine kausale Variante in den *Hotspot*-Regionen der Gene *FGFR2* und *FGFR3* mittels PCR-Amplifikation und Sanger-Sequenzierung identifiziert werden. Bei beiden Patienten, K4081 und Gö224, handelt es sich um Patienten mit einer isoliert, nicht-syndromalen Kraniosynostose. Zur weiteren Untersuchung einer genetischen Ursache der Kraniosynostose bei diesen Patienten wurde nachfolgend eine Multigen-Panel-Analyse unter Verwendung des CRANIO-QXT-Panels durchgeführt. Dieses Panel ermöglicht die simultane Analyse der proteinkodierenden Bereiche, inklusive angrenzender Exon-Intron-Übergänge, von insgesamt 29 Genen (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *GLI3*, *MEGF8*, *RAB23*, *TWIST1*, *ADAMTS10*, *ALX1*, *ALX3*, *ALX4*, *CD96*, *EFNB1*, *ERF*, *IFT122*, *IFT43*, *IL11RA*, *LRP2*, *MN1*, *P4HB*, *POR*, *RECQL4*, *RUNX2*, *SEC24D*, *SKI*, *SMO*, *WDR19*, *WDR35*, *ZIC1* (Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen 2021)), in denen pathogene Veränderungen in Patienten mit isolierten und syndromalen Formen der Kraniosynostose beschrieben wurden (Stand Februar 2021). Das Design und die Etablierung dieses Multigen-Panels erfolgten durch die Abteilung „molekulargenetische Diagnostik“ des Instituts für Humangenetik, Universitätsmedizin Göttingen. Die Analyse der Patientenproben fand ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Abteilung „molekulargenetische Diagnostik“ des Instituts für Humangenetik statt.

Die Auswertung der Sequenzanalyse der 29 untersuchten Gene erfolgte mittels der Software *Sequence Pilot* (jsi medical systems GmbH). Für beide Proben konnte eine mindestens 20-fache Abdeckung an >99 % (K4081) bzw. >96 % (Gö224) der Zielsequenzen ermittelt werden. Für Patient K4081 wurden insgesamt 61 Varianten in den kodierenden Bereichen der 29 untersuchten Gene detektiert, die Abweichungen zu den Referenzsequenzen (humanes Referenzgenom hg19) der erfassten Gene darstellen. Bei Gö224 wurden 55 Sequenzvarianten detektiert. Die Ergebnisse dieser Analyse und die Klassifikation der Varianten sind in Tabelle 34 und Tabelle 35 zusammengefasst.

Tabelle 34: Patient K4081, Sequenzvarianten.

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Zygotie	Allel-frequenz in gnomAD <sup>a</sup> [Anzahl Homozygote]	rs Nummer	Einschätzung
chr19:8669931	<i>ADAMTS10</i>	ENST00000597188.5	c.401C>G	p.Thr134Ser	het	0.7910	rs7255721	Polymorphismus
chr19:8654106	<i>ADAMTS10</i>	ENST00000597188.5	c.2158+20C>T	-	het	0.09851	rs73501572	Polymorphismus
chr19:8651562	<i>ADAMTS10</i>	ENST00000597188.5	c.2283T>C	p.Pro761=	het	0.2149	rs4476282	Polymorphismus
chr19:8649943-8649944	<i>ADAMTS10</i>	ENST00000597188.5	c.3043-12_3043-6dupGCCCCCT	-	het	0.000008328	rs138501563	Polymorphismus
chr19:8645786	<i>ADAMTS10</i>	ENST00000597188.5	c.3303T>G	p.His1101Gln	hom	0.000004163	rs7252299	Polymorphismus
chr11:44331509	<i>ALX4</i>	ENST00000329255.3	c.104G>C	p.Arg35Thr	het	0.4962	rs3824915	Polymorphismus
chr11:44331309	<i>ALX4</i>	ENST00000329255.3	c.304C>T	p.Pro102Ser	het	0.00002764	rs12421995	Polymorphismus
chr11:44297054	<i>ALX4</i>	ENST00000329255.3	c.621A>G	p.Ser207=	hom	0.000003977	rs10769028	Polymorphismus
chr11:44286566	<i>ALX4</i>	ENST00000329255.3	c.1074C>T	p.Ser207=	het	0.3652	rs3802805	Polymorphismus
chr3:111260975	<i>CD96</i>	ENST00000283285.9	c.-121C>T	-	het	0.5243	rs2276873	Polymorphismus
chr3:111356083	<i>CD96</i>	ENST00000283285.9	c.1410G>C	p.Pro470=	hom	0.00001061	rs1533270	Polymorphismus
chr19:42753649	<i>ERF</i>	ENST00000222329.8	c.615C>G	p.Arg205=	het	0.00001231	rs11557114	Polymorphismus
chr8:38271466	<i>FGFR1</i>	ENST00000447712.6	c.2262G>A	p.Leu754=	het	0.006561	rs56341011	Polymorphismus
chr10:123298158	<i>FGFR2</i>	ENST00000358487.9	c.696A>G	p.Val232=	hom	0.7801	rs1047100	Polymorphismus

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Zygotie	Allel-frequenz in gnomAD <sup>a</sup> [Anzahl Homozygote]	rs Nummer	Einschätzung
chr10:123243197	<i>FGFR2</i>	ENST00000358487.9	c.2301+15C>T	-	het	0.5474	rs2278202	Polymorphismus
chr4:1807894	<i>FGFR3</i>	ENST00000440486.6	c.1953G>A	p.Thr651=	hom	0.9865	rs7688609	Polymorphismus
chr7:42088232	<i>GLI3</i>	ENST00000395925.7	c.537C>T	p.His179=	het	0.07009	rs3898405	Polymorphismus
chr7:42088222	<i>GLI3</i>	ENST00000395925.7	c.547A>G	p.Thr183Ala	hom	0.5561	rs846266	Polymorphismus
chr7:42079765	<i>GLI3</i>	ENST00000395925.7	c.900C>T	p.Ser300=	het	0.07166	rs35961850	Polymorphismus
chr7:42064852	<i>GLI3</i>	ENST00000395925.7	c.1356+11G>C	-	hom	0.9750	rs846273	Polymorphismus
chr3:129196984	<i>IFT122</i>	ENST00000296266.7	c.1426C>T	p.Arg476Trp	het	0.005279	rs61744639	Polymorphismus
chr14:76543004	<i>IFT43</i>	ENST00000238628.10	c.280G>A	p.Asp94Asn	het	0.2577	rs17783366	Polymorphismus
chr2:g.170218847	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.63G>C	p.Ala21=	hom	0.9965	rs1559014	Polymorphismus
chr2:g.170218816	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.79+15A>G	-	hom	0.9964	rs1559013	Polymorphismus
chr2:g.170175334	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.248A>G	p.Asn83Ser	hom	0.2789	rs2229263	Polymorphismus
[chr2:g.170150671	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.639C>T	p.Asp213=	het	0.3226	rs2229266	Polymorphismus
chr2:g.170129528	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.2025C>T	p.Val675=	hom	0.6276	rs830994	Polymorphismus
chr2:g.170063471	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.6759T>C	p.Asp2253=	het	0.03814	rs35114151	Polymorphismus
chr2:g.170032989	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.10503G>A	p.Gln3501=	het	0.4768	rs2229265	Polymorphismus
chr2:g.170010985	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.12280A>G	p.Lys4094Glu	hom	0.7637	rs2075252	Polymorphismus

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Zygotie	Allel-frequenz in gnomAD <sup>a</sup> [Anzahl Homozygote]	rs Nummer	Einschätzung
chr2:g.170009481	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.12296-7T>A	-	het	0.001019	rs200755164	Polymorphismus
chr2:g.170003432	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.12628A>C	p.Ile4210Leu	hom	0.7113	rs4667591	Polymorphismus
chr2:g.169997051	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.13113C>T	p.Ile4371=	het	0.6821	rs990626	Polymorphismus
chr19:g.42848764	<i>MEGF8</i>	ENST00000334370.8	c.1933+27A>G	-	het	0.7415	rs874002	Polymorphismus
chr7:g.75614082	<i>POR</i>	ENST00000461988.5	c.1067-13C>G	-	hom	0.9052	rs4732516	Polymorphismus
chr7:g.75614953	<i>POR</i>	ENST00000461988.5	c.1455T>C	p.Ala485=	hom	0.9159	rs2228104	Polymorphismus
chr7:g.75615287	<i>POR</i>	ENST00000461988.5	c.1716G>A	p.Ser572=	hom	0.2806	rs1057870	Polymorphismus
chr6:g.57055354	<i>RAB23</i>	ENST00000317483.4	c.619G>A	p.Gly207Ser	het	0.1013	rs1040461	Polymorphismus
chr8:g.145742879	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.132A>G	p.Glu44=	het	0.5368	rs2306386	Polymorphismus
chr8:g.145742514	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.274T>C	p.Ser92Pro	hom	0.9711	rs2721190	Polymorphismus
chr8:g.145742479	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.309G>A	p.Pro103=	het	0.006720	rs4251688	Polymorphismus
chr8:g.145741765	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.738C>T	p.Ser246=	het	0.4354	rs4244613	Polymorphismus
chr8:g.145741702	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.801G>C	p.Glu267Asp	het	0.4354	rs4244612	Polymorphismus
chr8:g.145741130	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.1258+18G>A	-	het	0.4657	rs4251689	Polymorphismus
chr8:g.145739924	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.1621-15C>T	-	het	0.4657	rs4244611	Polymorphismus
chr8:g.145737816	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.3014G>A	p.Arg1005Gln	het	0.4564	rs4251691	Polymorphismus



Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Zygotie	Allel-frequenz in gnomAD <sup>a</sup> [Anzahl Homozygote]	rs Nummer	Einschätzung
chr8:g.145737636	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.3127T>C	p.Leu1043=	hom	0.9712	rs4925828	Polymorphismus
chr8:g.145737514	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.3236+13C>T	-	het	0.4808	rs4244610	Polymorphismus
chr8:g.145737286	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.3393+8C>T	-	het	0.4652	rs756627	Polymorphismus
chr4:g.119745768	<i>SEC24D</i>	ENST00000379735.5	c.248+7T>C	-	het	0.004359	rs139956480	Polymorphismus
chr4:g.119736598	<i>SEC24D</i>	ENST00000379735.5	c.673+8G>A	-	hom	0.8737	rs6843524	Polymorphismus
chr4:g.119674051_119674	<i>SEC24D</i>	ENST00000379735.5	c.1425-9dupT	-	het	0.00002255	rs71595318	Polymorphismus
chr7:g.128845223	<i>SMO</i>	ENST00000249373.7	c.717C>T	p.Ala239=	het	0.004944	rs111482521	Polymorphismus
chr7:g.128846328	<i>SMO</i>	ENST00000249373.7	c.1164G>C	p.Gly388=	hom	0.7976	rs2228617	Polymorphismus
chr4:g.39207318	<i>WDR19</i>	ENST00000399820.7	c.852A>G	p.Ser284=	het	0.1533	rs17584431	Polymorphismus
chr4:g.39216221	<i>WDR19</i>	ENST00000399820.7	c.891C>T	p.Cys297=	het	0.2864	rs2167494	Polymorphismus
chr4:g.39259190	<i>WDR19</i>	ENST00000399820.7	c.3183+16A>G	-	het	0.3134	rs11096987	Polymorphismus
chr2:g.20133221	<i>WDR35</i>	ENST00000345530.7	c.2632G>A	p.Ala878Thr	het	0.05293	rs2293669	Polymorphismus
chr2:g.20131184	<i>WDR35</i>	ENST00000345530.7	c.2857-14G>T	-	hom	0.9878	rs1191779	Polymorphismus
chr2:g.20131079	<i>WDR35</i>	ENST00000345530.7	c.2948A>G	p.Glu983Gly	het	0.3343	rs1191778	Polymorphismus
chr3:g.147121751	<i>ZIC4</i>	ENST00000525172.2	c.135G>A	p.Lys45=	het	0.1724	rs6766244	Polymorphismus

Tabelle 35: Patient Gö224, Sequenzvarianten.

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Zygotie	Allelfrequenz in gnomAD <sup>a</sup> [Anzahl Homozygote]	rs Nummer	Einschätzung
chr19:g.8669931	<i>ADAMTS10</i>	ENST00000597188.5	c.401C>G	p.Thr134Ser	hom	0.7910	rs7255721	Polymorphismus
chr19:g.8654106	<i>ADAMTS10</i>	ENST00000597188.5	c.2158+20C>T	-	het	0.09851	rs73501572	Polymorphismus
chr19:g.8645786	<i>ADAMTS10</i>	ENST00000597188.5	c.3303T>G	p.His1101Gln	hom	0.000004163	rs7252299	Polymorphismus
chr11:g.44331544	<i>ALX4</i>	ENST00000329255.3	c.69G>C	p.Pro23=	het	0.000004451	rs115968657	Polymorphismus
chr11:g.44331509	<i>ALX4</i>	ENST00000329255.3	c.104G>C	p.Arg35Thr	het	0.4962	rs3824915	Polymorphismus
chr11:g.44297054	<i>ALX4</i>	ENST00000329255.3	c.621A>G	p.Ser207=	hom	0.000003977	rs10769028	Polymorphismus
chr11:g.44289183	<i>ALX4</i>	ENST00000329255.3	c.778-11G>A	-	het	0.08051	rs75147697	Polymorphismus
chr11:g.44289071	<i>ALX4</i>	ENST00000329255.3	c.879C>T	p.Leu293=	het	0.1090	rs12419361	Polymorphismus
chr3:g.111260975	<i>CD96</i>	ENST00000283285.9	c.-121C>T	-	het	0.5243	rs2276873	Polymorphismus
chr3:g.111356083	<i>CD96</i>	ENST00000283285.9	c.1410G>C	p.Pro470=	hom	0.00001061	rs1533270	Polymorphismus
chr10:g.123298158	<i>FGFR2</i>	ENST00000358487.9	c.696A>G	p.Val232=	hom	0.7801	rs1047100	Polymorphismus
chr10:g.123247644	<i>FGFR2</i>	ENST00000358487.9	c.1864-17T>G	-	het	0.01937	rs3135802	Polymorphismus
chr10:g.123243197	<i>FGFR2</i>	ENST00000358487.9	c.2301+15C>T	-	het	0.5474	rs2278202	Polymorphismus
chr4:g.1807894	<i>FGFR3</i>	ENST00000440486.6	c.1953G>A	p.Thr651=	hom	0.9865	rs7688609	Polymorphismus

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Zygotie	Allel-frequenz in gnomAD <sup>a</sup> [Anzahl Homozygote]	rs Nummer	Einschätzung
chr7:g.42212180	<i>GLI3</i>	ENST00000395925.7	c.230G>A	p.Gly77Glu	het	0.1110	rs2286293	Polymorphismus
chr7:g.42088222	<i>GLI3</i>	ENST00000395925.7	c.547A>G	p.Thr183Ala	hom	0.5561	rs846266	Polymorphismus
chr7:g.42064852	<i>GLI3</i>	ENST00000395925.7	c.1356+11G>C	-	het	0.9750	rs846273	Polymorphismus
chr7:g.42005678	<i>GLI3</i>	ENST00000395925.7	c.2993C>T	p.Pro998Leu	het	0.4084	rs929387	Polymorphismus
chr2:g.170218847	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.63G>C	p.Ala21=	hom	0.9965	rs1559014	Polymorphismus
chr2:g.170218816	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.79+15A>G	-	hom	0.9964	rs1559013	Polymorphismus
chr2:g.170150671	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.639C>T	p.Asp213=	het	0.3226	rs2229266	Polymorphismus
chr2:g.170129528	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.2025C>T	p.Val675=	het	0.6276	rs830994	Polymorphismus
chr2:g.170053505	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.8614G>A	p.Ala2872Thr	het	0.2674	rs2228171	Polymorphismus
chr2:g.170032989	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.10503G>A	p.Gln3501=	het	0.4768	rs2229265	Polymorphismus
chr2:g.170010985	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.12280A>G	p.Lys4094Glu	het	0.7637	rs2075252	Polymorphismus
chr2:g.170003432 (hg19)]	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.12628A>C	p.Ile4210Leu	het	0.7113	rs4667591	Polymorphismus
chr2:g.169997051	<i>LRP2</i>	ENST00000263816.7	c.13113C>T	p.Ile4371=	het	0.6821	rs990626	Polymorphismus
chr19:g.42848764	<i>MEGF8</i>	ENST00000334370.8	c.1933+27A>G	-	het	0.7415	rs874002	Polymorphismus
chr19:g.42859917	<i>MEGF8</i>	ENST00000334370.8	c.3951C>T	p.Leu1317=	het	0.0007405	rs34225188	Polymorphismus
chr19:g.42879810	<i>MEGF8</i>	ENST00000334370.8	c.7220G>A	p.Arg2407His	het	0.00001236	rs45623135	Polymorphismus

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Zygotie	Allelfrequenz in gnomAD <sup>a</sup> [Anzahl Homozygote]	rs Nummer	Einschätzung
chr7:g.75609677	<i>POR</i>	ENST00000461988.5	c.387A>G	p.Pro129=	het	0.2687	rs1135612	Polymorphismus
chr7:g.75614082	<i>POR</i>	ENST00000461988.5	c.1067-13C>G	-	hom	0.9052	rs4732516	Polymorphismus
chr7:g.75614288	<i>POR</i>	ENST00000461988.5	c.1248+12C>T	-	het	0.3066	rs2286822	Polymorphismus
chr7:g.75614296	<i>POR</i>	ENST00000461988.5	c.1248+20G>A	-	het	0.3031	rs2286823	Polymorphismus
chr7:g.75614953	<i>POR</i>	ENST00000461988.5	c.1455T>C	p.Ala485=	hom	0.9159	rs2228104	Polymorphismus
chr7:g.75615006	<i>POR</i>	ENST00000461988.5	c.1508C>T	p.Ala503Val	het	0.3019	rs1057868	Polymorphismus
chr8:g.145742879	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.132A>G	p.Glu44=	het	0.5368	rs2306386	Polymorphismus
chr8:g.145742514	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.274T>C	p.Ser92Pro	hom	0.9711	rs2721190	Polymorphismus
chr8:g.145741765	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.738C>T	p.Ser246=	het	0.4354	rs4244613	Polymorphismus
chr8:g.145741702	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.801G>C	p.Glu267Asp	het	0.4354	rs4244612	Polymorphismus
chr8:g.145741130	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.1258+18G>A	-	het	0.4657	rs4251689	Polymorphismus
chr8:g.145739924	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.1621-15C>T	-	het	0.4657	rs4244611	Polymorphismus
chr8:g.145737816	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.3014G>A	p.Arg1005Gln	het	0.4564	rs4251691	Polymorphismus
chr8:g.145737636	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.3127T>C	p.Leu1043=	hom	0.9712	rs4925828	Polymorphismus
chr8:g.145737514	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.3236+13C>T	-	het	0.4808	rs4244610	Polymorphismus
chr8:g.145737286	<i>RECQL4</i>	ENST00000428558.2	c.3393+8C>T	-	het	0.4652	rs756627	Polymorphismus

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Zygotie	Allel-frequenz in gnomAD <sup>a</sup> [Anzahl Homozygote]	rs Nummer	Einschätzung
chr4:g.119736598	<i>SEC24D</i>	ENST00000379735.5	c.673+8G>A	-	hom	0.8737	rs6843524	Polymorphismus
chr4:g.119674051_119674052	<i>SEC24D</i>	ENST00000379735.5	c.1425-9dupT	-	het	0.00002255	rs71595318	Polymorphismus
chr7:g.128846328	<i>SMO</i>	ENST00000249373.7	c.1164G>C	p.Gly388=	het	0.7976	rs2228617	Polymorphismus
chr4:g.39207318	<i>WDR19</i>	ENST00000399820.7	c.852A>G	p.Ser284=	hom	0.1533	rs17584431	Polymorphismus
chr4:g.39216221	<i>WDR19</i>	ENST00000399820.7	c.891C>T	p.Cys297=	hom	0.2864	rs2167494	Polymorphismus
chr4:g.39259190	<i>WDR19</i>	ENST00000399820.7	c.3183+16A>G	-	hom	0.3134	rs11096987	Polymorphismus
chr2:g.20135283	<i>WDR35</i>	ENST00000345530.7	c.2529A>G	p.Glu843=	het	0.00001197	rs6741091	Polymorphismus
chr2:g.20131184	<i>WDR35</i>	ENST00000345530.7	c.2857-14G>T	-	hom	0.9878	rs1191779	Polymorphismus

Die bioinformatische Analyse sowie persönliche Einschätzung und Interpretation dieser Varianten unter Einbeziehung ihrer populationsgenetischen Frequenz sowie des prädizierten, funktionellen Effekts der Sequenzveränderung ergab, dass keine der ermittelten Sequenzveränderungen als pathogen oder möglicherweise pathogen einzuschätzen ist. Alle ermittelten Sequenzveränderungen sind sehr häufig in der nicht betroffenen Allgemeinbevölkerung zu finden (Allelfrequenzen siehe Tabelle 34 und Tabelle 35) oder/und haben keinen funktionellen Effekt auf das kodierte Protein. Mittels der durchgeführten Multigen-Panel-Analyse konnte also keine ursächliche, genetische Veränderung in den Patienten K4081 und Gö224 in den 29 untersuchten Genen ermittelt werden.

### 3.1.3 Genetische Untersuchung eines Patienten mit der Verdachtsdiagnose eines Carpenter-Syndroms

Im Rahmen der diagnostischen Auswertung des CRANIO-QXT-Multigen-Panels eines Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer Kraniosynostose wurden zwei heterozygote Varianten im *MEGF8*-Gen identifiziert (vgl. dazu Tabelle 36). Ursächliche Varianten in diesem Gen wurden zuvor bereits in einem autosomal rezessiven Vererbungsmuster als ursächlich für das Carpenter-Syndrom, Typ2 (CRTP2, OMIM 614976) beschrieben (Twigg et al. 2012).

Tabelle 36: Übersicht der im Rahmen der diagnostischen Analyse bei Patient Gö332 identifizierten Varianten in *MEGF8*.

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Zygotie	Allelfrequenz in gnomAD <sup>a</sup> [Anzahl Homozygote]	Einschätzung
Chr19:4 2863317	<i>MEGF8</i>	ENST000 00334370 .8	c.5210C>A	p.Ser1737 *	het	0.00003820	pathogen
Chr19:4 2853636 _428536 39	<i>MEGF8</i>	ENST000 00334370 .8	c.2098- 15_2098- 12delT- CAC	unklar	het	-	Variante unklarer Signifikanz (VUS)

Während es sich bei der Variante c.5210C>A um eine *nonsense*-Veränderung handelt, die zur Bildung eines Stopp-Codons und einem verfrühten Abbruch der Proteinbiosynthese des *MEGF8*-Proteins führt, ist der Einfluss der intronischen Deletion c.2098-15\_2098-12delTCAC

auf das MEGF8-Protein unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Effekt dieser intronischen Veränderung hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf das korrekte Spleißen der *MEGF8*-prä-mRNA und der Generierung reifer *MEGF8*-mRNA untersucht werden.

Dazu wurden zunächst beide Veränderungen in *MEGF8* mittels PCR und nachfolgender Sanger-Sequenzierung auf genomischer Ebene bestätigt (vgl. Abbildung 12).

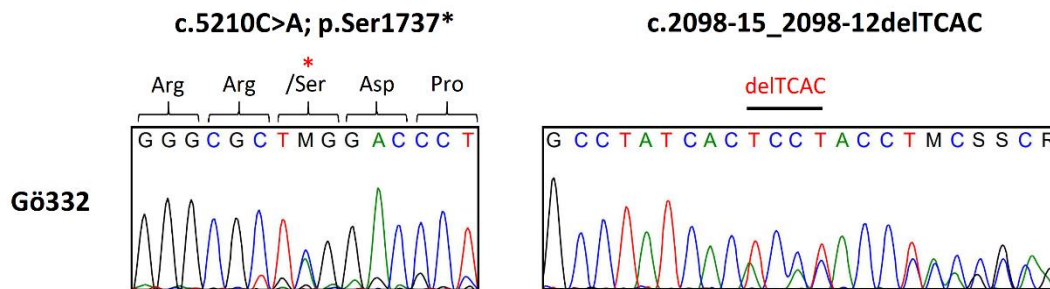


Abbildung 2: Bestätigung der diagnostisch identifizierten Veränderungen in *MEGF8* mittels PCR und Sanger-Sequenzierung an genomischer DNA des Patienten Gö332.

Mittels PCR und Sanger-Sequenzierung konnten beide Veränderungen, die zuvor mittels Multigen-Panel-Analyse identifiziert wurden, auf genomischer Ebene im heterozygoten Zustand nachgewiesen werden. Um einen möglichen Einfluss der identifizierten c.2098-15\_2098-12delTCAC Variante auf die angrenzende 3'-Akzeptor-Spleißstelle im Intron 14 zu überprüfen, wurde nachfolgend die Bildung regulär gespleißter Transkripte untersucht. Hierzu wurde RNA, die aus einer PaxGene-Blutprobe des Patienten Gö332 isoliert wurde, zunächst in cDNA umgeschrieben und nachfolgend als Template für eine PCR eingesetzt. In einem ersten Schritt wurde zunächst das Vorhandensein von Transkripten aus beiden Allelen untersucht. Dazu wurde die heterozygote Veränderung c.5210C>A als Marker verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Variante auf cDNA-Ebene im heterozygoten Zustand vorliegt, dass also beide *MEGF8*-Allele exprimiert werden (Abbildung 13).

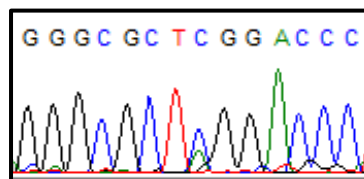


Abbildung 13: Nachweis der heterozygoten Sequenzvariante c.5210C>A in *MEGF8* auf cDNA Ebene.

In einem zweiten Schritt wurde mittels PCR auf cDNA-Ebene untersucht, ob die identifizierte c.2098-15\_2098-12delTCAC Variante die 3'-Donorspleißstelle in Intron 14 des *MEGF8*-Gens beeinflusst und zu einem irregulär gespleißten *MEGF8*-mRNA-Transkript führt. Der Nachweis erfolgte unter Verwendung verschiedener *MEGF8*-spezifischer Primer, die zur Amplifikation des Bereichs zwischen Exon 11 und Exon 15 führen (vgl. Tabelle 36). Die Auftrennung der entstandenen PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese ergab für alle unterschiedlichen PCR-Ansätze nur jeweils ein Produkt, welches der berechneten Größe entsprach. Um auszuschließen, dass die identifizierte c.2098-15\_2098-12delTCAC Variante ein alternatives Spleißen induziert, wurden diese PCR-Produkte zur Überprüfung der Integrität des Übergangs zwischen den Exons 13 und 14 nachfolgend sequenziert (Abbildung 14). Die Sequenzanalyse zeigte keine Auffälligkeiten in Bereich des Übergangs zwischen dem Exon 13 und 14 des *MEGF8*-Transkripts.

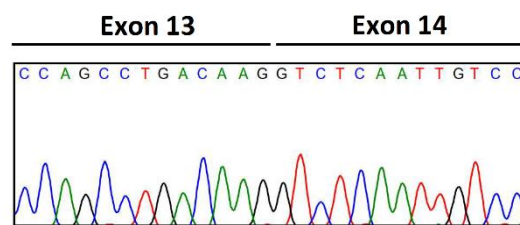


Abbildung 14: Nachweis des korrekten Übergangs zwischen Exon 13 und 14 in *MEGF8* auf cDNA-Ebene.

Mittels der durchgeführten Analysen wurden keine Hinweise auf alternatives Spleißen gefunden.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der hier verwendeten Methodik keine Beeinträchtigung der 3'-Akzeptorspleißstelle in Intron 13 des *MEGF8*-Gens durch die identifizierte Sequenzvariante c.2098-15\_2098-12delTCAC festgestellt werden. Es kann allerdings zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund technischer Limitierung der Methoden ein spezifischer Splice-Effekt nicht nachgewiesen werden konnte.

### 3.2 Mutationsanalyse in Familien mit isolierten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten mittels Exomsequenzierung

Um molekulargenetische Ursachen isolierter Lippen-Kiefer-Gaumenspalten genauer aufzuklären und neue, kausale genetische Faktoren für diese Erkrankung zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Dissertation Exomanalysen an insgesamt elf betroffenen und nicht betroffenen



Individuen aus fünf Familien durchgeführt. Dabei handelt es sich um Familien, in denen eine familiäre Häufung der isolierten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten zu beobachten war. Syndromale Erkrankungen, die mit einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte einhergehen, wurden vorab klinisch ausgeschlossen. Die Familien wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Dr. Schliephake (Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Göttingen), Dr. Abhilash Pasare Ravindranath (Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Oxford Dental College, Bangalore, Indien), Dr. Martin Rachwalski (Department of Maxillofacial and Plastic Surgery, National Reference Center for Cleft Lip and Palate, Hopital Universitaire Necker-Enfants Malades, Paris, Frankreich) sowie Dr. Dr. Jürgen Lichtensteiner (MKG-Chirurgie, Uniklinik Kiel) rekrutiert und klinisch charakterisiert. Die Exomsequenzierungen wurden in Zusammenarbeit mit dem CCG (Universität zu Köln) durchgeführt und die generierten Daten mittels der Analysesoftware Varbank untersucht.

### 3.2.1 Familie LKG8

In dieser aus Indien stammenden Familie ist bei sechs betroffenen Individuen die klinische Verdachtsdiagnose einer isolierten Lippen-Kiefer-Gaumenspalte gestellt worden. Die Erkrankung wird dabei über zwei Generationen autosomal dominant vererbt (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 15).

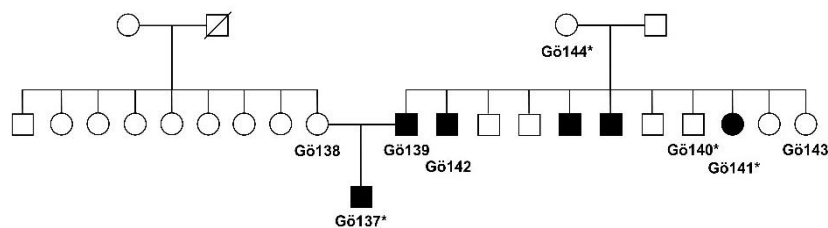


Abbildung 15: Stammbaum der Familie LKG8 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

Insgesamt lagen DNA-Proben von vier betroffenen sowie vier nicht betroffenen Familienmitgliedern vor, von denen jeweils zwei zur Exomsequenzierung verwendet wurden. Aus genomischer DNA der Patientenproben wurden dabei die Exons und angrenzenden Exon-Intron-Übergänge mittels des Agilent SureSelect Human All Exon V6-Kits angereichert und auf einem Illumina HiSeq4000-Sequenziergerät analysiert. Insgesamt wurden dabei pro Probe zwischen

125 Mio und 162 Mio *reads* generiert und eine Abdeckung von >10x an über 96,4 % der Zielsequenzen erzielt.

Im Zuge der initialen Analyse der Exomsequenzierungen wurden zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse zunächst Varianten aussortiert, für die eine niedrige Qualität vorlag (Qualitäts-Score <10). Nachfolgend wurden Varianten, die in den Datenbanken der ExAC und gnomAD browser, dbSNP sowie der *inhouse* Datenbank des CCGs mit einer Frequenz von >0,5 % annotiert waren, außer Betracht gelassen. Diese Filterung diente dem Ausschluss von häufigen, in der gesunden Allgemeinbevölkerung vorkommenden Varianten. Ausgehend von einem vollständig penetranten, autosomal dominanten Vererbungsmuster wurden die generierten Exomsequenzierungsdaten der vier Individuen anschließend nach heterozygoten Varianten gefiltert, die in beiden betroffenen Individuen vorlagen, in den beiden nicht betroffenen Individuen dieser Familien aber abwesend waren. Diese Veränderungen wurden nachfolgend hinsichtlich ihres Effekts auf das kodierte Protein hin untersucht und Varianten, die keinen funktionellen Einfluss auf die kodierte Proteinsequenz hatten, wurden herausgefiltert. Insgesamt führte dies zur Identifizierung von 64 Varianten in 59 Genen (Tabelle 37).

Tabelle 37: Filterungsergebnis nach heterozygoten Varianten bei betroffenen Individuen aus Familie LKG8.

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	167905 024	167905 024	1	T	C	ENSG000001 43158	ENST000002 71373	ENSP000002 71373	<i>BRP44</i>	NM_015415 .3	c.56A>G	p.K19R	rs150529 062	0,00 14
2	228476 172	228476 172	1	C	G	ENSG000000 42304	ENST000002 64387	ENSP000002 64387	<i>C2orf83</i>	NM_020161 .3	c.391G>C	p.E131Q		
3	164750 459	164750 459	1	T	C	ENSG000000 90402	ENST000002 64382	ENSP000002 64382	<i>SI</i>	NM_001041 .3	c.2587A>G	p.T863A		
3	165547 360	165547 360	1	C	T	ENSG000001 14200	ENST000002 64381	ENSP000002 64381	<i>BCHE</i>	NM_000055 .2	c.1462G>A	p.E488K		
5	639866 09	639866 09	1	C	A	ENSG000001 45642	ENST000003 89074	ENSP000003 73726	<i>FAM159B</i>	NM_001164 442.1	c.159C>A	p.F53L	rs144658 157	0,00 21
5	724695 93	724695 93	1	G	A	ENSG000001 64325	ENST000002 96776	ENSP000002 96776	<i>TMEM174</i>	NM_153217 .2	c.523G>A	p.A175T		0,00 01
5	754280 44	754280 44	1	G	A	ENSG000001 22012	ENST000005 02798	ENSP000004 23541	<i>SV2C</i>	NM_014979 .1	c.469G>A	p.V157I		
6	475636 08	475636 08	1	A	G	ENSG000001 98087	ENST000003 59314	ENSP000003 52264	<i>CD2AP</i>	NM_012120 .2	c.1120A>G	p.T374A	rs138727 736	0,00 37
6	526976 70	526976 71	2	(A) 2	A	ENSG000001 82793	ENST000002 84562	ENSP000002 84562	<i>GSTA5</i>	NM_153699 .1	c.532_533de l(T)2insT	p.F178S fs*4		
6	564941 41	564941 41	1	T	A	ENSG000001 51914	ENST000002 44364	ENSP000002 44364	<i>DST</i>	NM_015548 .4	c.2771A>T	p.Y924F		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
6	90481308	90481308	1	G	T	ENSG00000112159	ENST00000369393	ENSP00000358400	<i>MDN1</i>	NM_014611.1	c.2116C>A	p.Q706K		
7	101923380	101923380	1	C	A	ENSG00000257923	ENST00000292538	ENSP00000292538	<i>CUX1</i>	NM_001913.3	c.1732C>A	p.R578S		
7	107749668	107749668	1	C	G	ENSG00000091128	ENST00000205386	ENSP00000205386	<i>LAMB4</i>	NM_007356.2	c.350G>C	p.R117T	rs149874 137	0,00 44
7	114619784	114619784	1	G	C	ENSG00000135272	ENST00000393486	ENSP00000377126	<i>MDFIC</i>	NM_001166345.1	c.441G>C	p.K147N		
7	131194291	131194291	1	T	C	ENSG00000128567	ENST00000322985	ENSP00000319782	<i>PODXL</i>	NM_005397.3	c.760A>G	p.S254G	rs141183 338	0,00 01
7	134617927	134617927	1	G	A	ENSG00000122786	ENST00000424922	ENSP00000393621	<i>CALD1</i>	NM_033140.3	c.389G>A	p.R130K	rs753587 73	0,00 43
7	140301308	140301308	1	G	C	ENSG00000146966	ENST00000496613	ENSP00000419654	<i>DENND2A</i>	NM_015689.3	c.890C>G	p.P297R		
7	140302144	140302144	1	G	C	ENSG00000146966	ENST00000496613	ENSP00000419654	<i>DENND2A</i>	NM_015689.3	c.54C>G	p.S18R		
8	145577618	145577618	1	G	A	ENSG00000214597	ENST00000526263	ENSP00000435362		NM_001252404.1	c.343C>T	p.R115*	rs145236 969	0,00 27
8	145641411	145641411	1	G	A	ENSG00000147804	ENST00000276833	ENSP00000276833	<i>SLC39A4</i>	NM_017767.2	c.182C>T	p.P61L	rs187080 747	0,00 17
11	5443689	5443689	1	C	T	ENSG00000167360	ENST00000300778	ENSP00000300778	<i>OR51Q1</i>	NM_001004757.2	c.259C>T	p.L87F		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
11	171566	171566	1	G	C	ENSG00000011405	ENST00000265970	ENSP00000265970	<i>PIK3C2A</i>	NM_002645.2	c.1875C>G	p.D625E		
11	625592	625592	1	G	A	ENSG000000168569	ENST00000307366	ENSP00000303987	<i>TMEM223</i>	NM_001080501.2	c.197C>T	p.A66V		
11	640294	640294	1	G	C	ENSG000000149782	ENST00000279230	ENSP00000279230	<i>PLCB3</i>	NM_000932.2	c.1986G>C	p.Q662 H		
11	640294	640294	1	G	C	ENSG000000149782	ENST00000540288	ENSP00000443631	<i>PLCB3</i>	NM_000932.2	c.1986G>C	p.Q662 H		
11	661918	661918	1	A	G	ENSG000000174576	ENST00000311034	ENSP00000311196	<i>NPAS4</i>	NM_178864.3	c.1496A>G	p.D499 G		
11	663338	663338	1	G	A	ENSG000000174080	ENST00000310325	ENSP00000310832	<i>CTSF</i>	NM_003793.3	c.613C>T	p.R205 W		
11	687733	687733	1	T	C	ENSG000000172935	ENST00000441623	ENSP00000403660	<i>MKGPRF</i>	NM_145015.4	c.419A>G	p.E140G		
11	719066	719066	1	G	A	ENSG000000110195	ENST00000393681	ENSP00000377286	<i>FOLR1</i>	NM_016729.2	c.394G>A	p.V132 M		
12	107914	107914	1	A	G	ENSG000000151136	ENST00000280758	ENSP00000280758	<i>BTBD11</i>	NM_001018072.1	c.1189A>G	p.N397 D		
13	207633	207633	1	C	T	ENSG000000165474	ENST00000382848	ENSP00000372299	<i>GJB2</i>	NM_004004.5	c.380G>A	p.R127H	rs111033 196	0,00 23
16	889002	889002	1	C	T	ENSG000000184857	ENST00000333050	ENSP00000331640	<i>TMEM186</i>	NM_015421.3	c.422G>A	p.R141Q		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
16	200437 34	200437 34	1	C	T	ENSG000001 80269	ENST000005 70682	ENSP000004 58791	<i>GPR139</i>	NM_001002 911.2	c.385G>A	p.A129T		
16	204352 61	204352 61	1	C	T	ENSG000001 83549	ENST000003 31849	ENSP000003 27916	<i>ACSM5</i>	NM_017888 .2	c.791C>T	p.S264F		
16	207814 89	207814 89	1	T	C	ENSG000000 05187	ENST000002 89416	ENSP000002 89416	<i>ACSM3</i>	NM_005622 .3	c.133T>C	p.S45P		
16	207889 05	207889 05	1	G	A	ENSG000000 05187	ENST000002 89416	ENSP000002 89416	<i>ACSM3</i>	NM_005622 .3	c.638+3G>A			
16	208099 66	208099 66	1	T	C	ENSG000001 96678	ENST000003 57967	ENSP000003 50651	<i>ERI2</i>	NM_001142 725.1	c.1156A>G	p.T386A		
16	208141 56	208141 56	1	G	C	ENSG000001 96678	ENST000003 00005	ENSP000003 00005	<i>ERI2</i>	NM_080663 .2	c.265C>G	p.L89V		
16	209598 30	209598 30	1	T	C	ENSG000001 58486	ENST000002 61383	ENSP000002 61383	<i>DNAH3</i>	NM_017539 .1	c.11318A>G	p.Y3773 C		
16	209756 82	209756 82	1	C	T	ENSG000001 58486	ENST000002 61383	ENSP000002 61383	<i>DNAH3</i>	NM_017539 .1	c.9524G>A	p.R3175 H		
16	209762 11	209762 11	1	C	T	ENSG000001 58486	ENST000002 61383	ENSP000002 61383	<i>DNAH3</i>	NM_017539 .1	c.8995G>A	p.V2999 M		
16	229268 33	229268 36	4	(TA )2	TA	ENSG000001 22254	ENST000002 61374	ENSP000002 61374	<i>HS3ST2</i>	NM_006043 .1	c.1054_1057 del(TA)2in- sTA	p.Y352* fs		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
16	481747 65	481747 65	1	C	A	ENSG000001 40798	ENST000003 11303	ENSP000003 11030	<i>ABCC12</i>	NM_033226 .2	c.490G>T	p.G164*	rs141807 269	0,00 14
16	507445 76	507445 76	1	T	C	ENSG000001 67207	ENST000003 00589	ENSP000003 00589	<i>NOD2</i>	NM_022162 .1	c.754T>C	p.Y252 H		
16	579939 68	579939 68	1	C	T	ENSG000000 70729	ENST000003 11183	ENSP000003 11670	<i>CNGB1</i>	NM_001135 639.1	c.585G>A			
16	668041 24	668041 24	1	C	T	ENSG000002 49961	ENST000004 33154	ENSP000004 63762	<i>CCDC79</i>	NM_001136 505.1	c.1361G>A	p.R454Q		0,00 02
16	706993 65	706993 65	1	T	G	ENSG000001 32613	ENST000003 38779	ENSP000003 41171	<i>MTSS1L</i>	NM_138383 .2	c.1128+4A> C			
16	812499 19	812499 19	1	C	T	ENSG000001 66473	ENST000003 37114	ENSP000003 37397	<i>PKD1L2</i>	NM_001076 780.1	c.394G>A	p.G132R	rs117142 104	0,00 29
17	339049 39	339049 39	1	T	A	ENSG000001 08733	ENST000002 25873	ENSP000002 25873	<i>PEX12</i>	NM_000286 .2	c.102A>T	p.R34S	rs147530 802	0,00 49
18	481906 38	481906 38	1	G	A	ENSG000001 41639	ENST000004 00384	ENSP000003 83234	<i>MAPK4</i>	NM_002747 .3	c.310G>A	p.V104I		
18	517959 90	517959 90	1	C	G	ENSG000001 01751	ENST000005 79534	ENSP000004 62664	<i>POLI</i>	NM_007195 .2	c.74C>G	p.A25G		0,00 06
19	775416 2	775416 2	1	C	T	ENSG000001 04921	ENST000003 60067	ENSP000003 53178	<i>FCER2</i>	NM_001207 019.2	c.880G>A	p.G294S	rs145322 667	0,00 02
19	836742 4	836742 4	1	G	A	ENSG000001 67775	ENST000005 37716	ENSP000004 37697	<i>CD320</i>	NM_001165 895.1	c.646C>T	p.R216C	rs146190 802	0,00 04

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
19	139197 61	139197 61	1	A	G	ENSG000001 32003	ENST000002 54323	ENSP000002 54323	<i>ZSWIM4</i>	NM_023072 .2	c.824A>G	p.Y275C	rs149065 965	0,00 05
19	140231 90	140231 90	1	C	T	ENSG000001 32024	ENST000003 18003	ENSP000003 13601	<i>CC2D1A</i>	NM_017721 .4	c.251C>T	p.P84L	rs184172 956	0,00 09
19	187174 17	187174 17	1	G	T	ENSG000000 06016	ENST000003 92386	ENSP000003 76188	<i>CRLF1</i>	NM_004750 .4	c.50C>A	p.P17Q		
19	243092 24	243092 24	1	G	A	ENSG000002 13096	ENST000003 57002	ENSP000003 49494	<i>ZNF254</i>	NM_203282 .2	c.422G>A	p.G141E		
19	388827 52	388827 52	1	G	A	ENSG000001 88766	ENST000003 38502	ENSP000003 45405	<i>SPRED3</i>	NM_001042 522.1	c.344G>A	p.R115Q		
19	393065 29	393065 29	1	C	T	ENSG000001 04823	ENST000002 21418	ENSP000002 21418	<i>ECHI</i>	NM_001398 .2	c.850G>A	p.D284 N	rs587504 31	0,00 41
19	402221 39	402221 39	1	C	G	ENSG000001 05205	ENST000002 21804	ENSP000002 21804	<i>CLC</i>	NM_001828 .5	c.310G>C	p.V104L		
19	446350 90	446350 90	1	C	A	ENSG000002 56294	ENST000002 62894	ENSP000002 62894	<i>ZNF225</i>	NM_013362 .2	c.323C>A	p.S108*		
19	462702 64	462702 64	1	G	A	ENSG000001 77045	ENST000003 17578	ENSP000003 16842	<i>SIX5</i>	NM_175875 .4	c.953C>T	p.S318F		
19	504636 94	504636 93	1	-	T	ENSG000001 61640	ENST000004 58019	ENSP000003 94949	<i>SIGLEC11</i>	NM_001135 163.1	c.461- 15_16insA			
19	509170 23	509170 23	1	G	A	ENSG000000 62822	ENST000004 40232	ENSP000004 06046	<i>POLD1</i>	NM_002691 .3	c.2275G>A	p.V759I	rs145473 716	0,00 14



Diese Varianten wurden mittels bioinformatischer Prädiktionsprogramme in Bezug auf ihre mögliche Pathogenität und Konservierung charakterisiert und die zelluläre Funktion der kodierten Proteine bestimmt. Da die Analyse der Exomsequenzierungsdaten mittels dieser Filterstrategie nicht zur Identifizierung eines Kandidatengens und einer in Frage kommenden Sequenzveränderung führten, wurden die Filterkriterien nachfolgend modifiziert. Unter Annahme einer reduzierten Penetranz wurden in den Exomdatensätzen Varianten untersucht, die in beiden betroffenen Individuen heterozygot vorlagen, zusätzlich aber auch in einem der beiden klinisch als unauffällig beschriebenen Individuen Gö140 oder Gö144 vorkamen. Insgesamt wurden mit Hilfe dieser Strategie 99 Varianten in 97 unterschiedlichen Genen identifiziert (Tabelle 38).

Tabelle 38: Filterungsergebnis nach heterozygoten Varianten bei betroffenen sowie nicht betroffenen Individuen aus Familie LKG8.

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	964909 1	964909 1	1	A	C	ENSG000001 88807	ENST000003 40305	ENSP000003 44772	<i>TMEM201</i>	NM_001 010866.3	c.103A>C	p.I35L		
1	111340 43	111340 43	1	C	T	ENSG000001 71824	ENST000003 76936	ENSP000003 66135	<i>EXOSC10</i>	NM_001 001998.1	c.2105G> A	p.R702H	rs117771 172	0,00 31
1	111581 05	111581 05	1	C	T	ENSG000001 71824	ENST000003 04457	ENSP000003 07307	<i>EXOSC10</i>	NM_002 685.2	c.220G>A	p.E74K	rs626234 43	0,00 45
1	172947 88	172947 88	1	A	G	ENSG000000 58453	ENST000003 75541	ENSP000003 64691	<i>CROCC</i>	NM_014 675.3	c.4951A> G	p.T1651A		
1	189609 40	189609 40	1	C	T	ENSG000000 09709	ENST000004 00661	ENSP000003 83502	<i>PAX7</i>	NM_013 945.2	c.229C>T	p.R77C		
1	192096 82	192096 82	1	G	A	ENSG000001 59423	ENST000002 90597	ENSP000002 90597	<i>ALDH4A1</i>	NM_170 726.2	c.614C>T	p.A205V		
1	221555 21	221555 21	1	C	T	ENSG000001 42798	ENST000003 74695	ENSP000003 63827	<i>HSPG2</i>	NM_005 529.5	c.12044G >A	p.R4015H	rs150189 852	0,00 09
1	244336 52	244336 52	1	C	T	ENSG000001 42661	ENST000003 74434	ENSP000003 63557	<i>MYOM3</i>	NM_152 372.3	c.313G>A	p.G105S		0,00 02
1	265245 51	265245 51	1	A	G	ENSG000001 88782	ENST000004 56354	ENSP000003 90423	<i>CATSPER4</i>	NM_198 137.1	c.661A>G	p.I221V		
1	527031 69	527031 69	1	T	C	ENSG000001 57077	ENST000003 61625	ENSP000003 55358	<i>ZFYVE9</i>	NM_007 323.1	c.80T>C	p.V27A	rs413091 81	0,00 34

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	528235 46	528235 46	1	C	G	ENSG000001 54222	ENST000003 71586	ENSP000003 60642	<i>CC2D1B</i>	NM_032 449.2	c.1504G> C	p.V502L	rs763207 28	0,00 33
1	554577 62	554577 62	1	C	T	ENSG000001 43001	ENST000003 71268	ENSP000003 60315	<i>TMEM61</i>	NM_182 532.1	c.619C>T	p.R207W	rs777260 87	0,00 23
1	145555 756	145555 756	1	G	A	ENSG000001 98483	ENST000003 55594	ENSP000003 47802	<i>ANKRD35</i>	NM_144 698.3	c.104G>A	p.R35H	rs147155 265	0,00 11
1	173934 064	173934 064	1	C	T	ENSG000001 35870	ENST000003 67696	ENSP000003 56669	<i>RC3H1</i>	NM_172 071.2	c.1529G> A	p.R510Q		
1	186925 305	186925 305	1	A	G	ENSG000001 16711	ENST000003 67466	ENSP000003 56436	<i>PLA2G4A</i>	NM_024 420.2	c.1408A> G	p.M470V		
1	207644 133	207644 133	1	A	T	ENSG000001 17322	ENST000003 67057	ENSP000003 56024	<i>CR2</i>	NM_001 006658.2	c.1274A> T	p.H425L		
1	208315 787	208315 787	1	G	A	ENSG000000 76356	ENST000003 67033	ENSP000003 56000	<i>PLXNA2</i>	NM_025 179.3	c.1393C> T	p.H465Y		
1	213414 543	213414 543	1	A	G	ENSG000001 36643	ENST000003 66959	ENSP000003 55926	<i>RPS6KC1</i>	NM_001 136138.1	c.1688A> G	p.N563S	rs560608 94	0,00 46
1	216497 609	216497 609	1	T	-	ENSG000000 42781	ENST000003 07340	ENSP000003 05941	<i>USH2A</i>	NM_206 933.2	c.1229del A	p.E410Gfs *15		
1	222716 944	222716 944	1	C	A	ENSG000001 43512	ENST000003 43410	ENSP000003 42118	<i>HHIPL2</i>	NM_024 746.3	c.909G>T	p.K303N		
1	247050 595	247050 595	1	G	C	ENSG000001 53207	ENST000003 26225	ENSP000003 55465	<i>AHCTF1</i>	NM_015 446.4	c.2417C> G	p.S806C		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	246927 567	246927 567	1	C	T	ENSG000001 43653	ENST000003 66510	ENSP000003 55467		NM_016 002.2	c.1010C> T	p.T337M		
10	505307 60	505307 60	1	C	T	ENSG000001 77354	ENST000003 23868	ENSP000003 18713		NM_199 459.3	c.170C>T	p.P57L		
10	645730 46	645730 46	1	C	A	ENSG000001 22877	ENST000002 42480	ENSP000002 42480		NM_001 136178.1	c.1352G> T	p.G451V	rs138967 272	
10	706523 45	706523 45	1	G	A	ENSG000001 65730	ENST000003 99165	ENSP000003 82118		NM_001 130159.2	c.664G>A	p.D222N	rs185349 094	0,00 23
10	734757 60	734757 60	1	C	T	ENSG000002 14688	ENST000005 45760	ENSP000004 40187		NM_001 168390.1	c.335G>A	p.R112Q		
10	737681 62	737681 62	1	A	C	ENSG000001 22863	ENST000003 73115	ENSP000003 62207		NM_004 273.4	c.1373A> C	p.D458A		
11	490354 9	490354 9	1	C	G	ENSG000001 76900	ENST000003 80378	ENSP000003 69738		NM_001 004759.1	c.501C>G	p.D167E		0,00 01
11	580994 7	580994 7	1	A	G	ENSG000001 81001	ENST000003 17078	ENSP000003 22823		NM_001 001913.1	c.100T>C	p.C34R		0,00 01
11	124767 622	124767 622	1	C	T	ENSG000001 54133	ENST000003 06534	ENSP000003 04945		NM_019 055.5	c.70G>A	p.G24R		
12	562217 91	562217 91	1	G	A	ENSG000001 35392	ENST000003 57606	ENSP000003 50223		NM_032 364.5	c.652C>T	p.P218S		0,00 01
12	592768 03	592768 03	1	G	A	ENSG000001 39263	ENST000003 20743	ENSP000003 26759		NM_153 377.4	c.1328C> T	p.T443I		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
12	124297 768	124297 768	1	G	A	ENSG000001 97653	ENST000004 09039	ENSP000003 86770	<i>DNAH10</i>	NM_207 437.3	c.2848G> A	p.E950K		
13	250341 60	250341 60	1	C	T	ENSG000001 02699	ENST000003 81989	ENSP000003 71419	<i>PARP4</i>	NM_006 437.3	c.2248G> A	p.A750T		
13	392655 12	392655 12	1	G	A	ENSG000001 50893	ENST000002 80481	ENSP000002 80481	<i>FREM2</i>	NM_207 361.4	c.4031G> A	p.R1344H	rs143044 921	0,00 18
13	529520 51	529520 51	1	G	T	ENSG000001 36114	ENST000002 58613	ENSP000002 58613	<i>THSD1</i>	NM_018 676.3	c.2054C> A	p.T685K		
13	863697 81	863697 81	1	G	A	ENSG000001 84564	ENST000004 00286	ENSP000003 83143	<i>SLITRK6</i>	NM_032 229.2	c.863C>T	p.T288I		
14	207816 99	207816 99	1	T	C	ENSG000001 00814	ENST000004 37553	ENSP000004 09896	<i>CCNB1IP1</i>	NM_182 852.3	c.559A>G	p.T187A		
14	208471 44	208471 44	1	A	G	ENSG000001 29566	ENST000002 62715	ENSP000002 62715	<i>TEP1</i>	NM_007 110.4	c.5248T> C	p.C1750R		
14	212158 33	212158 33	1	G	C	ENSG000001 81562	ENST000003 26842	ENSP000003 15098	<i>EDDM3A</i>	NM_006 683.4	c.94G>C	p.E32Q	rs116985 083	0,00 18
14	754715 06	754715 06	1	C	T	ENSG000001 19718	ENST000002 66126	ENSP000002 66126	<i>EIF2B2</i>	NM_014 239.3	c.500C>T	p.T167I		
14	884781 12	884781 12	1	C	A	ENSG000001 40030	ENST000002 67549	ENSP000002 67549	<i>GPR65</i>	NM_003 608.3	c.921C>A	p.F307L		
14	884781 32	884781 32	1	C	T	ENSG000001 40030	ENST000002 67549	ENSP000002 67549	<i>GPR65</i>	NM_003 608.3	c.941C>T	p.T314I		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
15	578157 47	578157 47	1	A	T	ENSG000001 28849	ENST000002 81282	ENSP000002 81282	<i>CGNLI</i>	NM_032 866.4	c.2776A> T	p.S926C		0,00 01
15	635699 01	635699 01	1	A	G	ENSG000001 38613	ENST000002 61879	ENSP000002 61879	<i>APH1B</i>	NM_031 301.3	c.79A>G	p.T27A	rs778342 10	0,00 31
15	725582 74	725582 74	1	A	G	ENSG000001 37817	ENST000002 87196	ENSP000002 87196	<i>PARP6</i>	NM_020 214.2	c.140T>C	p.V47A		
15	783699 46	783699 46	1	C	A	ENSG000001 67202	ENST000003 00584	ENSP000003 00584	<i>TBC1D2B</i>	NM_144 572.1	c.49G>T	p.G17C		
15	801913 28	801913 28	1	C	T	ENSG000001 80953	ENST000004 85386	ENSP000004 53693	<i>ST20</i>	NM_001 199757.1	c.185G>A	p.G62D		
18	689053 8	689053 8	1	G	T	ENSG000000 88756	ENST000004 19673	ENSP000003 92660	<i>ARHGAP28</i>	NM_001 010000.2	c.1367G> T	p.R456L	rs744148 91	0,00 13
18	882527 1	882527 1	1	C	T	ENSG000001 68502	ENST000003 59865	ENSP000003 52927	<i>SOGA2</i>	NM_015 210.3	c.3763C> T	p.R1255C	rs115783 507	0,00 17
19	328457 03	328457 03	1	T	A	ENSG000001 68813	ENST000003 11921	ENSP000003 12277	<i>ZNF507</i>	NM_014 910.4	c.1967T> A	p.I656N		
19	348846 47	348846 47	1	G	A	ENSG000001 05220	ENST000003 56487	ENSP000003 48877	<i>GPI</i>	NM_000 175.3	c.880G>A	p.E294K		
19	354499 51	354499 51	1	C	T	ENSG000001 80884	ENST000004 04801	ENSP000003 85099	<i>ZNF792</i>	NM_175 872.4	c.808G>A	p.V270I		
19	362782 64	362782 64	1	C	T	ENSG000000 04777	ENST000003 14737	ENSP000003 20038	<i>ARHGAP33</i>	NM_052 948.3	c.2314C> T	p.R772C		0,00 01

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
19	432429 65	432429 65	1	C	T	ENSG000002 21826	ENST000003 27495	ENSP000003 32215	<i>PSG3</i>	NM_021 016.3	c.341G>A	p.R114Q		0,00 01
19	436892 28	436892 28	1	A	T	ENSG000002 04941	ENST000003 42951	ENSP000003 44413	<i>PSG5</i>	NM_002 781.3	c.136T>A	p.S46T		
19	443768 94	443768 94	1	C	A	ENSG000001 76222	ENST000003 24394	ENSP000003 19479	<i>ZNF404</i>	NM_001 033719.2	c.1466G> T	p.G489V		
19	588683 98	588683 98	1	T	C	ENSG000001 74586	ENST000003 11044	ENSP000003 11183	<i>ZNF497</i>	NM_198 458.2	c.604A>G	p.S202G	rs148776 391	0,00 02
2	653097 65	653097 65	1	A	G	ENSG000000 11523	ENST000003 77990	ENSP000003 67229	<i>CEP68</i>	NM_015 147.2	c.2200A> G	p.M734V		0,00 05
2	120219 444	120219 444	1	C	T	ENSG000000 80293	ENST000000 19103	ENSP000000 19103	<i>SCTR</i>	NM_002 980.2	c.769G>A	p.G257R		
20	377827 0	377827 0	1	G	A	ENSG000001 01224	ENST000003 40833	ENSP000003 39170	<i>CDC25B</i>	NM_021 872.2	c.202G>A	p.E68K		
20	302844 7	302844 7	1	C	T	ENSG000001 25901	ENST000003 80325	ENSP000003 69682	<i>MRPS26</i>	NM_030 811.3	c.550C>T	p.R184W		
20	477129 30	477129 30	1	G	T	ENSG000001 24207	ENST000003 96192	ENSP000003 79495	<i>CSE1L</i>	NM_001 256135.1	c.2703G> T	p.Q901H	rs353674 15	0,00 45
20	478740 63	478740 63	1	T	C	ENSG000001 24201	ENST000003 71752	ENSP000003 60817	<i>ZNFX1</i>	NM_021 035.2	c.2555A> G	p.E852G	rs617299 93	0,00 26
3	473188 64	473188 64	1	T	G	ENSG000000 88727	ENST000004 44589	ENSP000004 14987	<i>KIF9</i>	NM_022 342.4	c.1A>C	p.M1L		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
3	653649 81	653649 81	1	C	T	ENSG000001 51276	ENST000004 83466	ENSP000004 20323	<i>MAG11</i>	NM_004 742.2	c.3034G> A	p.V1012I		
3	664281 27	664281 27	1	G	A	ENSG000001 44741	ENST000003 36733	ENSP000003 36801	<i>SLC25A26</i>	NM_001 164796.1	c.457G>A	p.V153I	rs145474 090	
3	731117 47	731117 47	1	C	T	ENSG000002 55423	ENST000005 33473	ENSP000004 32104	<i>EBLN2</i>	NM_018 029.3	c.515C>T	p.P172L		
3	121204 025	121204 025	1	G	A	ENSG000000 51341	ENST000002 64233	ENSP000002 64233	<i>POLQ</i>	NM_199 420.3	c.5636C> T	p.S1879L	rs147121 503	0,00 03
3	121305 265	121305 265	1	C	T	ENSG000001 86103	ENST000003 34384	ENSP000003 35578	<i>ARGFX</i>	NM_001 012659.1	c.766C>T	p.P256S		
3	121342 168	121342 168	1	C	T	ENSG000001 63833	ENST000003 38040	ENSP000003 37510	<i>FBXO40</i>	NM_016 298.3	c.1892C> T	p.T631I	rs147922 715	0,00 01
3	130403 162	130403 162	1	C	T	ENSG000001 96455	ENST000003 56763	ENSP000003 49205	<i>PIK3R4</i>	NM_014 602.2	c.3539G> A	p.C1180Y		
3	178968 568	178968 568	1	A	C	ENSG000001 71121	ENST000003 14235	ENSP000003 19370	<i>KCNMB3</i>	NM_014 407.3	c.223T>G	p.L75V	rs227680 2	0,00 36
4	208343 8	208343 8	1	G	T	ENSG000001 30997	ENST000003 82865	ENSP000003 72316	<i>POLN</i>	NM_181 808.2	c.2230C> A	p.P744T	rs145784 942	0,00 07
4	552709 2	552709 2	1	A	G	ENSG000000 82929	ENST000001 95455	ENSP000001 95455	<i>C4orf6</i>	NM_005 750.2	c.35A>G	p.N12S		
4	687253 92	687253 92	1	C	T	ENSG000001 53802	ENST000002 83916	ENSP000002 83916	<i>TMPRSS11D</i>	NM_004 262.2	c.13G>A	p.A5T	rs144036 048	0,00 02



Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
4	110740 184	110740 184	1	A	G	ENSG000001 09534	ENST000002 26796	ENSP000002 26796		NM_032 993.2	c.397A>G	p.M133V		
4	175897 169	175897 169	1	G	A	ENSG000001 68594	ENST000004 04450	ENSP000003 84229		NM_014 269.4	c.493G>A	p.G165R		
5	132085 115	132085 115	1	G	C	ENSG000002 05089	ENST000003 78731	ENSP000003 68005		NM_001 039780.2	c.633+1G >C		rs140882 152	0,00 11
5	140047 854	140047 854	1	A	C	ENSG000001 20314	ENST000003 58337	ENSP000003 51100		NM_017 706.4	c.227A>C	p.E76A		
5	140202 608	140202 608	1	C	A	ENSG000002 04965	ENST000005 29859	ENSP000004 36557		NM_018 908.2	c.1248C> A	p.S416R		
5	140214 974	140214 974	1	G	C	ENSG000002 04963	ENST000003 78125	ENSP000003 67365		NM_031 852.1	c.1006G> C	p.V336L	rs149493 398	
5	140625 897	140625 897	1	G	A	ENSG000001 13248	ENST000002 31173	ENSP000002 31173		NM_018 935.2	c.751G>A	p.V251I		
5	140755 803	140755 803	1	G	T	ENSG000002 53731	ENST000005 17434	ENSP000004 29601		NM_032 086.1	c.2153G> T	p.R718L		0,00 01
6	279250 76	279250 76	1	C	G	ENSG000001 24657	ENST000002 44623	ENSP000002 44623		NM_012 367.1	c.58C>G	p.R20G	rs150850 606	0,00 06
6	296413 97	296413 97	1	C	T	ENSG000002 04644	ENST000004 88757	ENSP000004 18259		NM_001 109809.2	c.491G>A	p.R164Q		0,00 11
6	303083 26	303083 26	1	A	G	ENSG000002 04599	ENST000003 96548	ENSP000003 79797		NM_172 016.2	c.848A>G	p.E283G	rs142278 420	0,00 07

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
<b>6</b>	303145 66	303145 67	2	TC	GA	ENSG000002 41370	ENST000004 42966	ENSP000004 03833	<i>RPP21</i>	NM_024 839.2	c.444_445 delT- CinsGA	p.Q149K	rs352871 37	
<b>6</b>	306406 09	306406 09	1	G	C	ENSG000002 04560	ENST000003 76442	ENSP000003 65625	<i>DHX16</i>	NM_003 587.4	c.10C>G	p.P4A	rs141617 781	
<b>6</b>	136687 151	136687 151	1	G	A	ENSG000001 35525	ENST000003 54570	ENSP000003 46581	<i>MAP7</i>	NM_003 980.4	c.995C>T	p.P332L	rs141768 328	0,00 09
<b>8</b>	797104 02	797104 02	1	C	T	ENSG000001 04432	ENST000002 63851	ENSP000002 63851	<i>IL7</i>	NM_001 199887.1	c.52G>A	p.V18I		
<b>8</b>	131848 523	131848 523	1	T	G	ENSG000001 55897	ENST000002 86355	ENSP000002 86355	<i>ADCY8</i>	NM_001 115.2	c.2675A> C	p.E892A		
<b>8</b>	144332 449	144332 449	1	G	A	ENSG000002 64668	ENST000005 22452	ENSP000004 28966	<i>ZFP41</i>	NM_173 832.3	c.436G>A	p.G146R	rs150904 855	0,00 02
<b>9</b>	428640 6	428640 6	1	C	G	ENSG000001 07249	ENST000003 81971	ENSP000003 71398	<i>GLIS3</i>	NM_001 042413.1	c.20G>C	p.S7T		
<b>9</b>	187069 86	187069 86	1	G	A	ENSG000001 78031	ENST000003 80548	ENSP000003 69921	<i>ADAMTSL1</i>	NM_001 040272.5	c.1816G> A	p.D606N		
<b>9</b>	326321 57	326321 57	1	C	T	ENSG000001 22728	ENST000002 42310	ENSP000004 18379	<i>TAFIL</i>	NM_153 809.2	c.3421G> A	p.E1141K		
<b>X</b>	464665 87	464665 87	1	C	T	ENSG000000 65923	ENST000003 28306	ENSP000003 30320	<i>SLC9A7</i>	NM_032 591.2	c.1978G> A	p.D660N		0,00 01

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
<b>X</b>	479202 87	479202 87	1	G	A	ENSG000002 21994	ENST000004 09324	ENSP000003 86393	<i>ZNF630</i>	NM_001 037735.2	c.53C>T	p.T18M		0
<b>X</b>	480471 34	480471 34	1	C	G	ENSG000001 65583	ENST000003 11798	ENSP000003 12415	<i>SSX5</i>	NM_021 015.3	c.623G>C	p.R208T		

Die nachfolgende Charakterisierung dieser Varianten hinsichtlich der Funktion der kodierten Proteine sowie des funktionellen Effekts der Veränderungen führten zur Identifizierung einer Variante, die als potenziell ursächliche Variante in Betracht gezogen wurde. Dabei handelte es sich um die heterozygote Variante c.229C>T im *PAX7*-Gen. Diese Veränderung führt dazu, dass auf Aminosäureebene an Position 77 des *PAX7*-Proteins ein Arginin durch ein Cystein substituiert (p.Arg77Cys) wird.

Zur Bestätigung der Variante und zur Ko-Segregationsanalyse innerhalb der Familie LKG8 wurde das Exon 2 des *PAX7*-Gens, in welchem die heterozygote Veränderung lokalisiert ist, bei den betroffenen und nicht betroffenen Individuen der Familie amplifiziert und mittels Sanger-Sequenzierung analysiert (Abbildung 16).

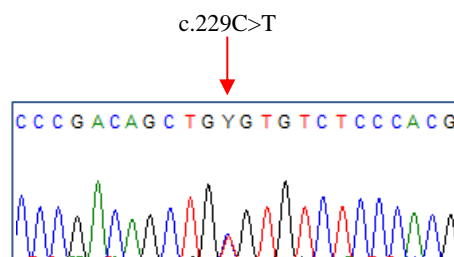


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der in Familie LKG8 identifizierten Sequenzveränderung c.229C>T im *PAX7*-Gen.

Die Abbildung zeigt die Sequenzveränderung für Patienten Gö137.

Diese Analyse bestätigte das Vorhandensein der c.229C>T Variante in drei von vier betroffenen Individuen (Gö137, Gö139, Gö141) der Familie, von denen DNA-Proben zur Untersuchung vorlagen. Bei drei von vier gesunden Familienmitgliedern konnte die Variante dagegen nicht nachgewiesen werden (Gö138, Gö140, Gö143, vgl. dazu die Stammbäume in Abbildung 4, Abbildung 15 und Abbildung 17).

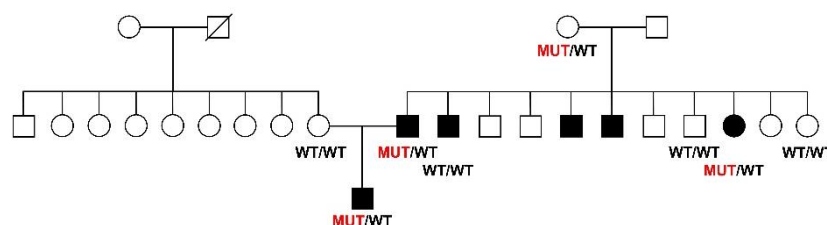


Abbildung 17: Stammbaum der Familie LKG8 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte; Ko-Segregation.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; MUT= Mutation; WT=Wildtyp.

Die bioinformatische Charakterisierung der Auswirkung dieser Veränderung unter Verwendung verschiedener Prädiktionsprogramme ergab, dass diese Variante als pathogen eingeschätzt wurde (Tabelle 39).

Tabelle 39: Übersicht der in Familie LKG8 identifizierten Variante in *PAX7* und ihre Charakterisierung mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme.

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Allelfrequenz (gnomAD)	Prädiktion			
						SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	CADD
chr5:140866189	<i>PAX7</i>	ENST00000375375	c.229C>T	p.(Arg77Cys)	0.0000279	D	PD	DC	31

D, deleterious; PD, probably damaging, DC, disease causing.

Bei *PAX7* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle während der embryologischen Entwicklung, insbesondere im Rahmen der Neuralleisten-Induktion, spielt (Relaix et al. 2005). Im Jahre 2015 beschrieben Leslie et al. (2015) eine Variante in der Homöobox-Domäne des *PAX7*-Gens in einer Patientin mit einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, die die transaktivierenden Eigenschaften von *PAX7* beeinflusst und von den Autoren als möglicherweise ursächlich klassifiziert wurde. Weitere Patienten mit Veränderungen in diesem Gen wurden bislang in der wissenschaftlichen Literatur nicht beschrieben. Die im Rahmen meiner Arbeit identifizierte Veränderung p.Arg77Cys ist innerhalb der N-terminalen *paired-box* Domäne des Proteins lokalisiert, welche die Bindung des Transkriptionsfaktors an die Zielsequenzen innerhalb der DNA vermittelt (Abbildung 18).

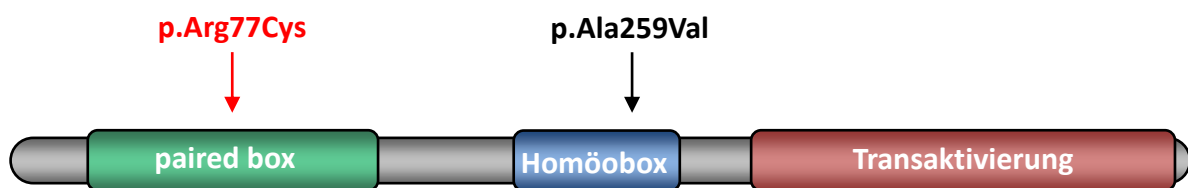


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors *PAX7* sowie der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Veränderungen p.Arg77Cys (rot) und der von Leslie et al. beschriebenen Variante p.Ala259Val (schwarz) in *PAX7*.

(Quelle: modifiziert nach Leslie et al. (2015)).

Mit dem Programm Clustal Omega wurde nachfolgend die Konservierung der veränderten Aminosäure sowohl innerhalb der Proteinfamilie der humanen *PAX*-Proteine als auch speziesübergreifend untersucht (Abbildung 19, Abbildung 20).

Die Analyse zeigte, dass es sich bei dem Arginin an Position 77 um eine evolutionär sowohl speziesübergreifend als auch innerhalb der humanen *PAX*-Proteinfamilie hochkonservierte Aminosäure handelt, die innerhalb der *paired-box* Domäne des *PAX7*-Proteins lokalisiert ist. Diese hohe Konservierung wurde ebenso für die direkte Umgebung der Aminosäure vorhergesagt. Um die kausale Relevanz dieser Veränderung weitergehend einzuordnen und zu bestätigen, wurde diese Veränderung nachfolgend mittels eines Luciferase-basierten Reporter-Gen Assays funktionell charakterisiert.

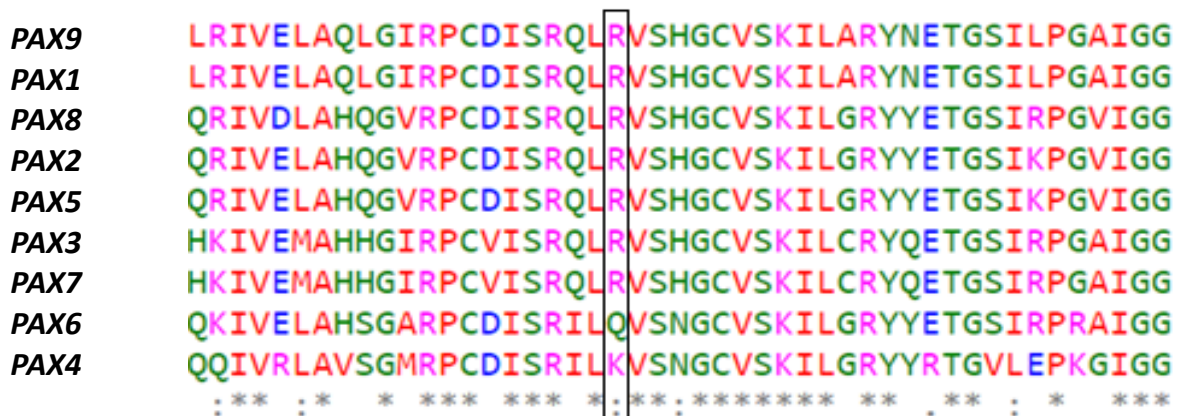


Abbildung 5: Konservierung der Aminosäureposition 77 in *PAX7* im Vergleich zu anderen Mitgliedern der humanen *PAX*-Familie.

Der Sequenzvergleich sowie die Bestimmung der Konservierung erfolgte mit dem Programm Clustal Omega. Schwarz eingeraht die Aminosäure an Position 77 in *PAX7*.

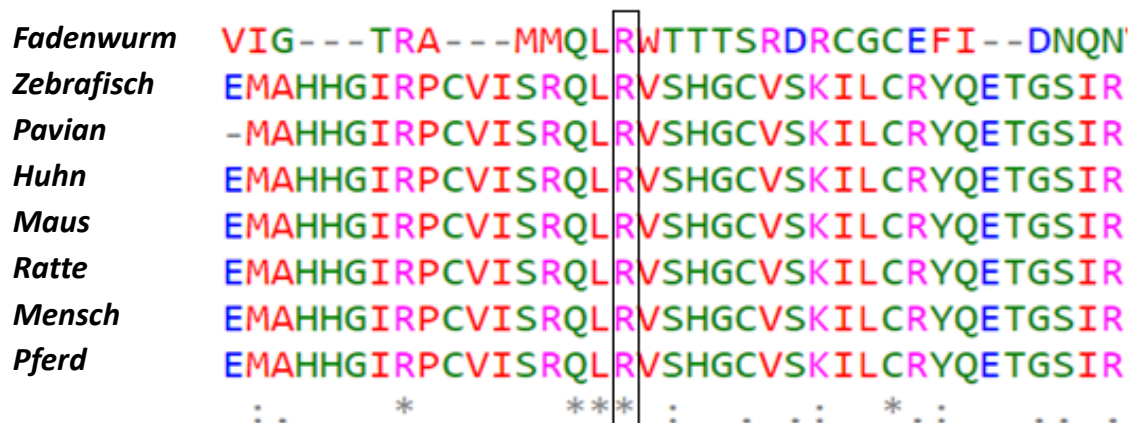


Abbildung 6: Speziesübergreifender Vergleich der Konservierung der Aminosäureposition 77 des humanen *PAX7*-Proteins.

Der Sequenzvergleich erfolgte mit dem Programm Clustal Omega. Schwarz eingeraht die Aminosäure an Position 77 des humanen *PAX7*.

### 3.2.1.1 Reportergen Assay

*Paired-box* (*PAX*) Gene kodieren für eine Familie von gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung und in der Differenzierung von Geweben spielen. In Säugetieren umfasst die Familie der *PAX*-Proteine neun Mitglieder (*PAX1* – *9*), deren gemeinsames Merkmal die *paired-box*-Domäne sowie eine partielle oder vollständige Homöobox-Domäne ist, über die die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Zielsequenzen in der DNA vermittelt wird. Zur Untersuchung, ob die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Variante in der N-Terminalen *paired-box*-Domäne von *PAX7* die Expression der *PAX7*-Zielgene beeinträchtigt, wurde ein Luciferase Reportergen Assay durchgeführt. Dazu wurden zunächst die kodierenden Sequenzen für wildtypisches *PAX7* sowie der Variante c.229C>T (p.Arg77Cys), die in dieser Arbeit identifiziert wurde, sowie der von Leslie et al. (2015) beschriebenen Variante c.766C>T (p.Ala259Val) in den Expressionvektor pcDNA3.1 kloniert. Zusätzlich wurde die Promotorregion des murinen *Id3*-Gens, einer Zielsequenz, an die die Bindung *PAX7* und die nachfolgende Aktivierung der Genexpression bereits beschrieben wurde, von Position -1 bis -2222 (bezogen auf das Start-ATG des *Id3*-gens) in den Vektor pGL3-basic [luc+] kloniert. Nachfolgend wurde HeLa-Zellen mit dem *Id3*-Promotor-Reportergenkonstrukt sowie zusätzlich mit einem der pcDNA3-Expressionsvektoren für wildtypisches *PAX7*, *PAX7* p.Arg77Cys oder *PAX7* p.Ala259Val transfiziert (vgl. Kapitel 2.2.22). Zusätzlich wurden als Kontrolle Zellen entweder nur mit dem pcDNA3.1 *lacZ* Plasmid (Negativkontrolle) oder dem *Id3*-Promotor-Reportergenkonstrukt allein zur Bestimmung der basalen Aktivierung der Reportergenkonstrukts transfiziert. Als interne Transfektionskontrolle wurden alle Ansätze zusätzlich mit dem Expressionskonstrukt pRL-TK ko-transfiziert, welches für die *Renilla*-Luciferase kodiert. Das transaktivierende Potential der unterschiedlichen *PAX7*-Varianten wurde über die Luciferase-Expression mittels Bestimmung der Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Alle Transfektionen wurde für jedes Experiment im Triplikat durchgeführt und die Luciferase-Aktivität wurde insgesamt in vier unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Mittelwerte der relativen Luciferase-Aktivität für alle vier Experimente sind in Tabelle 40 zusammengefasst.

Tabelle 40: Tabellarische Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität.

Die Mittelwerte der in Triplikaten gemessenen relativen Luciferase-Aktivität (Firefly-Luciferase/Renilla-Luciferase) ist für jedes der vier durchgeführten Experimente angegeben.

Ansatz	1. Experiment	2. Experiment	3. Experiment	4. Experiment
(1) pGL3-basic [luc+] (-)	0,0026	0,01484	0,02175	0,01841
(2) pGL3-basic-Id3 (K)	0,73278	0,39083	0,50961	0,57667
(3) PAX7 WT	11,54603	8,02878	8,04272	8,85822
(4) PAX7 p.Arg77Cys	9,72234	6,44509	8,45928	8,11803
(5) PAX7 p.Ala259Val	11,3965	7,78027	9,13324	8,91654

Für den Kontroll-Vektor pcDNA3.1 *lacZ* lag die relative Luciferase-Aktivität erwartungsgemäß in allen vier Experimenten bei 0 (nicht dargestellt). Ebenso wurden für die Negativkontrolle (pGL3-basic [luc+]; -), bei dem ein Luciferase-Reporter-Konstrukt transfiziert wurde, das nicht die *Id3*-Promotorregion enthält, Messwerte  $\pm 0$  ermittelt (vgl. Tabelle 40). Zellen, die lediglich mit dem Reporterplasmid pGL3-basic-Id3 transfiziert wurden, weisen bereits eine geringe Luciferase-Aktivität auf (vgl. Tabelle 40, Ansatz 2). Diese ist auf die Expression von endogenen *PAX7* in den Zellen zurückzuführen, welches ebenfalls transaktivierend auf das Reporterplasmid wirkt. Um diese endogene Expression von *PAX7* zu berücksichtigen, wurden im Rahmen der Analyse der Daten zunächst die Ergebnisse für jedes Experiment auf die ermittelte relative Luciferase-Aktivität der Kontrolle (K, pGL3-basic-Id3 [luc+]) normalisiert und alle übrigen Werte in Relation zu diesem Ansatz angegeben (vgl. Tabelle 41). Diese Normalisierung gewährleistet die Berücksichtigung von endogen in den Zellen gebildeten und funktionellem *PAX7*.

Tabelle 41: Tabellarische Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität normalisiert auf die relative Luciferase-Aktivität der Kontrolle (K) pGL3-basic-Id3 eines jeden Experiments.

Ansatz	1. Experiment	2. Experiment	3. Experiment	4. Experiment
(2) pGL3-basic-Id3 (K)	1	1	1	1
(3) PAX7 WT	15,76	20,54	15,78	15,36
(4) PAX7 p.Arg77Cys	13,27	16,49	16,60	14,08
(5) PAX7 p.Ala259Val	15,55	19,90	17,92	15,46



Die ermittelten normalisierten relativen Luciferase-Aktivitäten aus allen vier Experimenten wurden nachfolgend gemittelt (Abbildung 21).

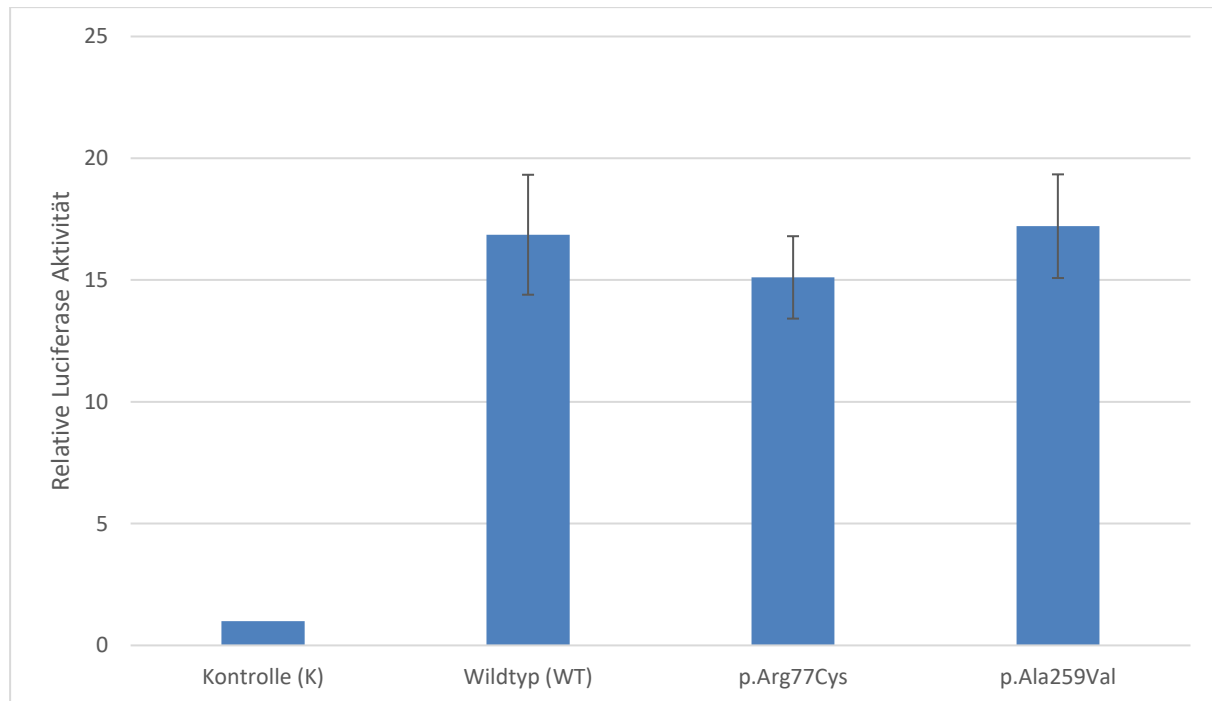


Abbildung 21: Graphische Darstellung der gemittelten, normalisierten relativen Luciferase-Aktivität.

Alle Zellen wurden mit dem Reporter-gen-Konstrukt pGL3-basic-Id3 [luc+] sowie Expressionsvektoren für wildtypisches (WT) oder mutiertes (p.Arg77Cys oder p.Ala259Val) *PAX7* transfiziert. Die gemessenen absoluten Werte der firefly-Luciferase-Aktivitäten wurden mit den entsprechenden Renilla-Luciferase-Aktivitäten normalisiert. Die relative Luciferase-Aktivität der Kontrolle (K) wurde gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte in Relation zu dieser Probe für jedes der vier durchgeführten Experimente bestimmt.

Die Expression von wildtypischen *PAX7* führt in den HeLa-Zellen zu einer deutlich, etwa 16,8-fachen ( $\pm 2,4$ ) erhöhten Luciferase-Aktivität, verglichen mit der Luciferase-Aktivität, die bei der Transfektion mit dem Reportgen-Konstrukt durch endogen in den Zellen vorhandenes *PAX7* erreicht wurde (Kontrolle; K). Die Überexpression von *PAX7* mit der Veränderung p.Arg77Cys, die im Rahmen dieser Arbeit bei in der Familie LKG8 identifiziert wurde, führte ebenfalls zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität, allerdings in einem etwas geringeren Ausmaß (etwa 15,1-fach  $\pm 1,7$ ). Die Überexpression von *PAX7* mit der durch Leslie et al. (2015) beschriebenen Veränderung p.Ala259Val führte zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität auf das 17,2fache ( $\pm 2,1$ ) verglichen mit der Kontrolle K. Zusammenfassend konnte für beide mu-

tanten *PAX7*-Proteine gezeigt werden, dass die Luciferase-Aktivitäten etwa der von wildtypischem *PAX7* entsprachen. Für *PAX7* p.Arg77Cys konnte zwar eine leichte Reduktion der gemessenen Luciferase-Aktivität ermittelt werden, allerdings lag in diesem Fall keine statistisch signifikante Abweichung von den Werten des wildtypischen *PAX7* vor.

### 3.2.2 Familie LKG11

Analog zur genetischen Untersuchung, welche für Familie LKG8 in Kapitel 3.2.1 beschrieben wurde, wurde auch bei Familie LKG11 eine Exomsequenzierung mit dem Ziel der Identifizierung einer ursächlichen genetischen Veränderung für das Auftreten von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten durchgeführt. Dazu wurde mittels DNA der betroffenen Individuen Gö133 und Gö135 eine Exomsequenzierung durchgeführt und die erhaltenen genetischen Daten wurden mit Hilfe der Software Varbank unter der Annahme eines autosomal dominanten, vollständig penetranten Erbgangs analysiert (vgl. Abbildung 5 und Abbildung 22).

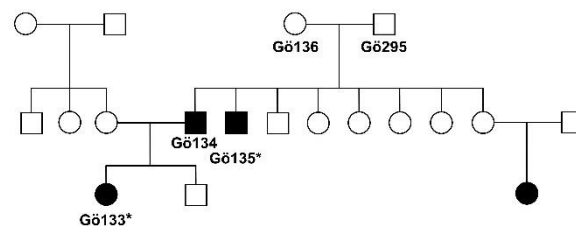


Abbildung 22: Stammbaum der Familie LKG11 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

Insgesamt führte diese Filterstrategie zur Identifizierung von 256 Varianten (Tabelle 42).

Tabelle 42: Filterungsergebnis in Familie LKG11.

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	11134043	11134043	1	C	T	ENSG00000171824	ENST00000376936	ENSP00000366135	<i>EXOSC10</i>	NM_001001998.1	c.2105G>A	p.R702H	rs117771172	0,0031
1	11158105	11158105	1	C	T	ENSG00000171824	ENST00000304457	ENSP00000307307	<i>EXOSC10</i>	NM_002685.2	c.220G>A	p.E74K	rs62623443	0,0045
1	12336917	12336917	1	G	A	ENSG00000048707	ENST00000358136	ENSP00000350854	<i>VPS13D</i>	NM_015378.2	c.3272G>A	p.C1091Y		0,0001
1	16262465	16262465	1	A	C	ENSG00000065526	ENST00000375759	ENSP00000364912	<i>SPEN</i>	NM_015001.2	c.9730A>C	p.T3244P		
1	16381951	16381951	1	T	C	ENSG00000184908	ENST00000375679	ENSP00000364831	<i>CLCNKB</i>	NM_000085.4	c.1778T>C	p.I593T		
1	20678646	20678646	1	G	A	ENSG00000158816	ENST00000375089	ENSP00000364230	<i>VWA5B1</i>	NM_001039500.2	c.3137G>A	p.S1046N		
1	22174190	22174190	1	G	A	ENSG00000142798	ENST00000374695	ENSP00000363827	<i>HSPG2</i>	NM_005529.5	c.8017C>T	p.R2673*		
1	45250167	45250167	1	A	G	ENSG00000142959	ENST00000372207	ENSP00000361281	<i>BEST4</i>	NM_153274.2	c.1149-12T>C			
1	55251796	55251796	1	G	A	ENSG00000006555	ENST00000371274	ENSP00000360321	<i>TTC22</i>	NM_017904.3	c.880C>T	p.Q294*		
1	55643810	55643810	1	C	T	ENSG00000162402	ENST00000294383	ENSP00000294383	<i>USP24</i>	NM_015306.2	c.325-5G>A			

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	75677 174	75677 174	1	C	G	ENSG000 00137968	ENST000 00370859	ENSP0000 0359896	<i>SLC44A5</i>	NM_0011300 58.1	c.2026G>C	p.E676Q		
1	16702 5002	16702 5002	1	G	A	ENSG000 00143167	ENST000 00367868	ENSP0000 0356842	<i>GPA33</i>	NM_005814.1	c.656C>T	p.T219M		0,0 001
1	18631 3197	18631 3197	1	C	T	ENSG000 00047410	ENST000 00367478	ENSP0000 0356448	<i>TPR</i>	NM_003292.2	c.3443G>A	p.R1148 H		0,0 011
1	20668 1098	20668 1098	1	G	A	ENSG000 00136653	ENST000 00367117	ENSP0000 0356084	<i>RASSF5</i>	NM_182664.2	c.163G>A	p.G55R		
1	20710 6388	20710 6388	1	G	A	ENSG000 00162896	ENST000 00356495	ENSP0000 0348888	<i>PIGR</i>	NM_002644.3	c.1829C>T	p.A610V		
1	22353 6703	22353 6723	21	(TGC)7	(TGC)6	ENSG000 00143502	ENST000 00343846	ENSP0000 0344219	<i>SUSD4</i>	NM_017982.3	c.45_65del(GCA )7ins(GCA)6	p.Q22del	rs1439 29528	
1	22836 2386	22836 2386	1	C	A	ENSG000 00181873	ENST000 00366711	ENSP0000 0355672	<i>IBA57</i>	NM_0010108 67.2	c.342-7C>A			
1	22844 4563	22844 4565	3	GGT	AGA	ENSG000 00154358	ENST000 00284548	ENSP0000 0284548	<i>OBSCN</i>	NM_052843.2	c.4521_4523del GGTinsAGA	p.V1508 D		
1	22973 8579	22973 8579	1	G	A	ENSG000 00135801	ENST000 00366676	ENSP0000 0355636	<i>TAF5L</i>	NM_014409.3	c.335C>T	p.P112L		
1	23049 2801	23049 2801	1	C	T	ENSG000 00177614	ENST000 00391860	ENSP0000 0375733	<i>PGBD5</i>	NM_0012583 11.1	c.253G>A	p.A85T	rs4131 5609	0,0 044

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	23079 8876	23079 8878	3	GTC	(T)3	ENSG000 00135775	ENST000 00366669	ENSP0000 0355629	COG2	NM_007357.2	c.301- 9_11delGTCins( T)3			
1	23093 0967	23093 0967	1	G	T	ENSG000 00135773	ENST000 00271971	ENSP0000 0271971	CAPN9	NM_006615.2	c.1929G>T	p.E643D	rs1459 39347	0,0 017
10	14816 378	14816 378	1	G	C	ENSG000 00065809	ENST000 00181796	ENSP0000 0181796	FAM107B	NM_031453.2	c.285C>G	p.H95Q	rs1441 31218	0,0 027
10	89621 800	89621 800	1	A	T	ENSG000 00227268	ENST000 00445946	ENSP0000 0392204	KLLN	NM_0011260 49.1	c.445T>A	p.W149R	rs1448 11392	0,0 05
10	89621 853	89621 853	1	T	C	ENSG000 00227268	ENST000 00445946	ENSP0000 0392204	KLLN	NM_0011260 49.1	c.392A>G	p.N131S	rs1479 32146	0,0 05
10	89621 863	89621 863	1	G	C	ENSG000 00227268	ENST000 00445946	ENSP0000 0392204	KLLN	NM_0011260 49.1	c.382C>G	p.R128G		
10	97445 323	97445 323	1	A	G	ENSG000 00119977	ENST000 00265993	ENSP0000 0265993	TCTN3	NM_015631.5	c.959T>C	p.V320A		
10	99141 192	99141 192	1	C	T	ENSG000 00052749	ENST000 00370992	ENSP0000 0360031	RRP12	NM_015179.3	c.1369G>A	p.V457M	rs1394 84717	0,0 005
10	99150 569	99150 569	1	G	A	ENSG000 00052749	ENST000 00370992	ENSP0000 0360031	RRP12	NM_015179.3	c.563C>T	p.S188F		
10	10114 7624	10114 7624	1	C	G	ENSG000 00119946	ENST000 00356713	ENSP0000 0349147	CNNMI	NM_020348.2	c.2388C>G	p.D796E		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
10	11597 1741	11597 1741	1	A	G	ENSG000 00095627	ENST000 00251864	ENSP0000 0251864	<i>TDRD1</i>	NM_198795.1	c.1777A>G	p.I593V	rs1454 41323	0,0 005
10	11603 2567	11603 2567	1	A	G	ENSG000 00165816	ENST000 00298715	ENSP0000 0298715	<i>VWA2</i>	NM_198496.1	c.440A>G	p.N147S		
10	12078 9494	12078 9494	1	C	T	ENSG000 00188613	ENST000 00425699	ENSP0000 0393275	<i>NANOS1</i>	NM_199461.2	c.181C>T	p.P61S		
10	12439 2814	12439 2814	1	G	A	ENSG000 00187908	ENST000 00368956	ENSP0000 0357952	<i>DMBT1</i>	NM_004406.2	c.4234G>A	p.V1412 M		
10	12459 8653	12459 8653	1	T	C	ENSG000 00138161	ENST000 00545804	ENSP0000 0441590	<i>CUZD1</i>	NM_022034.5	c.328A>G	p.N110D		
11	99375 0	99375 0	1	C	G	ENSG000 00183020	ENST000 00448903	ENSP0000 0413234	<i>AP2A2</i>	NM_012305.3	c.1551-4C>G			0,0 002
11	10286 65	10286 65	1	C	G	ENSG000 00184956	ENST000 00421673	ENSP0000 0406861	<i>MUC6</i>	NM_005961.2	c.1572G>C	p.Q524H		0,0 003
11	15795 19	15795 19	1	C	G	ENSG000 00184545	ENST000 00397374	ENSP0000 0380530	<i>DUSP8</i>	NM_004420.2	c.538-18G>C			
11	49035 49	49035 49	1	C	G	ENSG000 00176900	ENST000 00380378	ENSP0000 0369738	<i>OR51T1</i>	NM_0010047 59.1	c.501C>G	p.D167E		0,0 001
11	26681 857	26681 857	1	G	A	ENSG000 00134343	ENST000 00256737	ENSP0000 0256737	<i>ANO3</i>	NM_031418.2	c.2812G>A	p.V938I		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
11	28232 586	28232 597	12	(TTT-TCT)2	TTT-TCT	ENSG00000169519	ENST00000303459	ENSP00000307251	<i>METTL15</i>	NM_152636.2	c.271-12_23del(TTT-TCT)2insTTT-TCT			
11	31815 056	31815 056	1	G	C	ENSG00000007372	ENST00000379107	ENSP00000368401	<i>PAX6</i>	NM_001604.5	c.1004C>G	p.A335G		
11	65784 653	65784 653	1	T	G	ENSG00000175294	ENST00000312106	ENSP00000309052	<i>CATSPER1</i>	NM_053054.3	c.2202-8A>C			
11	65784 657	65784 657	1	C	G	ENSG00000175294	ENST00000312106	ENSP00000309052	<i>CATSPER1</i>	NM_053054.3	c.2202-12G>C			
11	95595 495	95595 495	1	C	T	ENSG000000087053	ENST00000393223	ENSP00000376915	<i>MTMR2</i>	NM_201281.2	c.82G>A	p.A28T		0,0 001
11	13028 1380	13028 1380	1	C	G	ENSG00000134917	ENST00000257359	ENSP00000257359	<i>ADAMTS8</i>	NM_007037.4	c.1682G>C	p.G561A		
11	13029 8118	13029 8141	24	(GCA)8	(GCA)7	ENSG00000134917	ENST00000257359	ENSP00000257359	<i>ADAMTS8</i>	NM_007037.4	c.41_64del(TGC)8ins(TGC)7	p.L21del	rs7216 1928	
12	36497 91	36497 92	2	AG	(C)2	ENSG00000111218	ENST00000382622	ENSP00000372067	<i>PRMT8</i>	NM_019854.4	c.95_96delAG-ins(C)2	p.Q32P		
12	73032 11	73032 11	1	C	T	ENSG00000139182	ENST00000266546	ENSP00000266546	<i>CLSTN3</i>	NM_014718.3	c.2317C>T	p.L773F		
12	10783 893	10783 893	1	G	A	ENSG000000060140	ENST000000075503	ENSP00000075503	<i>STYK1</i>	NM_018423.2	c.202C>T	p.P68S	rs1401 74760	0,0 003

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
12	33003 706	33003 706	1	T	C	ENSG000 00057294	ENST000 00070846	ENSP0000 0070846	<i>PKP2</i>	NM_004572.3	c.1372A>G	p.I458V		
12	40345 102	40345 102	1	C	T	ENSG000 00151229	ENST000 00280871	ENSP0000 0280871	<i>SLC2A13</i>	NM_052885.3	c.991G>A	p.G331S		
12	41966 885	41966 885	1	T	G	ENSG000 00165966	ENST000 00539469	ENSP0000 0439990	<i>PDZRN4</i>	NM_013377.3	c.1530T>G	p.N510K		
12	48578 302	48578 302	1	C	G	ENSG000 00177875	ENST000 00316554	ENSP0000 0320849	<i>C12orf68</i>	NM_0010136 35.3	c.397C>G	p.R133G		
12	51385 388	51385 388	1	T	C	ENSG000 00110911	ENST000 00547688	ENSP0000 0449200	<i>SLC11A2</i>	NM_0011741 25.1	c.1502A>G	p.N501S		
12	52565 505	52565 505	1	T	G	ENSG000 00167767	ENST000 00313234	ENSP0000 0369361	<i>KRT80</i>	NM_0010814 92.1	c.1179-8A>C			
12	52965 165	52965 165	1	A	G	ENSG000 00170484	ENST000 00305620	ENSP0000 0307240	<i>KRT74</i>	NM_175053.3	c.821T>C	p.F274S	rs1479 62513	0,0 002
12	56755 422	56755 422	1	C	T	ENSG000 00175336	ENST000 00398189	ENSP0000 0381250	<i>APOF</i>	NM_001638.2	c.568G>A	p.G190R		0,0 001
12	57499 139	57499 139	1	C	T	ENSG000 00166888	ENST000 00454075	ENSP0000 0401486	<i>STAT6</i>	NM_003153.4	c.813-17G>A			
12	58166 903	58166 903	1	C	G	ENSG000 00123427	ENST000 00300209	ENSP0000 0300209	<i>METTL21B</i>	NM_015433.2	c.281C>G	p.A94G		
12	58193 664	58193 664	1	T	C	ENSG000 00135407	ENST000 00257861	ENSP0000 0257861	<i>AVIL</i>	NM_006576.3	c.2260A>G	p.S754G		



Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
12	89891 131	89891 131	1	T	C	ENSG000 00139323	ENST000 00549035	ENSP0000 0447916	<i>POC1B</i>	NM_0011997 77.1	c.-26-12A>G			0,0 001
12	10553 8491	10553 8491	1	G	T	ENSG000 00136051	ENST000 00332180	ENSP0000 0328062	<i>KIAA1033</i>	NM_015275.1	c.2180-5G>T		rs7617 4691	
12	10557 0712	10557 0712	1	G	C	ENSG000 00136044	ENST000 00258530	ENSP0000 0258530	<i>APPL2</i>	NM_018171.3	c.1754C>G	p.S585C		
13	32360 761	32360 761	1	C	A	ENSG000 00133105	ENST000 00298386	ENSP0000 0298386	<i>RXFP2</i>	NM_130806.3	c.1060C>A	p.Q354K		
13	32828 460	32828 460	1	A	G	ENSG000 00073910	ENST000 00380250	ENSP0000 0369600	<i>FRY</i>	NM_023037.2	c.7345A>G	p.T2449 A	rs1923 51218	0,0 028
13	78272 277	78272 278	2	(C)2	(C)3	ENSG000 00139737	ENST000 00466548	ENSP0000 0419730	<i>SLAIN1</i>	NM_0012428 71.1	c.229_230del(C) 2ins(C)3	p.L78Ffs *31	rs7110 2772	
14	36096 533	36096 533	1	A	G	ENSG000 00174373	ENST000 00307138	ENSP0000 0302647	<i>RALGAP1</i>	NM_194301.2	c.5102T>C	p.I1701T		0,0 001
14	50101 033	50101 033	1	C	T	ENSG000 00165506	ENST000 00406043	ENSP0000 0384862	<i>DNAAF2</i>	NM_0010839 08.1	c.835G>A	p.V279M		
14	56117 131	56117 131	1	G	A	ENSG000 00126777	ENST000 00395311	ENSP0000 0378722	<i>KTNI</i>	NM_0010795 22.1	c.2491G>A	p.V831I		
14	10134 7290	10134 7290	1	C	G	ENSG000 00254656	ENST000 00534062	ENSP0000 0435342	<i>RTL1</i>	NM_0011348 88.2	c.3836G>C	p.R1279 P		
14	10520 7171	10520 7171	1	T	G	ENSG000 00185100	ENST000 00330877	ENSP0000 0331260	<i>ADSSL1</i>	NM_152328.3	c.585-5T>G			

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
15	75651040	75651040	1	T	C	ENSG00000140400	ENST00000267978	ENSP00000267978	MAN2C1	NM_006715.3	c.2246+5A>G		rs62029712	
16	333194	333208	15	(CTG)5	(CTG)6	ENSG00000185615	ENST00000219406	ENSP00000219406	PDIA2	NM_006849.2	c.25_39del(CTG)5ins(CTG)6	p.L13_L14insL		
16	734877	734877	1	C	T	ENSG00000127580	ENST00000293883	ENSP00000293883	WDR24	NM_032259.2	c.2230G>A	p.A744T		
16	845742	845742	1	G	A	ENSG00000127586	ENST00000262315	ENSP00000262315	CHTF18	NM_022092.2	c.2233G>A	p.A745T	rs118113142	0,0037
16	1129866	1129866	1	C	T	ENSG00000162009	ENST00000397547	ENSP00000380680	SSTR5	NM_001172560.1	c.998C>T	p.T333M	rs12596873	0,0021
16	1827145	1827145	1	T	G	ENSG00000162032	ENST00000566339	ENSP00000457206	SPSB3	NM_080861.3	c.1021A>C	p.S341R		
16	2815313	2815313	1	G	A	ENSG00000167978	ENST00000301740	ENSP00000301740	SRRM2	NM_016333.3	c.4784G>A	p.R1595H		0,0001
16	3021563	3021563	1	C	T	ENSG00000162073	ENST00000318782	ENSP00000321804	PAQR4	NM_152341.3	c.436C>T	p.R146C	rs147746550	0,0001
16	4310218	4310218	1	T	G	ENSG00000090447	ENST00000204517	ENSP00000204517	TFAP4	NM_003223.2	c.695A>C	p.H232P		
16	4941848	4941848	1	G	C	ENSG00000118898	ENST00000345988	ENSP00000340510	PPL	NM_002705.4	c.1932C>G	p.S644R		
16	20410421	20410421	1	G	A	ENSG00000169340	ENST00000302451	ENSP00000305465	PDILT	NM_174924.1	c.202C>T	p.H68Y	rs143873904	0,0003

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
16	20448 430	20448 430	1	C	G	ENSG000 00183549	ENST000 00331849	ENSP0000 0327916	<i>ACSM5</i>	NM_017888.2	c.1365C>G	p.D455E	rs1486 10822	0,0 026
16	22546 129	22546 129	1	T	C	ENSG000 00243716	ENST000 00424340	ENSP0000 0440703		NM_0011358 65.1	c.1825T>C	p.Y609H	rs1063 837	
16	22546 136	22546 136	1	T	C	ENSG000 00243716	ENST000 00424340	ENSP0000 0440703		NM_0011358 65.1	c.1832T>C	p.L611P		
16	27751 920	27751 920	1	G	A	ENSG000 00047578	ENST000 00261588	ENSP0000 0261588	<i>KIAA0556</i>	NM_015202.2	c.2302G>A	p.G768S		
16	28074 523	28074 523	1	T	C	ENSG000 00169181	ENST000 00447459	ENSP0000 0394954	<i>GSGIL</i>	NM_0011097 63.1	c.223A>G	p.T75A		
16	47628 046	47628 046	1	A	G	ENSG000 00102893	ENST000 00566044	ENSP0000 0456729	<i>PHKB</i>	NM_0010318 35.2	c.1106-2A>G			
16	56536 660	56536 660	1	T	C	ENSG000 00125124	ENST000 00245157	ENSP0000 0245157	<i>BBS2</i>	NM_031885.3	c.865A>G	p.I289V	rs1503 84293	0,0 011
16	58576 486	58576 486	1	T	G	ENSG000 00125107	ENST000 00317147	ENSP0000 0320949	<i>CNOT1</i>	NM_016284.4	c.4435-14A>C			
16	58576 483	58576 483	1	A	G	ENSG000 00125107	ENST000 00317147	ENSP0000 0320949	<i>CNOT1</i>	NM_016284.4	c.4435-11T>C			
16	66592 150	66592 150	1	A	G	ENSG000 00217555	ENST000 00417030	ENSP0000 0416678	<i>CKLF</i>	NM_0010401 38.2	c.136A>G	p.I46V		0,0 001
16	67919 606	67919 606	1	A	C	ENSG000 00188038	ENST000 00339176	ENSP0000 0342411	<i>NRNIL</i>	NM_198443.1	c.80-19A>C			

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
16	67919 612	67919 612	1	G	C	ENSG000 00188038	ENST000 00339176	ENSP0000 0342411	<i>NRN1L</i>	NM_198443.1	c.80-13G>C			
16	70841 641	70841 641	1	G	A	ENSG000 00157423	ENST000 00316490	ENSP0000 0313052	<i>HYDIN</i>	NM_032821.2	c.15205C>T	p.R5069 W		
16	70954 596	70954 598	3	CTC	-	ENSG000 00157423	ENST000 00316490	ENSP0000 0313052	<i>HYDIN</i>	NM_032821.2	c.7678_7680del GAG	p.E2560d el		
16	71610 186	71610 186	1	G	A	ENSG000 00198650	ENST000 00355962	ENSP0000 0348234	<i>TAT</i>	NM_000353.2	c.133C>T	p.P45S		
16	81249 919	81249 919	1	C	T	ENSG000 00166473	ENST000 00337114	ENSP0000 0337397	<i>PKD1L2</i>	NM_0010767 80.1	c.394G>A	p.G132R	rs1171 42104	0,0 029
17	70771 22	70771 22	1	C	T	ENSG000 00141505	ENST000 00574388	ENSP0000 0459169	<i>ASGRI</i>	NM_0011972 16.2	c.615G>A	p.W205*		0,0 001
17	71279 43	71279 43	1	A	C	ENSG000 00072778	ENST000 00350303	ENSP0000 0344152	<i>ACADVL</i>	NM_0010338 59.1	c.1613-18A>C			
17	77493 78	77493 78	1	A	C	ENSG000 00132510	ENST000 00254846	ENSP0000 0254846	<i>KDM6B</i>	NM_0010804 24.1	c.237-18A>C			
17	16593 767	16593 767	1	C	T	ENSG000 00170160	ENST000 00360524	ENSP0000 0353717	<i>CCDC144A</i>	NM_014695.1	c.53C>T	p.P18L		0,0 001
17	19644 449	19644 449	1	G	A	ENSG000 00108602	ENST000 00444455	ENSP0000 0388469	<i>ALDH3A1</i>	NM_0011351 68.1	c.764C>T	p.S255L		
17	20483 817	20483 818	2	CG	TA	ENSG000 00214819	ENST000 00399044	ENSP0000 0382000	<i>CDRT15L2</i>	NM_0011907 90.1	c.621_622delCG insTA	p.G208R		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
17	20483 978	20483 978	1	A	T	ENSG000 00214819	ENST000 00399044	ENSP0000 0382000	<i>CDRT15L2</i>	NM_0011907 90.1	c.782A>T	p.K261M		
17	30349 288	30349 288	1	G	A	ENSG000 00185158	ENST000 00341671	ENSP0000 0340519	<i>LRR37B</i>	NM_052888.2	c.1123G>A	p.E375K		0,0 001
17	38420 822	38420 822	1	G	A	ENSG000 00171475	ENST000 00585043	ENSP0000 0462826	<i>WIPF2</i>	NM_133264.4	c.394G>A	p.G132R		0,0 001
17	38935 880	38935 880	1	C	T	ENSG000 00171446	ENST000 00301656	ENSP0000 0301656	<i>KRT27</i>	NM_181537.3	c.847-1G>A		rs1879 44199	0,0 018
17	40214 866	40214 866	1	C	T	ENSG000 00187595	ENST000 00436535	ENSP0000 0411514	<i>ZNF385C</i>	NM_0012427 04.1	c.209G>A	p.R70Q	rs1925 00977	0,0 014
17	41165 784	41165 784	1	T	G	ENSG000 00068079	ENST000 00438323	ENSP0000 0395590	<i>IFI35</i>	NM_005533.4	c.569-9T>G			
17	41246 725	41246 725	1	C	T	ENSG000 00012048	ENST000 00493795	ENSP0000 0418775	<i>BRCA1</i>	NM_007297.3	c.682G>A	p.G228S	rs8176 153	
17	42170 192	42170 192	1	T	G	ENSG000 00108840	ENST000 00225983	ENSP0000 0225983	<i>HDAC5</i>	NM_0010150 53.1	c.645-18A>C			
17	42739 823	42739 823	1	A	T	ENSG000 00180336	ENST000 00409122	ENSP0000 0386452	<i>C17orf104</i>	NM_0011450 80.2	c.343A>T	p.I115F	rs7817 9276	0,0 023
17	43013 460	43013 460	1	C	G	ENSG000 00186185	ENST000 00438933	ENSP0000 0412798	<i>KIF18B</i>	NM_0012645 73.1	c.253G>C	p.V85L		0,0 018
17	43911 064	43911 064	1	A	C	ENSG000 00120088	ENST000 00352855	ENSP0000 0344068	<i>CRHR1</i>	NM_0011451 47.1	c.810-16A>C		rs1134 66703	

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
17	43911068	43911068	1	G	C	ENSG00000120088	ENST00000352855	ENSP00000344068	CRHR1	NM_001145147.1	c.810-12G>C			
17	43911073	43911073	1	A	C	ENSG00000120088	ENST00000352855	ENSP00000344068	CRHR1	NM_001145147.1	c.810-7A>C			
17	48458239	48458239	1	G	A	ENSG00000154920	ENST00000511648	ENSP00000421700	EME1	NM_001166131.1	c.1691G>A	p.R564K		
17	60765878	60765878	1	C	G	ENSG00000011028	ENST00000303375	ENSP00000307513	MRC2	NM_006039.4	c.3078C>G	p.S1026R	rs141422219	0,0004
17	67293389	67293389	1	C	G	ENSG00000154265	ENST00000392676	ENSP00000376443	ABCA5	NM_172232.2	c.1379G>C	p.S460T		
17	73888431	73888431	1	G	A	ENSG00000141569	ENST00000269383	ENSP00000269383	TRIM65	NM_173547.3	c.661C>T	p.R221W	rs61755877	0,0024
18	47091704	47091704	1	A	C	ENSG00000101670	ENST00000261292	ENSP00000261292	LIPG	NM_006033.2	c.115A>C	p.K39Q		
18	19144171	19144171	1	A	C	ENSG00000141446	ENST00000269214	ENSP00000269214	ESCO1	NM_052911.2	c.1814T>G	p.L605W		
18	50832036	50832036	1	G	A	ENSG00000187323	ENST00000442544	ENSP00000389140	DCC	NM_005215.3	c.2000G>A	p.R667H		
18	55328615	55328615	1	C	T	ENSG000000081923	ENST00000536015	ENSP00000445359	ATP8B1	NM_005603.4	c.2498G>A	p.R833Q		
18	55992265	55992265	1	C	T	ENSG000000049759	ENST00000382850	ENSP00000372301	NEDD4L	NM_015277.5	c.551C>T	p.S184F		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
18	56202 636	56202 636	1	G	A	ENSG000 00198796	ENST000 00361673	ENSP0000 0354991	<i>ALPK2</i>	NM_052947.3	c.4783C>T	p.R1595 C		
18	60383 308	60383 325	18	(CCGCG GCCG)2	CCGCG GCCG	ENSG000 00081913	ENST000 00262719	ENSP0000 0262719	<i>PHLPP1</i>	NM_194449.3	c.392_409del(C CGCGGCCG)2i nsCCGCGGCC G	p.A135_ A137del		
19	14608 12	14608 12	1	G	A	ENSG000 00115266	ENST000 00535453	ENSP0000 0442954	<i>APC2</i>	NM_005883.2	c.1477G>A	p.A493T		
19	18800 51	18800 51	1	A	C	ENSG000 00129968	ENST000 00292577	ENSP0000 0292577	<i>FAM108A1</i>	NM_0011301 11.1	c.396T>G	p.I132M		
19	37600 55	37600 55	1	C	T	ENSG000 00011132	ENST000 00316757	ENSP0000 0315136	<i>APBA3</i>	NM_004886.3	c.208G>A	p.D70N		
19	75325 76	75325 77	2	CG	TA	ENSG000 00104880	ENST000 00319670	ENSP0000 0319200	<i>ARHGEF18</i>	NM_015318.3	c.2442+6_7delC GinsTA			
19	75899 57	75899 57	1	T	C	ENSG000 00090674	ENST000 00264079	ENSP0000 0264079	<i>MCOLN1</i>	NM_020533.2	c.142T>C	p.F48L		
19	79385 98	79385 98	1	G	T	ENSG000 00183248	ENST000 00539422	ENSP0000 0438970		NM_0011904 67.1	c.-7-17C>A			
19	79746 27	79746 27	1	C	G	ENSG000 00076984	ENST000 00397979	ENSP0000 0381066	<i>MAP2K7</i>	NM_145185.2	c.125-13C>G			
19	83674 24	83674 24	1	G	A	ENSG000 00167775	ENST000 00537716	ENSP0000 0437697	<i>CD320</i>	NM_0011658 95.1	c.646C>T	p.R216C	rs1461 90802	0,0 004

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
19	90096 37	90096 37	1	T	C	ENSG000 00181143	ENST000 00397910	ENSP0000 0381008	<i>MUC16</i>	NM_024690.2	c.39089A>G	p.H1303 0R		
19	90097 05	90097 06	2	(A)2	GC	ENSG000 00181143	ENST000 00397910	ENSP0000 0381008	<i>MUC16</i>	NM_024690.2	c.39020_39021d el(T)2insGC	p.V1300 7G		
19	90097 11	90097 11	1	T	A	ENSG000 00181143	ENST000 00397910	ENSP0000 0381008	<i>MUC16</i>	NM_024690.2	c.39015A>T			
19	92367 24	92367 24	1	C	G	ENSG000 00170920	ENST000 00305444	ENSP0000 0302867	<i>OR7G3</i>	NM_0010019 58.1	c.903G>C	p.L301F	rs1175 81914	0,0 046
19	92970 79	92970 79	1	G	A	ENSG000 00188000	ENST000 00344248	ENSP0000 0345563	<i>OR7D2</i>	NM_175883.2	c.622G>A	p.V208I	rs1451 18134	0,0 01
19	10370 280	10370 280	1	A	C	ENSG000 00105364	ENST000 00253099	ENSP0000 0253099	<i>MRPL4</i>	NM_146387.1	c.740-13A>C			
19	15353 818	15353 818	1	T	G	ENSG000 00141867	ENST000 00263377	ENSP0000 0263377	<i>BRD4</i>	NM_058243.2	c.3062A>C	p.H1021 P		
19	15758 064	15758 064	1	C	T	ENSG000 00186529	ENST000 00221307	ENSP0000 0221307	<i>CYP4F3</i>	NM_000896.2	c.455C>T	p.T152M		0,0 001
19	17317 048	17317 048	1	A	C	ENSG000 00099331	ENST000 00397274	ENSP0000 0380444	<i>MYO9B</i>	NM_004145.3	c.5258-9A>C			
19	17434 468	17434 468	1	T	G	ENSG000 00074855	ENST000 00159087	ENSP0000 0159087	<i>ANO8</i>	NM_020959.2	c.3557A>C	p.Q1186 P		
19	17434 475	17434 475	1	C	G	ENSG000 00074855	ENST000 00159087	ENSP0000 0159087	<i>ANO8</i>	NM_020959.2	c.3550G>C	p.A1184 P		



Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
19	17566 481	17566 481	1	T	C	ENSG000 00171773	ENST000 00301944	ENSP0000 0305631	<i>NXNLI</i>	NM_138454.1	c.614A>G	p.E205G		
19	19824 930	19824 930	1	T	C	ENSG000 00105708	ENST000 00344099	ENSP0000 0340514	<i>ZNF14</i>	NM_021030.2	c.161A>G	p.D54G		
19	18649 227	18649 227	1	G	C	ENSG000 00105701	ENST000 00222308	ENSP0000 0222308	<i>FKBP8</i>	NM_012181.3	c.571C>G	p.P191A	rs1133 07565	0,0 009
19	36277 888	36277 888	1	T	C	ENSG000 00004777	ENST000 00378944	ENSP0000 0368227	<i>ARHGAP33</i>	NM_0011726 30.1	c.2108T>C	p.L703P		
19	41076 555	41076 555	1	C	G	ENSG000 00160460	ENST000 00352632	ENSP0000 0263373	<i>SPTBN4</i>	NM_020971.2	c.7240C>G	p.P2414 A		
19	42083 557	42083 557	1	C	A	ENSG000 00007129	ENST000 00401445	ENSP0000 0385739	<i>CEACAM21</i>	NM_0010985 06.1	c.70C>A	p.L24I		
19	42799 299	42799 299	1	T	C	ENSG000 00079432	ENST000 00160740	ENSP0000 0160740	<i>CIC</i>	NM_015125.3	c.4783T>C	p.S1595P		
19	44660 888	44660 888	1	G	C	ENSG000 00263002	ENST000 00426739	ENSP0000 0400878	<i>ZNF234</i>	NM_006630.2	c.719G>C	p.G240A		
19	46280 721	46280 721	1	G	C	ENSG000 00104936	ENST000 00447742	ENSP0000 0413417	<i>DMPK</i>	NM_0010815 60.1	c.1010C>G	p.P337R	rs1429 36719	0,0 005
19	51052 134	51052 134	1	T	G	ENSG000 00131409	ENST000 00389201	ENSP0000 0373853	<i>LRR4B</i>	NM_0010804 57.1	c.-35-4A>C			
19	51172 176	51172 176	1	T	G	ENSG000 00161681	ENST000 00293441	ENSP0000 0293441	<i>SHANK1</i>	NM_016148.2	c.3041A>C	p.H1014 P		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
19	53432 353	53432 353	1	T	C	ENSG000 00221874	ENST000 00391777	ENSP0000 0375656	<i>ZNF321P</i>	NM_0012024 73.1	c.505A>G	p.I169V		
19	54872 611	54872 611	1	A	T	ENSG000 00167613	ENST000 00391742	ENSP0000 0375622	<i>LAIR1</i>	NM_002287.3	c.276T>A	p.S92R	rs1180 56835	0,0 032
19	54872 698	54872 698	1	C	G	ENSG000 00167613	ENST000 00391742	ENSP0000 0375622	<i>LAIR1</i>	NM_002287.3	c.189G>C	p.E63D	rs3745 442	0,0 034
19	55106 765	55106 765	1	G	A	ENSG000 00104974	ENST000 00251372	ENSP0000 0251372	<i>LILRA1</i>	NM_006863.1	c.559G>A	p.V187M		
19	55738 691	55738 691	1	G	A	ENSG000 00180089	ENST000 00327042	ENSP0000 0321038	<i>TMEM86B</i>	NM_173804.4	c.539C>T	p.T180M		
19	57640 830	57640 830	1	A	G	ENSG000 00131864	ENST000 00254181	ENSP0000 0254181	<i>USP29</i>	NM_020903.2	c.787A>G	p.S263G		
2	27292 520	27292 520	1	C	G	ENSG000 00084693	ENST000 00360131	ENSP0000 0353249	<i>AGBL5</i>	NM_021831.5	c.2435C>G	p.P812R		0,0 001
2	61145 512	61145 512	1	G	T	ENSG000 00162924	ENST000 00295025	ENSP0000 0295025	<i>REL</i>	NM_002908.2	c.641-17G>T			
2	97643 678	97643 678	1	T	G	ENSG000 00168754	ENST000 00417561	ENSP0000 0413245	<i>FAM178B</i>	NM_0011726 67.1	c.402-9A>C			
2	97808 562	97808 562	1	A	C	ENSG000 00135976	ENST000 00461153	ENSP0000 0419530	<i>ANKRD36</i>	NM_0011643 15.1	c.891A>C	p.K297N	rs7535 9815	
2	11960 4523	11960 4523	1	A	G	ENSG000 00163064	ENST000 00295206	ENSP0000 0295206	<i>EN1</i>	NM_001426.3	c.221T>C	p.L74P		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
2	21152 1243	21152 1244	2	(G)2	G	ENSG000 00021826	ENST000 00451903	ENSP0000 0406136	<i>CPS1</i>	NM_0011226 34.2	c.2206- 5_6del(G)2insG			
2	21933 9593	21933 9593	1	G	A	ENSG000 00135913	ENST000 00258399	ENSP0000 0258399	<i>USP37</i>	NM_020935.2	c.2059C>T	p.P687S		
2	22037 9295	22037 9295	1	C	T	ENSG000 00072182	ENST000 00347842	ENSP0000 0326627	<i>ASIC4</i>	NM_182847.2	c.230C>T	p.S77L		
20	48604 396	48604 396	1	G	A	ENSG000 00124216	ENST000 00244050	ENSP0000 0244050	<i>SNAI1</i>	NM_005985.3	c.611-13G>A			
20	23993 6	23993 7	2	GT	AC	ENSG000 00186458	ENST000 00382376	ENSP0000 0371813	<i>DEFB132</i>	NM_207469.2	c.277_278delGT insAC	p.V93T		
21	38338 738	38338 738	1	G	C	ENSG000 00159267	ENST000 00399120	ENSP0000 0382071	<i>HLCS</i>	NM_0012427 85.1	c.-1202+6C>G			
21	38338 742	38338 742	1	A	C	ENSG000 00159267	ENST000 00399120	ENSP0000 0382071	<i>HLCS</i>	NM_0012427 85.1	c.-1202+2T>G			
22	24640 612	24640 612	1	C	T	ENSG000 00099998	ENST000 00327365	ENSP0000 0330080	<i>GGT5</i>	NM_004121.2	c.82G>A	p.V28I		
22	26879 985	26879 988	4	(GA)2	(C)4	ENSG000 00100104	ENST000 00215917	ENSP0000 0215917	<i>SRRD</i>	NM_0010136 94.2	c.129_132del(G A)2ins(C)4	p.R44P		
22	37465 391	37465 391	1	T	G	ENSG000 00187045	ENST000 00346753	ENSP0000 0334962	<i>TMPRSS6</i>	NM_153609.2	c.1869-7A>C			
22	37465 396	37465 396	1	T	G	ENSG000 00187045	ENST000 00346753	ENSP0000 0334962	<i>TMPRSS6</i>	NM_153609.2	c.1869-12A>C			

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
22	37465 401	37465 401	1	T	G	ENSG000 00187045	ENST000 00346753	ENSP0000 0334962						
22	39811 620	39811 620	1	G	A	ENSG000 00100324	ENST000 00331454	ENSP0000 0333049	<i>TMPRSS6</i>	NM_153609.2	c.1869-17A>C			
22	40814 743	40814 743	1	C	G	ENSG000 00196588	ENST000 00407029	ENSP0000 0385835	<i>TAB1</i>	NM_153497.2	c.286G>A	p.E96K		
22	42609 636	42609 636	1	G	A	ENSG000 00100207	ENST000 00335626	ENSP0000 0335561	<i>MKL1</i>	NM_020831.3	c.1699G>C	p.A567P		
22	43089 747	43089 747	1	A	G	ENSG000 00128274	ENST000 00249005	ENSP0000 0249005	<i>TCF20</i>	NM_181492.1	c.1676C>T	p.S559L		
22	45309 916	45309 916	1	A	G	ENSG000 00056487	ENST000 00313237	ENSP0000 0324403	<i>A4GALT</i>	NM_017436.4	c.211T>C	p.S71P		
22	50691 914	50691 914	1	C	G	ENSG000 00188130	ENST000 00215659	ENSP0000 0215659	<i>PHF21B</i>	NM_138415.4	c.617T>C	p.L206P		
22	50691 914	50691 914	1	C	G	ENSG000 00188130	ENST000 00215659	ENSP0000 0215659	<i>MAPK12</i>	NM_002969.3	c.1025-5G>C			
3	99525 38	99525 38	1	C	T	ENSG000 00163701	ENST000 00295980	ENSP0000 0295980						0,0 001
3	99913 69	99913 69	1	G	C	ENSG000 00163704	ENST000 00412055	ENSP0000 0392511	<i>IL17RE</i>	NM_153483.2	c.803-11C>T			
3	99913 69	99913 69	1	G	C	ENSG000 00163704	ENST000 00412055	ENSP0000 0392511	<i>PRRT3</i>	NM_207351.3	c.431C>G	p.P144R	rs1510 64606	0,0 014
3	10081 411	10081 411	1	A	G	ENSG000 00144554	ENST000 00287647	ENSP0000 0287647	<i>MAPK12</i>	NM_002969.3	c.1025-5G>C			
3	10081 411	10081 411	1	A	G	ENSG000 00144554	ENST000 00287647	ENSP0000 0287647	<i>FANCD2</i>	NM_033084.3	c.577A>G	p.T193A	rs3493 6017	0,0 013
3	14770 005	14770 005	1	A	T	ENSG000 00131379	ENST000 00435614	ENSP0000 0402933	<i>C3orf20</i>	NM_0011849 58.1	c.1384A>T	p.M462L		0,0 002

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
3	38938 538	38938 538	1	T	C	ENSG000 00168356	ENST000 00302328	ENSP0000 0307599	<i>SCN11A</i>	NM_014139.2	c.2201A>G	p.K734R		
3	38962 699	38962 699	1	C	A	ENSG000 00168356	ENST000 00302328	ENSP0000 0307599	<i>SCN11A</i>	NM_014139.2	c.760G>T	p.V254F		
3	47451 435	47451 435	1	C	T	ENSG000 00076201	ENST000 00265562	ENSP0000 0265562	<i>PTPN23</i>	NM_015466.2	c.2147C>T	p.P716L		
3	47890 558	47890 558	1	G	A	ENSG000 00132153	ENST000 00446256	ENSP0000 0392601	<i>DHX30</i>	NM_014966.3	c.2801G>A	p.R934H		
3	49159 190	49159 190	1	C	A	ENSG000 00172037	ENST000 00418109	ENSP0000 0388325	<i>LAMB2</i>	NM_002292.3	c.5027G>T	p.G1676 V		
3	49159 190	49159 191	2	(C)2	AT	ENSG000 00172037	ENST000 00418109	ENSP0000 0388325	<i>LAMB2</i>	NM_002292.3	c.5026_5027del( G)2insAT	p.G1676I		
3	49694 439	49694 439	1	C	A	ENSG000 00164061	ENST000 00296452	ENSP0000 0296452	<i>BSN</i>	NM_003458.3	c.7450C>A	p.P2484 T		
3	49744 320	49744 320	1	G	A	ENSG000 00164068	ENST000 00327697	ENSP0000 0328287	<i>RNF123</i>	NM_022064.3	c.2485G>A	p.V829I		
3	50293 609	50293 609	1	A	C	ENSG000 00114353	ENST000 00313601	ENSP0000 0312999	<i>GNAI2</i>	NM_002070.2	c.465-15A>C			
3	10871 9436	10871 9436	1	C	G	ENSG000 00114487	ENST000 00232603	ENSP0000 0232603	<i>MORC1</i>	NM_014429.3	c.2155G>C	p.D719H	rs3527 6036	0,0 031
3	13366 6229	13366 6229	1	C	T	ENSG000 00174640	ENST000 00310926	ENSP0000 0311291	<i>SLCO2A1</i>	NM_005630.2	c.1166G>A	p.R389H		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
3	14152 6640	14152 6640	1	G	A	ENSG000 00114124	ENST000 00264952	ENSP0000 0264952	<i>GRK7</i>	NM_139209.2	c.1204G>A	p.D402N	rs1508 40377	0,0 021
3	15048 0489	15048 0489	1	C	T	ENSG000 00181788	ENST000 00312960	ENSP0000 0322457	<i>SIAH2</i>	NM_005067.5	c.148G>A	p.A50T	rs1373 419	
3	15709 9066	15709 9066	1	C	T	ENSG000 00197415	ENST000 00362010	ENSP0000 0354919	<i>VEPH1</i>	NM_024621.2	c.1006G>A	p.D336N	rs1476 44993	0,0 021
3	17283 5032	17283 5032	1	G	A	ENSG000 00144962	ENST000 00351008	ENSP0000 0341765	<i>SPATA16</i>	NM_031955.5	c.490C>T	p.H164Y		
3	19033 8053	19033 8053	1	A	T	ENSG000 00196083	ENST000 00072516	ENSP0000 0072516	<i>ILIRAP</i>	NM_002182.3	c.538-11A>T			
4	16027 7040	16027 7040	1	A	C	ENSG000 00109756	ENST000 00264431	ENSP0000 0264431	<i>RAPGEF2</i>	NM_014247.2	c.4204A>C	p.T1402 P		
4	16405 0104	16405 0104	1	A	G	ENSG000 00145414	ENST000 00274054	ENSP0000 0274054	<i>NAF1</i>	NM_138386.2	c.1430T>C	p.L477P		
5	11872 8510	11872 8510	1	G	T	ENSG000 00145779	ENST000 00503646	ENSP0000 0421848	<i>TNFAIP8</i>	NM_014350.2	c.32-1G>T		rs7697 7268	
5	16902 0350	16902 0350	1	G	T	ENSG000 00040275	ENST000 00265295	ENSP0000 0265295	<i>CCDC99</i>	NM_017785.4	c.337-8G>T			
5	16930 9989	16930 9989	1	G	T	ENSG000 00204767	ENST000 00377365	ENSP0000 0366582	<i>FAM196B</i>	NM_0011298 91.1	c.914C>A	p.S305Y		
6	75856 12	75856 12	1	A	T	ENSG000 00096696	ENST000 00418664	ENSP0000 0396591	<i>DSP</i>	NM_0010088 44.1	c.6320A>T	p.K2107 M		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
6	20548 808	20548 808	1	A	T	ENSG000 00145996	ENST000 00378610	ENSP0000 0367873	<i>CDKAL1</i>	NM_017774.3	c.174-16A>T			
6	32084 259	32084 259	1	T	C	ENSG000 00213676	ENST000 00375203	ENSP0000 0364349	<i>ATF6B</i>	NM_004381.4	c.1880A>G	p.N627S	rs1454 10874	0,0 039
6	32489 933	32489 933	1	T	C	ENSG000 00198502	ENST000 00374975	ENSP0000 0364114	<i>HLA-DRB5</i>	NM_002125.3	c.119A>G	p.D40G		
6	32800 192	32800 192	1	T	C	ENSG000 00204267	ENST000 00374897	ENSP0000 0364032	<i>TAP2</i>	NM_000544.3	c.1190A>G	p.Q397R		
6	41118 000	41118 000	1	A	G	ENSG000 00161911	ENST000 00373127	ENSP0000 0362219	<i>TREML1</i>	NM_178174.2	c.620T>C	p.M207T	rs3592 9443	0,0 018
6	42819 894	42819 894	1	G	A	ENSG000 00112624	ENST000 00394167	ENSP0000 0377722	<i>KIAA0240</i>	NM_015349.1	c.1904G>A	p.R635K		
6	47846 965	47846 965	1	T	C	ENSG000 00244694	ENST000 00339488	ENSP0000 0341914	<i>PTCHD4</i>	NM_0010137 32.3	c.1615A>G	p.R539G		
6	66204 970	66204 970	1	C	T	ENSG000 00188107	ENST000 00342421	ENSP0000 0341818	<i>EYS</i>	NM_198283.1	c.334G>A	p.V112I	rs1126 09906	0,0 036
6	76618 195	76618 195	1	G	T	ENSG000 00196586	ENST000 00369977	ENSP0000 0358994	<i>MYO6</i>	NM_004999.3	c.3281-18G>T		rs7537 1739	
6	90347 546	90347 546	1	C	T	ENSG000 00083099	ENST000 00523377	ENSP0000 0430025	<i>LYRM2</i>	NM_020466.4	c.101G>A	p.R34Q		
6	11691 4129	11691 4129	1	G	T	ENSG000 00111832	ENST000 00392526	ENSP0000 0376311	<i>RWDD1</i>	NM_016104.2	c.323-14G>T			

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
6	13781 4509	13781 4509	1	A	G	ENSG000 00177468	ENST000 00367734	ENSP0000 0356708	<i>OLIG3</i>	NM_175747.2	c.799T>C	p.S267P	rs1177 70313	0,0 039
6	13856 6721	13856 6721	1	G	A	ENSG000 00112379	ENST000 00251691	ENSP0000 0251691	<i>KIAA1244</i>	NM_020340.4	c.658G>A	p.A220T		
6	16049 6913	16049 6913	1	A	G	ENSG000 00197081	ENST000 00356956	ENSP0000 0349437	<i>IGF2R</i>	NM_000876.2	c.5201A>G	p.N1734 S		
6	16772 8900	16772 8900	1	T	C	ENSG000 00112494	ENST000 00366829	ENSP0000 0355794	<i>UNC93A</i>	NM_0011439 47.1	c.1208T>C	p.V403A		
7	21946 208	21946 208	1	A	G	ENSG000 00164649	ENST000 00373934	ENSP0000 0363045	<i>CDCA7L</i>	NM_0011273 71.2	c.593T>C	p.V198A		
7	73011 713	73011 713	1	T	G	ENSG000 00009950	ENST000 00429400	ENSP0000 0406296	<i>MLXIPL</i>	NM_032952.2	c.1402A>C	p.T468P		
7	73254 749	73254 749	1	G	A	ENSG000 00165171	ENST000 00297873	ENSP0000 0297873	<i>WBSCR27</i>	NM_152559.2	c.383C>T	p.P128L		
7	73790 332	73790 332	1	C	T	ENSG000 00106665	ENST000 00223398	ENSP0000 0223398	<i>CLIP2</i>	NM_003388.4	c.1601C>T	p.P534L		
7	77003 444	77003 444	1	G	T	ENSG000 00186088	ENST000 00257626	ENSP0000 0257626	<i>PION</i>	NM_017439.3	c.814C>A	p.Q272K		
7	87912 485	87912 485	1	T	C	ENSG000 00127954	ENST000 00380079	ENSP0000 0369419	<i>STEAP4</i>	NM_024636.3	c.457-2A>G			
7	10030 4745	10030 4745	1	G	A	ENSG000 00172336	ENST000 00303151	ENSP0000 0304353	<i>POP7</i>	NM_005837.2	c.292G>A	p.V98M	rs1454 47976	0,0 022



Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
7	10769 2637	10769 2637	1	G	T	ENSG000 00091128	ENST000 00205386	ENSP0000 0205386	<i>LAMB4</i>	NM_007356.2	c.3821C>A	p.T1274 K		
7	12276 8941	12276 8941	1	C	T	ENSG000 00081800	ENST000 00194130	ENSP0000 0194130	<i>SLC13A1</i>	NM_022444.3	c.1091G>A	p.R364Q	rs1389 89506	0,0 003
7	12848 0629	12848 0629	1	G	A	ENSG000 00128591	ENST000 00346177	ENSP0000 0344002	<i>FLNC</i>	NM_0011274 87.1	c.1577G>A	p.R526Q	rs3493 2223	0,0 013
7	13461 7968	13461 7968	1	G	A	ENSG000 00122786	ENST000 00424922	ENSP0000 0393621	<i>CALD1</i>	NM_033140.3	c.430G>A	p.E144K		
8	37692 731	37692 731	1	C	T	ENSG000 00020181	ENST000 00412232	ENSP0000 0406367	<i>GPR124</i>	NM_032777.9	c.1648C>T	p.P550S		0,0 001
8	38869 207	38869 207	1	G	A	ENSG000 00168615	ENST000 00487273	ENSP0000 0419446	<i>ADAM9</i>	NM_003816.2	c.226G>A	p.E76K	rs6175 3672	0,0 039
8	87076 250	87076 250	1	T	G	ENSG000 00147613	ENST000 00276616	ENSP0000 0276616	<i>PSKH2</i>	NM_033126.1	c.796A>C	p.S266R	rs3403 7815	0,0 028
8	88218 218	88218 218	1	G	T	ENSG000 00176571	ENST000 00518476	ENSP0000 0430073	<i>CNBD1</i>	NM_173538.2	c.432-3G>T			
8	95403 896	95403 896	1	A	T	ENSG000 00197275	ENST000 00336148	ENSP0000 0336606	<i>RAD54B</i>	NM_012415.3	c.1750T>A	p.C584S		
8	99560 206	99560 206	1	T	C	ENSG000 00104375	ENST000 00523601	ENSP0000 0429744	<i>STK3</i>	NM_0012563 12.1	c.1216A>G	p.T406A		
8	12150 2795	12150 2795	1	T	G	ENSG000 00172167	ENST000 00305949	ENSP0000 0303398	<i>MTBP</i>	NM_022045.3	c.1432T>G	p.L478V	rs1481 51530	0,0 016

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
8	13982 4118	13982 4118	1	T	G	ENSG000 00169436	ENST000 00303045	ENSP0000 0303153	<i>COL22A1</i>	NM_152888.1	c.1373A>C	p.Q458P		
9	12614 4211	12614 4211	1	T	G	ENSG000 00119522	ENST000 00373624	ENSP0000 0362727	<i>DENNDIA</i>	NM_020946.1	c.2530A>C	p.T844P		
9	13964 2896	13964 2896	1	A	G	ENSG000 00204003	ENST000 00341206	ENSP0000 0339621	<i>LCN6</i>	NM_198946.2	c.40T>C	p.S14P	rs4880 139	0,0 026
9	13974 9114	13974 9114	1	G	A	ENSG000 00177943	ENST000 00317446	ENSP0000 0319388	<i>MAMDC4</i>	NM_206920.2	c.920G>A	p.R307Q	rs1479 96833	
9	14012 9083	14012 9083	1	G	A	ENSG000 00198569	ENST000 00361134	ENSP0000 0355353	<i>SLC34A3</i>	NM_080877.2	c.1235G>A	p.R412Q		
9	14017 4327	14017 4327	1	G	A	ENSG000 00198113	ENST000 00357503	ENSP0000 0350102	<i>TOR4A</i>	NM_017723.2	c.1186G>A	p.A396T		0,0 001
X	15223 83	15223 84	2	CT	-	ENSG000 00169093	ENST000 00381317	ENSP0000 0370718	<i>ASMTL</i>	NM_004192.3	c.1646- 1_2delAG			
X	41056 599	41056 599	1	A	C	ENSG000 00124486	ENST000 00324545	ENSP0000 0316357	<i>USP9X</i>	NM_0010395 90.2	c.4234-18A>C			
X	15320 7399	15320 7399	1	T	C	ENSG000 00102032	ENST000 00393700	ENSP0000 0377303	<i>RENBP</i>	NM_002910.5	c.769+4A>G			

Nach dem Ausschluss von Sequenzierartefakten wurden diese Varianten nachfolgend hinsichtlich ihres funktionellen Einflusses auf das kodierte Protein und ihrer Frequenz in der gesunden Allgemeinbevölkerung charakterisiert und gefiltert. Mittels dieser Strategie konnten in der Familie LKG11 zwei heterozygote Veränderungen in den Genen *NEDD4L* und *PAX6* bestimmt werden. Die Veränderung c.551C>T führt an der Position 184 zu einem Austausch der Aminosäure Serin durch Phenylalanin in *NEDD4L* (p.Ser184Phe), während die Veränderung c.1004C>G zu einem Austausch der Aminosäure Alanin an Position 335 des *PAX6*-Proteins durch Glyzin führt (p.(Ala335Gly)) (Tabelle 43).

Tabelle 43: Übersicht der in Familie LKG11 identifizierten Varianten und ihre Charakterisierung mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme.

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Allelfrequenz (gnomAD)	Prädiktion			
						SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	CADD
chr11:31815056	<i>PAX6</i>	ENST000004190 22.1	c.1004C >G	p.(Ala335Gly)	0.0000278	T	B	DC	6.3
chr18:55992265	<i>NEDD4L</i>	ENST000004003 45.3	c.551C> T	p.(Ser184Phe)	0.0000963	T	PoD	DC	22.8

*T*, tolerated; *B*, benign; *PoD*, possibly damaging; *DC*, disease causing.

Während die identifizierte *PAX6*-Variante aufgrund fehlender Ko-Segregation innerhalb der Familie LKG11 sowie der bioinformatischen Prädiktion als Polymorphismus klassifiziert wurde, ergab die Sanger-Sequenzierung der *NEDD4L*-Veränderung für die restlichen Proben dieser Familie eine weitgehende Ko-Segregation dieser Variante mit dem Phänotyp in der Familie (vgl. Abbildung 5, Abbildung 23 und Abbildung 24). Mit Ausnahme von Individuum Gö295, für welches die klinischen Angaben nahelegten, dass es sich um eine nicht betroffene Person handelt, konnte die Veränderung c.551C>T in *NEDD4L* bei allen betroffenen Personen innerhalb der Familie nachgewiesen werden. Patienten, die von einer Spalte betroffen sind, weisen die Mutation auf und Familienmitglieder, die nicht Träger einer Spalte sind, tragen die Veränderung nicht.

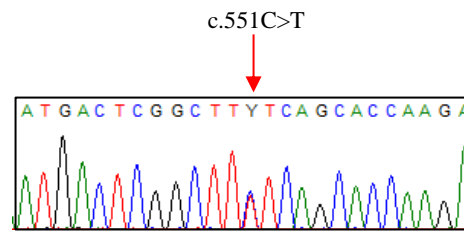


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der in Familie LKG11 identifizierten Sequenzveränderung c.551C>T im *NEDD4L*-Gen.

Die Abbildung zeigt die Sequenzveränderung für Patient Gö135.

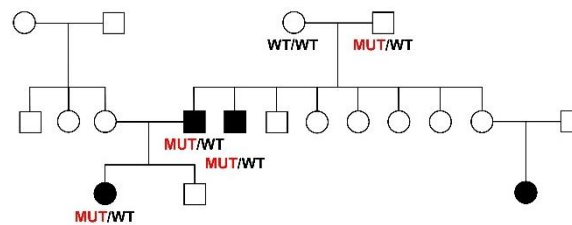


Abbildung 24: Stammbaum der Familie LKG11 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte; Ko-Segregation.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; MUT= Mutation; WT=Wildtyp.

### 3.2.3 Genetische Analysen der Familien LKG12, LKG21 und LKG-Kamerun

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei weitere Familie mit Patienten mit isolierter Lippen-Kiefer-Gaumenspalte analog zu unter 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenem Vorgehen genetisch untersucht.

In Familie LKG12 waren zwei Patienten von einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte betroffen (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 25).

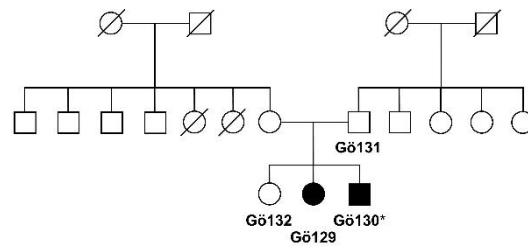


Abbildung 25: Stammbaum der Familie LKG12 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

Es wurde eine Exomanalyse mit DNA eines Patienten, Gö130, durchgeführt und durch Anwendung von verschiedenen Filterstrategien konnten zwei potenzielle heterozygote Varianten in *FGFR1* und *FGFR3* identifiziert werden, die als mögliche, ursächliche Veränderungen in Frage kamen und näher charakterisiert wurden (vgl. Tabelle 44).

Tabelle 44: Übersicht der in Familie LKG12 identifizierten Varianten und ihre Charakterisierung mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme.

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Allelfrequenz (gnomAD)	Prädiktion			
						SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	CADD
chr4:1808270	<i>FGFR3</i>	ENST00000340107	c.2037-3C>T	-	0.0000520	-	-	-	0.06
chr8:38271462	<i>FGFR1</i>	ENST00000425967	c.2359C>T	p.(Arg787Cys)	0.000004	D	PD	DC	32

D, deleterious; PD, probably damaging; DC, disease causing.

Die Variante c.2037-3C>T, die bei Patient Gö130 identifiziert wurde, befindet sich in Intron 15 des *FGFR3*-Gens in unmittelbarer Nähe zur Akzeptor-Spleißstelle des Introns. Veränderungen an dieser Position können daher einen Einfluss auf den Spleißvorgang haben und somit die Expression von funktionellem *FGFR3*-Protein direkt beeinflussen. Die Veränderung c.2359C>T in *FGFR1* führt an der Position 787 zu einem Austausch der Aminosäure Arginin durch Cystein in *FGFR1* (p.Arg787Cys). Bei beiden Varianten handelt es sich um Veränderungen, die eine sehr niedrige Frequenz in der gesunden Allgemeinbevölkerung aufweisen. Die nachfolgende Untersuchung der Ko-Segregation der Veränderungen ergab jedoch für beide Varianten keine Ko-Segregation innerhalb der Familie LKG12. Beide Varianten konnten bei dem klinisch unauffälligen Individuum Gö131 nachgewiesen werden, zusätzlich lag die c.2037C>A Veränderung in *FGFR3* nicht bei der betroffenen Patientin Gö129 vor.

Für die Familie LKG21 lagen insgesamt DNA-Proben von sechs Individuen vor (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 26).

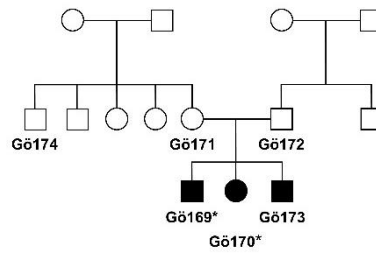


Abbildung 26: Stammbaum der Familie LKG21 mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

Zur Identifizierung einer möglichen genetischen Ursache für die vorliegende Lippen-Kiefer-Gaumenspalte bei den Individuen Gö169 und Gö170 und Gö173 wurde eine Exomanalyse mit DNA der Patienten Gö169 und Gö170 durchgeführt und im Rahmen dieser Arbeit auf mögliche ursächliche Varianten hin untersucht. Basierend auf den Angaben im Stammbaum der Familie wurden die erhaltenen Daten unter der Annahme eines autosomal rezessiven Vererbungsmusters nach homozygoten und compound heterozygoten Varianten analysiert, die bei beiden betroffenen Individuen vorlagen. Insgesamt konnten so vier Varianten ermittelt werden, die bei beiden Betroffenen homozygot vorlagen, sowie elf Varianten, für die beide betroffenen Individuen compound-heterozygot waren. Diese Veränderungen wurden anschließend hinsichtlich ihres Effekts auf das kodierte Protein und die zelluläre Funktion der kodierten Proteine charakterisiert und eingeordnet. Dies führte zum Ausschluss aller identifizierten homozygoten und compound-heterozygoten Varianten, so dass in dieser Familie mittels dieser Analysestrategie bislang keine ursächliche pathogene Veränderung für die vorliegende Lippen-Kiefer-Gaumenspalte gefunden werden konnte.

Für die Familie LKG-Kamerun lagen insgesamt acht familiäre DNA-Proben vor, darunter zwei Proben von Patienten, bei denen klinisch die Diagnose einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte gestellt wurde (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 27; Gö66 sowie Gö72).

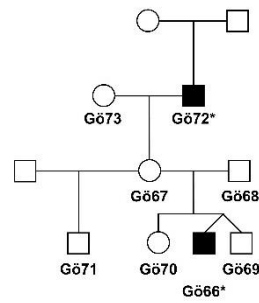


Abbildung 27: Stammbaum der Familie LKG-Kamerun mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

Ausgefüllte Symbole, betroffene Individuen; \*, Proben, die mittels Exomanalyse untersucht wurden.

Mit DNA dieser beiden Patienten wurde eine Exomanalyse durchgeführt und die erhaltenen genetischen Daten wurden unter der Annahme eines autosomal dominanten Erbgangs analysiert. Dies führte zur Identifizierung von insgesamt 217 Varianten, die in beiden Patienten heterozygot vorlagen und nachfolgend hinsichtlich des Vorkommens von Artefakten und ihres funktionellen Einflusses auf das kodierte Protein näher charakterisiert wurden (Tabelle 45).

Tabelle 45: Filterungsergebnis in Familie LKG-Kamerun.

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	980452 5	980452 5	1	T	C	ENSG00000171603	ENST00000377298	ENSP00000366513	<i>CLSTN1</i>	NM_001009566.1	c.1162A>G	p.I388V	rs77609933	0,00 22
1	101908 48	101908 48	1	C	G	ENSG00000130939	ENST00000343090	ENSP00000343001	<i>UBE4B</i>	NM_001105562.2	c.1888C>G	p.Q630E		
1	119187 94	119187 94	1	C	G	ENSG00000120937	ENST00000376468	ENSP00000365651	<i>NPPB</i>	NM_002521.2	c.97G>C	p.G33R	rs151222918	0,00 07
1	160969 30	160969 30	1	G	A	ENSG00000162458	ENST00000375766	ENSP00000364921	<i>FBLIM1</i>	NM_017556.2	c.568G>A	p.V190M		
1	165340 74	165340 74	1	G	T	ENSG00000142632	ENST00000270747	ENSP00000270747	<i>ARHGEF19</i>	NM_153213.3	c.817C>A	p.P273T	rs143178874	0,00 47
1	175508 89	175508 89	1	G	A	ENSG00000142623	ENST00000375471	ENSP00000364620	<i>PADI1</i>	NM_013358.2	c.374G>A	p.R125H	rs142964003	0,00 06
1	284767 13	284767 13	1	C	T	ENSG00000169403	ENST00000539896	ENSP00000442658	<i>PTAFR</i>	NM_001164723.2	c.820G>A	p.A274T	rs140866472	0,00 45
1	151742 689	151742 689	1	T	C	ENSG00000143450	ENST00000321531	ENSP00000313922	<i>OAZ3</i>	NM_001134939.1	c.386T>C	p.V129A	rs115069090	0,00 49
1	158612 683	158612 683	1	A	C	ENSG00000163554	ENST00000368148	ENSP00000357130	<i>SPTA1</i>	NM_003126.2	c.4526T>G	p.L1509R		
1	161069 277	161069 277	1	G	A	ENSG00000162755	ENST00000368011	ENSP00000356990	<i>KLHDC9</i>	NM_152366.4	c.669G>A	p.W223*	rs150493322	0,00 15



Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	159779 464	159779 465	2	TC	CT	ENSG00000 181036	ENST00000 368106	ENSP00000 357086	<i>FCRL6</i>	NM_001004 310.2	c.877_878del TCinsCT	p.S293L		
1	167666 706	167666 706	1	C	T	ENSG00000 198771	ENST00000 367854	ENSP00000 356828	<i>RCSD1</i>	NM_052862 .3	c.845C>T	p.P282L	rs75676 729	0,00 32
1	173881 032	173881 032	1	G	A	ENSG00000 117601	ENST00000 367698	ENSP00000 356671	<i>SERPINC1</i>	NM_000488 .3	c.529C>T	p.R177C	rs14352 1873	0,00 08
1	201352 206	201352 206	1	C	T	ENSG00000 159166	ENST00000 391967	ENSP00000 375829	<i>LAD1</i>	NM_005558 .3	c.1382G>A	p.R461Q	rs11502 5356	0,00 24
1	201981 129	201981 129	1	A	G	ENSG00000 163435	ENST00000 367284	ENSP00000 356253	<i>ELF3</i>	NM_004433 .4	c.208A>G	p.T70A	rs35303 464	0,00 33
1	204394 081	204394 081	1	C	T	ENSG00000 133056	ENST00000 367187	ENSP00000 356155	<i>PIK3C2B</i>	NM_002646 .3	c.4804G>A	p.V1602I	rs11514 0808	0,00 37
1	207010 072	207010 072	1	A	G	ENSG00000 142224	ENST00000 270218	ENSP00000 270218	<i>IL19</i>	NM_013371 .3	c.65A>G	p.N22S	rs14961 8619	0,00 06
1	209799 366	209799 366	1	C	T	ENSG00000 196878	ENST00000 367030	ENSP00000 355997	<i>LAMB3</i>	NM_001127 641.1	c.1603G>A	p.D535N	rs14172 3352	0,00 12
1	214815 994	214815 994	1	A	G	ENSG00000 117724	ENST00000 366955	ENSP00000 355922	<i>CENPF</i>	NM_016343 .3	c.4313A>G	p.Y1438C	rs14298 4971	0,00 08
1	215814 062	215814 062	1	C	T	ENSG00000 042781	ENST00000 307340	ENSP00000 305941	<i>USH2A</i>	NM_206933 .2	c.14806G>A	p.A4936T		
1	223853 119	223853 119	1	C	T	ENSG00000 203697	ENST00000 419193	ENSP00000 401665	<i>CAPN8</i>	NM_001143 962.1	c.230G>A	p.R77Q		0,00 04

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
1	226016 551	226016 551	1	G	A	ENSG00000143819	ENST00000272167	ENSP00000272167	<i>EPHX1</i>	NM_001136018.2	c.121G>A	p.A41T	rs11540967	0,0009
10	748820 61	748820 61	1	A	C	ENSG00000166321	ENST00000357321	ENSP00000349874	<i>NUDT13</i>	NM_015901.4	c.352A>C	p.I118L		
10	768544 62	768544 62	1	C	T	ENSG00000079393	ENST00000372700	ENSP00000361785	<i>DUSP13</i>	NM_001007272.1	c.719G>A	p.R240Q	rs61737441	0,0032
10	778184 37	778184 37	1	T	C	ENSG00000148655	ENST00000372499	ENSP00000361577	<i>C10orf11</i>	NM_032024.3	c.328T>C	p.Y110H		
10	915225 58	915225 58	1	A	G	ENSG00000138182	ENST00000260753	ENSP00000260753	<i>KIF20B</i>	NM_016195.2	c.4835A>G	p.K1612R	rs143235231	0,0009
10	915325 86	915325 86	1	G	A	ENSG00000138182	ENST00000260753	ENSP00000260753	<i>KIF20B</i>	NM_016195.2	c.5263G>A	p.V1755M	rs145242589	0,0009
10	952752 73	952752 73	1	C	A	ENSG00000138180	ENST00000371485	ENSP00000360540	<i>CEP55</i>	NM_018131.4	c.640C>A	p.H214N	rs146700713	0,0005
10	960841 22	960841 22	1	A	G	ENSG00000138193	ENST00000260766	ENSP00000260766	<i>PLCE1</i>	NM_016341.3	c.6518A>G	p.K2173R	rs111929795	0,0032
10	977869 73	977869 73	1	G	A	ENSG00000188649	ENST00000451649	ENSP00000411217	<i>CC2D2B</i>	NM_001159747.1	c.844G>A	p.E282K	rs111687262	0,0023
10	105651 955	105651 955	1	G	A	ENSG00000107960	ENST00000224950	ENSP00000224950	<i>OBFC1</i>	NM_024928.4	c.809C>T	p.A270V	rs146867381	0,0023
11	751133 58	751133 60	3	TG G	-	ENSG00000149273	ENST00000278572	ENSP00000278572	<i>RPS3</i>	NM_001260506.1	c.266_268del TGG	p.V90del	rs141837939	

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
11	961176 41	961176 41	1	G	C	ENSG00000149231	ENST00000423339	ENSP00000397156	CCDC82	NM_024725.3	c.271C>G	p.Q91E	rs145171089	0,00 17
11	108559 761	108559 761	1	G	A	ENSG00000178105	ENST00000322536	ENSP00000314348	DDX10	NM_004398.2	c.947G>A	p.S316N	rs143049163	0,00 06
11	111583 019	111583 019	1	G	A	ENSG00000170145	ENST00000304987	ENSP00000305976	SIK2	NM_015191.1	c.1186G>A	p.V396M	rs142089853	0,00 13
11	116729 221	116729 221	1	G	A	ENSG00000160584	ENST00000292055	ENSP00000292055	SIK3	NM_025164.3	c.2642C>T	p.P881L		0,00 01
11	118772 018	118772 018	1	G	A	ENSG00000186174	ENST00000334801	ENSP00000335320	BCL9L	NM_182557.2	c.2434C>T	p.L812F	rs148630206	0,00 49
11	122817 429	122817 429	1	C	T	ENSG00000109944	ENST00000227349	ENSP00000227349	C11orf63	NM_024806.2	c.1858C>T	p.R620C	rs144645253	0,00 02
11	123989 718	123989 718	1	G	A	ENSG00000110002	ENST00000456829	ENSP00000407726	VWA5A	NM_014622.4	c.682G>A	p.V228M	rs145731633	0,00 26
11	124757 039	124757 039	1	A	T	ENSG00000154133	ENST00000306534	ENSP00000304945	ROBO4	NM_019055.5	c.2269T>A	p.C757S	rs148029461	0,00 15
11	128710 122	128710 122	1	C	T	ENSG00000151704	ENST00000392665	ENSP00000376433	KCNJ1	NM_153767.2	c.17G>A	p.R6Q	rs139185738	0,00 1
12	437713 62	437713 62	1	C	T	ENSG00000173157	ENST00000389420	ENSP00000374071	ADAMTS20	NM_025003.3	c.4801G>A	p.A1601T	rs76289805	0,00 44
12	491656 48	491656 48	1	G	A	ENSG00000174233	ENST00000550422	ENSP00000446730	ADCY6	NM_020983.2	c.2737C>T	p.R913C	rs138465901	0,00 05

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
12	499939 29	499939 28	3	-	AT C	ENSG00000135436	ENST00000257894	ENSP00000257894	<i>FAM186B</i>	NM_032130.2	c.1494_1495insGAT	p.E498_M499insD		
12	578642 85	578642 85	1	C	G	ENSG00000111087	ENST00000543426	ENSP00000437607	<i>GLII</i>	NM_001160045.1	c.1378C>G	p.L460V		
12	580191 95	580191 97	3	GG C	CG T	ENSG00000135502	ENST00000320442	ENSP00000320217	<i>SLC26A10</i>	NM_133489.2	c.1476_1478delGGCinsCGT	p.A493V		
12	640618 82	640618 82	1	C	A	ENSG00000177990	ENST00000324472	ENSP00000315988	<i>DPY19L2</i>	NM_173812.4	c.292G>T	p.E98*	rs142119548	0,00 49
12	650852 33	650852 33	1	C	T	ENSG00000153179	ENST00000336061	ENSP00000336616	<i>RASSF3</i>	NM_178169.3	c.458-17C>T		rs80197243	0,00 46
12	806331 34	806331 34	1	A	C	ENSG00000165899	ENST00000458043	ENSP00000400895	<i>OTOGL</i>	NM_173591.3	c.940A>C	p.I314L		0,00 02
12	861987 73	861987 73	1	T	C	ENSG00000198774	ENST00000361228	ENSP00000354884	<i>RASSF9</i>	NM_005447.3	c.1015A>G	p.I339V	rs111305817	0,00 38
13	250277 44	250277 45	2	AT	GC	ENSG00000102699	ENST00000381989	ENSP00000371419	<i>PARP4</i>	NM_006437.3	c.2806_2807delATinsGC	p.M936A		
13	368279 69	368279 69	1	G	A	ENSG00000242715	ENST00000503173	ENSP00000426174	<i>CCDC169</i>	NM_001198908.1	c.439C>T	p.R147C	rs79770535	0,00 24
13	381589 45	381589 45	1	G	A	ENSG00000133110	ENST00000379747	ENSP00000369071	<i>POSTN</i>	NM_006475.2	c.1016C>T	p.T339I	rs9594223	0,00 49

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
13	413330 97	413330 97	1	G	A	ENSG00000102738	ENST00000323563	ENSP00000315397	<i>MRPS31</i>	NM_005830.3	c.586C>T	p.R196*	rs190789123	0,0001
13	428739 15	428739 15	1	A	G	ENSG00000023516	ENST00000025301	ENSP00000025301	<i>AKAP11</i>	NM_016248.3	c.1033A>G	p.I345V	rs150533586	0,0032
13	428744 25	428744 25	1	A	G	ENSG00000023516	ENST00000025301	ENSP00000025301	<i>AKAP11</i>	NM_016248.3	c.1543A>G	p.I515V	rs146646278	0,0018
13	428744 34	428744 34	1	A	G	ENSG00000023516	ENST00000025301	ENSP00000025301	<i>AKAP11</i>	NM_016248.3	c.1552A>G	p.I518V	rs141392488	0,0034
13	462881 49	462881 49	1	T	C	ENSG00000174015	ENST00000310521	ENSP00000309189	<i>SPERT</i>	NM_152719.1	c.989T>C	p.M330T		0,0017
13	532827 31	532827 31	1	A	C	ENSG00000136110	ENST00000377962	ENSP00000367198	<i>LECT1</i>	NM_007015.2	c.729T>G	p.N243K	rs138407146	0,0005
13	619881 07	619881 06	1	-	G	ENSG00000197991	ENST00000409186	ENSP00000386653	<i>PCDH20</i>	NM_022843.3	c.133-7_8insC			
13	759363 34	759363 34	1	T	G	ENSG00000136111	ENST00000377636	ENSP00000366863	<i>TBC1D4</i>	NM_014832.2	c.908A>C	p.D303A	rs115600951	0,0031
13	761119 29	761119 29	1	T	C	ENSG00000188243	ENST00000406936	ENSP00000385660	<i>COMMD6</i>	NM_203495.2	c.13A>G	p.S5G	rs111633743	0,0043
13	863691 88	863691 88	1	T	C	ENSG00000184564	ENST00000400286	ENSP00000383143	<i>SLITRK6</i>	NM_032229.2	c.1456A>G	p.K486E		
14	102675 307	102675 307	1	G	C	ENSG00000140153	ENST00000556807	ENSP00000450636	<i>WDR20</i>	NM_001242416.1	c.617G>C	p.C206S	rs61731156	0,0042

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
14	105410629	105410629	1	T	C	ENSG00000185567	ENST00000333244	ENSP00000353114	AHNAK2	NM_138420.2	c.11159A>G	p.H3720R		
14	105417231	105417233	3	AG A	GG T	ENSG00000185567	ENST00000333244	ENSP00000353114	AHNAK2	NM_138420.2	c.4555_4557 delTC- TinsACC	p.S1519T		
16	16101809	16101809	1	G	A	ENSG00000103222	ENST00000399410	ENSP00000382342	ABCC1	NM_004996.3	c.185G>A	p.R62Q	rs187769078	0,0013
16	28549471	28549471	1	C	T	ENSG00000176046	ENST00000324873	ENSP00000315559	NUPRI	NM_012385.2	c.118G>A	p.G40R	rs149997819	0,0007
16	57490504	57490504	1	G	A	ENSG00000088682	ENST00000262507	ENSP00000262507	COQ9	NM_020312.3	c.467G>A	p.R156Q		0,0002
16	67220256	67220256	1	A	G	ENSG00000179044	ENST00000314586	ENSP00000325674	EXOC3L1	NM_178516.3	c.1386-6T>C		rs73586907	0,0005
16	67327470	67327470	1	C	T	ENSG00000168676	ENST00000304372	ENSP00000305702	KCTD19	NM_001100.915.1	c.2195G>A	p.S732N	rs73592842	0,0049
16	70187460	70187460	1	G	A	ENSG00000090857	ENST00000288050	ENSP00000288050	PDPR	NM_017990.3	c.2219G>A	p.R740Q		
16	72831587	72831587	1	G	T	ENSG00000140836	ENST00000397992	ENSP00000438926	ZFH3	NM_001164.766.1	c.2252C>A	p.T751N		
16	81219292	81219292	1	G	A	ENSG00000166473	ENST00000337114	ENSP00000337397	PKD1L2	NM_001076.780.1	c.1802C>T	p.A601V		0,0001

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
16	84214701	84214701	1	C	G	ENSG00000103168	ENST00000570117	ENSP00000455247	TAF1C	NM_001243159.1	c.338G>C	p.G113A		
16	84229768	84229768	1	G	A	ENSG00000140955	ENST00000315906	ENSP00000325153	ADAD2	NM_001145400.1	c.1318G>A	p.A440T	rs143354458	0,0008
16	88500655	88500657	3	GA	AA	ENSG00000225614	ENST00000437464	ENSP00000402343	ZNF469	NM_001127464.1	c.6693_6695delGAAinsAAG	p.K2232R		
16	88804765	88804765	1	T	C	ENSG00000103335	ENST00000301015	ENSP00000301015	PIEZO1	NM_001142864.2	c.718A>G	p.I240V	rs114403731	0,0005
16	89291211	89291210	4	-	GT	ENSG00000170100	ENST00000306502	ENSP00000305203	ZNF778	NM_001201407.1			rs113560259	
17	43101806	43101806	1	C	T	ENSG00000172992	ENST00000342350	ENSP00000341504	DCAKD	NM_024819.4	c.691G>A	p.A231T		0,0004
17	45673795	45673795	1	G	C	ENSG00000141279	ENST00000322157	ENSP00000320324	NPEPPS	NM_006310.3	c.1503G>C	p.M501I	rs190795420	0,0003
18	29126431	29126431	1	G	A	ENSG00000046604	ENST00000261590	ENSP00000261590	DSG2	NM_001943.3	c.3082G>A	p.G1028S	rs150864240	0,0016
18	44140423	44140423	1	G	C	ENSG00000167210	ENST00000536736	ENSP00000444586	LOXHD1	NM_144612.6	c.2684C>G	p.T895S	rs115042043	0,0012
18	44174402	44174402	1	T	C	ENSG00000167210	ENST00000536736	ENSP00000444586	LOXHD1	NM_144612.6	c.1162A>G	p.I388V	rs115395163	0,0001

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
19	105416 83	105416 83	1	C	G	ENSG00000065989	ENST00000293683	ENSP00000293683	<i>PDE4A</i>	NM_001111308.1	c.163C>G	p.P55A	rs28610998	0,00 47
19	168610 84	168610 84	1	G	A	ENSG00000188039	ENST00000379808	ENSP00000369136	<i>NWD1</i>	NM_001007525.3	c.1631G>A	p.R544Q	rs148029259	0,00 22
19	169185 49	169185 49	1	G	A	ENSG00000188039	ENST00000379808	ENSP00000369136	<i>NWD1</i>	NM_001007525.3	c.3889G>A	p.E1297K	rs144013868	0,00 36
19	169189 18	169189 18	1	C	T	ENSG00000188039	ENST00000379808	ENSP00000369136	<i>NWD1</i>	NM_001007525.3	c.4258C>T	p.R1420C	rs147984852	0,00 39
19	175664 81	175664 81	1	T	C	ENSG00000171773	ENST00000301944	ENSP00000305631	<i>NXNLI</i>	NM_138454.1	c.614A>G	p.E205G		
19	429059 79	429059 79	1	G	C	ENSG00000079435	ENST00000244289	ENSP00000244289	<i>LIPE</i>	NM_005357.2	c.3216C>G	p.C1072W		
19	469730 02	469730 02	1	G	A	ENSG00000182013	ENST00000313683	ENSP00000318131	<i>PNMAL1</i>	NM_018215.3	c.1291C>T	p.R431C	rs115395326	0,00 25
19	515192 00	515192 00	1	C	T	ENSG00000129451	ENST00000358789	ENSP00000351640	<i>KLK10</i>	NM_145888.2	c.482G>A	p.R161H		0,00 03
19	522494 42	522494 42	1	C	T	ENSG00000171051	ENST00000304748	ENSP00000302707	<i>FPR1</i>	NM_002029.3	c.806G>A	p.R269H	rs142210016	0,00 45
19	529193 25	529193 25	1	G	C	ENSG00000167555	ENST00000360465	ENSP00000353652	<i>ZNF528</i>	NM_032423.2	c.1220G>C	p.R407T		
19	530865 65	530865 65	1	T	A	ENSG00000167562	ENST00000540331	ENSP00000444339	<i>ZNF701</i>	NM_001172655.1	c.1451T>A	p.V484D		



Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
19	534537 64	534537 64	1	C	T	ENSG00000180257	ENST00000357666	ENSP00000350295	ZNF816	NM_001202457.1	c.1264G>A	p.E422K	rs145074022	0,00 28
19	573255 37	573255 37	1	G	C	ENSG00000198300	ENST00000326441	ENSP00000326581	PEG3	NM_006210.2	c.4273C>G	p.P1425A	rs139570920	0,00 31
19	577167 68	577167 68	1	G	A	ENSG00000083844	ENST00000536056	ENSP00000440376	ZNF264	NM_003417.4	c.164G>A	p.C55Y	rs61730300	0,00 34
19	578675 93	578675 93	1	G	A	ENSG00000131845	ENST00000282286	ENSP00000282286	ZNF304	NM_020657.2	c.356G>A	p.R119H	rs61731266	0,00 43
19	586395 91	586395 91	1	T	C	ENSG00000181894	ENST00000358067	ENSP00000350773	ZNF329	NM_024620.3	c.1280A>G	p.Y427C		
2	320080 1	320080 1	1	C	T	ENSG00000032389	ENST00000382125	ENSP00000371559	TSSCI	NM_003310.2	c.517-13G>A		rs140582772	0,00 22
2	365379 8	365379 8	1	C	G	ENSG00000118004	ENST00000402922	ENSP00000385653	COLEC11	NM_001255.988.1	c.17C>G	p.P6R	rs141032325	0,00 5
2	117184 99	117184 99	1	C	A	ENSG00000196208	ENST00000381483	ENSP00000370892	GREB1	NM_033090.2	c.714C>A	p.F238L	rs111337760	0,00 14
2	154328 66	154328 66	1	T	C	ENSG00000151779	ENST00000281513	ENSP00000281513	NBAS	NM_015909.2	c.4822A>G	p.M1608V	rs140868609	0,00 26
2	272613 75	272613 75	1	G	C	ENSG00000119777	ENST00000238788	ENSP00000238788	TMEM214	NM_017727.4	c.1268G>C	p.S423T		0,00 03
2	290928 25	290928 25	1	C	T	ENSG00000171103	ENST00000306108	ENSP00000302801	TRMT61B	NM_017910.3	c.319G>A	p.G107R	rs138934242	0,00 11

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
2	314722 83	314722 83	1	G	A	ENSG00000013016	ENST00000322054	ENSP00000327116	<i>EHD3</i>	NM_014600.2	c.451G>A	p.V151I	rs116417209	0,00 26
2	152476 093	152476 093	1	C	T	ENSG00000183091	ENST00000427231	ENSP00000416578	<i>NEB</i>	NM_001164507.1	c.10744G>A	p.V3582I	rs139798654	0,00 2
2	177053 728	177053 728	1	G	C	ENSG00000128645	ENST00000331462	ENSP00000328598	<i>HOXD1</i>	NM_024501.1	c.199G>C	p.A67P		
2	183822 314	183822 314	1	T	C	ENSG00000061676	ENST00000360982	ENSP00000354251	<i>NCKAP1</i>	NM_205842.1	c.1910A>G	p.K637R		
2	196729 372	196729 373	2	TG	-	ENSG00000118997	ENST00000312428	ENSP00000311273	<i>DNAH7</i>	NM_018897.2	c.7006_7007delCA	p.H2336Cfs*23		
2	196729 376	196729 377	2	TG	GA	ENSG00000118997	ENST00000312428	ENSP00000311273	<i>DNAH7</i>	NM_018897.2	c.7002_7003delCAinsTC	p.S2335R		
2	211456 637	211456 637	1	A	T	ENSG00000021826	ENST00000430249	ENSP00000402608	<i>CPS1</i>	NM_001122633.2	c.1048A>T	p.T350S	rs1047883	
2	216176 870	216176 870	1	C	T	ENSG00000138363	ENST00000236959	ENSP00000236959	<i>ATIC</i>	NM_004044.6	c.5C>T	p.A2V	rs138988481	0,00 34
2	219263 158	219263 158	1	C	T	ENSG00000144579	ENST00000443891	ENSP00000392248	<i>CTDSP1</i>	NM_001206878.1	c.23C>T	p.T8I		
2	219508 180	219508 180	1	C	T	ENSG00000115568	ENST00000411696	ENSP00000398798	<i>ZNF142</i>	NM_001105537.1	c.3059G>A	p.R1020H		0,00 04
2	219603 790	219603 790	1	A	G	ENSG00000135912	ENST00000392102	ENSP00000375951	<i>TTLA</i>	NM_014640.4	c.1391A>G	p.N464S	rs148659460	0,00 11

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
2	219617 897	219617 897	1	T	G	ENSG00000135912	ENST00000392102	ENSP00000375951	<i>TTLA4</i>	NM_014640.4	c.3247T>G	p.S1083A	rs140352764	0,0004
2	219874 702	219874 702	1	C	G	ENSG00000181378	ENST00000441968	ENSP00000413377	<i>CCDC108</i>	NM_194302.2	c.4414G>C	p.A1472P	rs142244209	0,0002
20	299770 11	299770 12	2	GT	AC	ENSG00000180483	ENST00000376315	ENSP00000365492	<i>DEFB119</i>	NM_153323.3	c.83_84delA-CinsGT	p.H28R		
22	195115 20	195115 20	1	C	T	ENSG00000184113	ENST00000403084	ENSP00000384554	<i>CLDN5</i>	NM_003277.3	c.514G>A	p.A172T		0,0022
22	213853 93	213853 93	1	C	T	ENSG00000099960	ENST00000403586	ENSP00000384278	<i>SLC7A4</i>	NM_004173.2	c.709G>A	p.V237I	rs147752463	0,0032
22	251155 24	251155 24	1	T	C	ENSG00000184571	ENST00000332271	ENSP00000330031	<i>PIWIL3</i>	NM_001255.975.1	c.2564A>G	p.Y855C	rs115937238	0,0045
22	261813 97	261813 97	1	C	T	ENSG00000133454	ENST00000536101	ENSP00000441229	<i>MYO18B</i>	NM_032608.5	c.2315C>T	p.T772M	rs112900389	0,0048
22	262702 92	262702 92	1	C	A	ENSG00000133454	ENST00000536101	ENSP00000441229	<i>MYO18B</i>	NM_032608.5	c.3991C>A	p.Q1331K		
22	296599 53	296599 53	1	G	A	ENSG00000100263	ENST00000216085	ENSP00000216085	<i>RHBDD3</i>	NM_012265.1	c.403C>T	p.R135C	rs2231394	0,0034
22	329142 31	329142 33	3	CT C	(T)3	ENSG00000185666	ENST00000358763	ENSP00000351614	<i>SYN3</i>	NM_133633.2	c.1407_1409delGAG-ins(A)3	p.S470N		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
22	313309 17	313309 17	1	C	T	ENSG00000133422	ENST00000215862	ENSP00000215862	<i>MORC2</i>	NM_014941 .1	c.1858G>A	p.V620I	rs14449 3873	0,00 05
22	361249 37	361249 37	1	C	T	ENSG00000128313	ENST00000249044	ENSP00000249044	<i>APOL5</i>	NM_030642 .1	c.1294C>T	p.R432*	rs14358 1523	0,00 07
22	367082 79	367082 79	1	G	A	ENSG00000100345	ENST00000216181	ENSP00000216181	<i>MYH9</i>	NM_002473 .4	c.1555-12C>T		rs14864 1114	0,00 45
22	385652 47	385652 47	1	T	C	ENSG00000184381	ENST00000335539	ENSP00000335149	<i>PLA2G6</i>	NM_001199 562.1	c.187A>G	p.R63G	rs11570 606	0,00 41
22	453124 30	453124 30	1	G	C	ENSG00000056487	ENST00000313237	ENSP00000324403	<i>PHF21B</i>	NM_138415 .4	c.294C>G	p.F98L	rs15084 4420	0,00 11
22	509627 62	509627 62	1	C	T	ENSG00000130489	ENST00000535425	ENSP00000444242	<i>SCO2</i>	NM_005138 .2	c.79G>A	p.G27R		
3	407753 1	407753 1	1	G	A	ENSG00000134121	ENST00000397491	ENSP00000380628	<i>CHLI</i>	NM_001253 387.1	c.1658G>A	p.S553N	rs13800 0940	0,00 1
3	998480 5	998480 5	1	C	T	ENSG00000163703	ENST00000326434	ENSP00000321856	<i>CRELD1</i>	NM_001031 717.3	c.862C>T	p.R288C		
3	429566 70	429566 70	1	T	G	ENSG00000182983	ENST00000440367	ENSP00000405047	<i>ZNF662</i>	NM_207404 .3	c.1105T>G	p.F369V	rs13984 1182	0,00 03
3	430743 71	430743 71	1	G	C	ENSG00000144649	ENST00000430121	ENSP00000407301	<i>FAM198A</i>	NM_001129 908.2	c.616G>C	p.A206P	rs11567 2213	0,00 41
3	522557 39	522557 39	1	C	T	ENSG00000239732	ENST00000360658	ENSP00000353874	<i>TLR9</i>	NM_017442 .3	c.2593G>A	p.E865K		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
3	57528509	57528509	1	A	G	ENSG00000174844	ENST00000311202	ENSP00000312554	<i>DNAH12</i>	NM_198564.3	c.89T>C	p.I30T	rs116066702	0,0018
3	64547248	64547248	1	A	G	ENSG00000163638	ENST00000498707	ENSP00000418735	<i>ADAMTS9</i>	NM_182920.1	c.4698+6T>C			0,0003
3	67054564	67054564	1	A	T	ENSG00000163376	ENST00000417314	ENSP00000401878	<i>KBTD8</i>	NM_032505.2	c.1173A>T	p.K391N	rs35999415	0,0018
3	111297908	111297908	1	A	C	ENSG00000153283	ENST00000352690	ENSP00000342040	<i>CD96</i>	NM_005816.4	c.578A>C	p.Q193P	rs61733706	0,0046
4	1656883	1656883	1	G	C	ENSG00000174137	ENST00000461064	ENSP00000418243	<i>FAM53A</i>	NM_001174070.1	c.704C>G	p.P235R		0,0043
4	1857638	1857638	1	G	A	ENSG00000168924	ENST00000302787	ENSP00000305653	<i>LETM1</i>	NM_012318.2	c.40C>T	p.P14S		
4	4281230	4281230	1	G	A	ENSG00000145220	ENST00000452476	ENSP00000397367	<i>LYAR</i>	NM_017816.2	c.373C>T	p.H125Y	rs139908100	0,0018
4	5798790	5798790	1	G	A	ENSG00000072840	ENST00000264956	ENSP00000264956	<i>EVC</i>	NM_153717.2	c.1928G>A	p.R643H	rs144906677	0,0002
4	8098832	8098832	1	A	C	ENSG00000163995	ENST00000447017	ENSP00000393511	<i>ABLIM2</i>	NM_001130083.1	c.332T>G	p.V111G		
4	38924409	38924409	1	T	C	ENSG00000197712	ENST00000358869	ENSP00000351740	<i>FAM114A1</i>	NM_138389.2	c.964T>C	p.S322P	rs35331702	0,0003
4	42403134	42403134	1	A	G	ENSG00000178343	ENST00000319234	ENSP00000326445	<i>SHISA3</i>	NM_001080505.1	c.383A>G	p.E128G		

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
4	528608 84	528608 84	1	A	C	ENSG00000188993	ENST00000343457	ENSP00000341944	<i>LRRC66</i>	NM_001024611.1	c.2304T>G	p.N768K	rs191736191	0,0004
4	128816 138	128816 138	1	A	G	ENSG00000142731	ENST00000270861	ENSP00000270861	<i>PLK4</i>	NM_014264.4	c.2593A>G	p.T865A	rs113867661	0,0007
4	126355 433	126355 433	1	A	G	ENSG00000196159	ENST00000394329	ENSP00000377862	<i>FAT4</i>	NM_024582.4	c.7052A>G	p.N2351S	rs145105421	0,0012
4	140213 733	140213 733	1	C	G	ENSG00000109390	ENST00000394223	ENSP00000377770	<i>NDUFC1</i>	NM_002494.3	c.202G>C	p.E68Q	rs72939460	0,0007
5	727945 25	727945 25	1	C	G	ENSG00000145741	ENST00000380591	ENSP00000369965	<i>BTF3</i>	NM_001037637.1	c.33C>G	p.D11E		0,0008
5	763730 67	763730 68	2	GC	(T)2	ENSG00000132846	ENST00000255198	ENSP00000255198	<i>ZBED3</i>	NM_032367.2	c.636_637del GCins(A)2	p.P213T		
5	763732 40	763732 41	2	AG	GC	ENSG00000132846	ENST00000255198	ENSP00000255198	<i>ZBED3</i>	NM_032367.2	c.463_464del CTinsGC	p.L155A		
5	790259 99	790259 99	1	G	A	ENSG00000164309	ENST00000446378	ENSP00000394770	<i>CMYA5</i>	NM_153610.3	c.1411G>A	p.A471T	rs114134827	0,0035
5	806596 84	806596 84	1	C	T	ENSG00000172497	ENST00000307624	ENSP00000303246	<i>ACOT12</i>	NM_130767.2	c.283G>A	p.D95N		
5	981289 37	981289 37	1	G	A	ENSG00000174136	ENST00000308234	ENSP00000308219	<i>RGMB</i>	NM_001012761.2	c.917G>A	p.S306N	rs116038820	0,0016
5	112228 031	112228 031	1	A	G	ENSG00000212643	ENST00000391338	ENSP00000375133	<i>ZRSR1</i>	NM_001204199.1	c.695A>G	p.Y232C	rs191227399	0,0018

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
5	139940 345	139940 345	1	G	A	ENSG00000113108	ENST00000354402	ENSP00000346378	<i>APBB3</i>	NM_006051.3	c.938-6C>T		rs146122293	0,00 45
5	140235 760	140235 760	1	T	C	ENSG00000250120	ENST00000307360	ENSP00000304234	<i>PCDHA10</i>	NM_031859.1	c.127T>C	p.F43L	rs138092357	0,00 1
5	140579 537	140579 537	1	G	A	ENSG00000197479	ENST00000354757	ENSP00000346802	<i>PCDHB11</i>	NM_018931.2	c.190G>A	p.A64T	rs149277755	0,00 02
5	140810 888	140810 888	1	G	T	ENSG00000253159	ENST00000252085	ENSP00000252085	<i>PCDHGA12</i>	NM_032094.1	c.562G>T	p.G188C	rs112186927	0,00 48
5	141243 593	141243 593	1	C	T	ENSG00000156453	ENST00000287008	ENSP00000287008	<i>PCDH1</i>	NM_032420.2	c.2303G>A	p.G768E		
5	148682 030	148682 030	1	A	G	ENSG00000157510	ENST00000515000	ENSP00000424427	<i>AFAP1L1</i>	NM_001146.337.1	c.377A>G	p.Y126C	rs143021070	0,00 13
5	149431 516	149431 516	1	G	A	ENSG00000113716	ENST00000502717	ENSP00000421917	<i>HMGXB3</i>	NM_014983.2	c.3640G>A	p.G1214S	rs192696313	0,00 04
5	149751 795	149751 795	1	G	A	ENSG00000070814	ENST00000439160	ENSP00000406888	<i>TCOF1</i>	NM_001195.141.1	c.866G>A	p.S289N	rs188279654	0,00 05
5	168244 341	168244 341	1	C	T	ENSG00000184347	ENST00000519560	ENSP00000430333	<i>SLIT3</i>	NM_003062.2	c.757G>A	p.V253M	rs143627388	0,00 03
6	740473 8	740473 8	1	G	A	ENSG00000124784	ENST00000379834	ENSP00000369162	<i>RIOK1</i>	NM_153005.1	c.942G>A	p.M314I	rs78123723	0,00 3
6	788899 0	788899 0	1	G	A	ENSG00000239264	ENST00000379757	ENSP00000369081	<i>TXNDC5</i>	NM_030810.3	c.911C>T	p.T304I	rs145305681	0,00 2

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
6	294085 54	294085 55	2	AC	CA	ENSG00000206474	ENST00000444197	ENSP00000419119	<i>OR10C1</i>	NM_013941.3	c.762_763del ACinsCA	p.L255I		
6	333857 59	333857 59	1	G	A	ENSG00000112514	ENST00000488034	ENSP00000417544	<i>CUTA</i>	NM_001014840.1	c.19C>T	p.P7S	rs14891 8153	0,00 19
6	350463 92	350463 92	1	C	G	ENSG00000064999	ENST00000360359	ENSP00000353518	<i>ANKS1A</i>	NM_015245.2	c.2242C>G	p.H748D		
6	354713 62	354713 62	1	C	T	ENSG00000112041	ENST00000229771	ENSP00000229771	<i>TULP1</i>	NM_003322.3	c.1297G>A	p.E433K	rs74461 100	0,00 18
6	369766 54	369766 54	1	A	G	ENSG00000146192	ENST00000274963	ENSP00000274963	<i>FGD2</i>	NM_173558.3	c.113A>G	p.H38R	rs73730 511	0,00 4
6	426180 68	426180 68	1	T	C	ENSG00000024048	ENST00000372899	ENSP00000361990	<i>UBR2</i>	NM_015255.2	c.2509T>C	p.C837R	rs13988 9031	0,00 2
6	431937 59	431937 59	1	T	G	ENSG00000112667	ENST00000393987	ENSP00000377556	<i>C6orf108</i>	NM_199184.1	c.388A>C	p.K130Q	rs22338 25	0,00 5
6	564017 38	564017 38	1	C	A	ENSG00000151914	ENST00000244364	ENSP00000244364	<i>DST</i>	NM_015548.4	c.8740G>T	p.V2914L		0,00 06
6	758486 60	758486 60	1	T	C	ENSG00000111799	ENST00000322507	ENSP00000325146	<i>COL12A1</i>	NM_004370.5	c.4975A>G	p.T1659A		
6	758581 65	758581 65	1	C	T	ENSG00000111799	ENST00000322507	ENSP00000325146	<i>COL12A1</i>	NM_004370.5	c.4196G>A	p.R1399H		0,00 01
6	759535 16	759535 16	1	C	G	ENSG00000112695	ENST00000370081	ENSP00000359098	<i>COX7A2</i>	NM_001865.3	c.31G>C	p.V11L	rs11312 3058	0,00 5



Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
6	75962 26	75962 26	1	G	C	ENSG00000112697	ENST00000475111	ENSP00000431007	<i>TMEM30A</i>	NM_001143958.1	c.434-20C>G			0,0003
6	117681 036	117681 036	1	A	G	ENSG00000047936	ENST00000368508	ENSP00000357494	<i>ROS1</i>	NM_002944.2	c.3584T>C	p.M1195T		
6	119177 592	119177 592	1	C	T	ENSG00000111877	ENST00000316316	ENSP00000314505	<i>MCM9</i>	NM_017696.2	c.1267G>A	p.D423N		
6	128150 821	128150 821	1	T	C	ENSG00000172673	ENST00000368248	ENSP00000357231	<i>THEMIS</i>	NM_001010923.2	c.509A>G	p.E170G	rs141326956	0,0039
6	138566 719	138566 719	1	C	T	ENSG00000112379	ENST00000251691	ENSP00000251691	<i>KIAA1244</i>	NM_020340.4	c.656C>T	p.A219V	rs75188756	0,0034
7	147798 1	147798 2	2	AG	CA	ENSG00000164877	ENST00000297508	ENSP00000297508	<i>MICALL2</i>	NM_182924.3	c.2130_2131delCTinsTG	p.L711V		
7	451227 62	451227 62	1	G	A	ENSG00000136274	ENST00000490531	ENSP00000420477	<i>NACAD</i>	NM_001146334.1	c.3017C>T	p.A1006V	rs58222681	0,0019
7	727568 09	727568 09	1	G	A	ENSG00000077800	ENST00000252037	ENSP00000252037	<i>FKBP6</i>	NM_003602.3	c.896G>A	p.C299Y	rs61735965	0,0011
7	730107 47	730107 47	1	G	A	ENSG00000009950	ENST00000429400	ENSP00000406296	<i>MLXIPL</i>	NM_032952.2	c.1885C>T	p.R629C		
7	979415 70	979415 70	1	C	T	ENSG00000006453	ENST00000005260	ENSP00000005260	<i>BAIAP2L1</i>	NM_018842.4	c.646G>A	p.E216K	rs140394537	0,0027
7	100170 497	100170 497	1	G	A	ENSG00000205307	ENST00000538735	ENSP00000442339	<i>SAP25</i>	NM_001168682.1	c.203C>T	p.A68V	rs138765930	0,0014

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
7	127251 134	127251 134	1	A	G	ENSG00000106331	ENST00000341640	ENSP00000339906	<i>PAX4</i>	NM_006193.2	c.1016T>C	p.L339P		
7	130023 543	130023 543	1	C	A	ENSG00000091704	ENST00000011292	ENSP00000011292	<i>CPA1</i>	NM_001868.2	c.604C>A	p.Q202K	rs61735 962	0,00 46
7	149418 594	149418 595	2	GT	TC	ENSG00000133619	ENST00000255992	ENSP00000255992	<i>KRBA1</i>	NM_032534.2	c.434_435del GTinsTC	p.G145V		
8	273248 12	273248 12	1	C	T	ENSG00000120903	ENST00000407991	ENSP00000385026	<i>CHRNA2</i>	NM_000742.3	c.383G>A	p.G128D	rs13868 2847	0,00 05
8	273625 15	273625 15	1	G	A	ENSG00000120915	ENST00000521780	ENSP00000430302	<i>EPHX2</i>	NM_001256.483.1	c.191G>A	p.R64H	rs13965 7060	0,00 1
8	306946 18	306946 18	1	T	C	ENSG00000133863	ENST00000256246	ENSP00000256246	<i>TEX15</i>	NM_031271.3	c.8033A>G	p.Y2678C	rs13953 5218	0,00 04
8	366420 02	366420 02	1	C	T	ENSG00000215262	ENST00000399881	ENSP00000382770	<i>KCNU1</i>	NM_001031.836.2	c.74C>T	p.A25V	rs11221 6721	0,00 21
8	395256 94	395256 94	1	T	C	ENSG00000168619	ENST00000265707	ENSP00000265707	<i>ADAM18</i>	NM_014237.2	c.1504T>C	p.C502R		
8	710505 25	710505 25	1	C	T	ENSG00000140396	ENST00000452400	ENSP00000399968	<i>NCOA2</i>	NM_006540.2	c.3071G>A	p.S1024N		0,00 03
8	776172 12	776172 12	1	G	A	ENSG00000091656	ENST00000521891	ENSP00000430497	<i>ZFHX4</i>	NM_024721.4	c.889G>A	p.A297T		
8	860897 08	860897 08	1	G	C	ENSG00000133740	ENST00000416274	ENSP00000398124	<i>E2F5</i>	NM_001951.3	c.53G>C	p.G18A	rs41508 41	

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens-Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut-CDNA	MutProt	Var-Name	VarFreq
8	861272 39	861272 39	1	T	A	ENSG00000176731	ENST00000524353	ENSP00000427911	<i>C8orf59</i>	NM_001099673.1	c.142A>T	p.N48Y	rs143705255	0,00 24
8	910311 62	910311 62	1	G	A	ENSG00000104325	ENST00000220764	ENSP00000220764	<i>DECRI</i>	NM_001359.1	c.298G>A	p.A100T		
8	145649 670	145649 671	2	AT	-	ENSG00000160948	ENST00000377348	ENSP00000366565	<i>VPS28</i>	NM_183057.1	c.403-19_20delAT		rs145810259	
8	146033 692	146033 692	1	T	C	ENSG00000197363	ENST00000359971	ENSP00000353058	<i>ZNF517</i>	NM_213605.2	c.1391T>C	p.L464P		
9	846061 57	846061 57	1	T	C	ENSG00000214929	ENST00000344803	ENSP00000341988	<i>FAM75D1</i>	NM_207416.2	c.772T>C	p.S258P		
9	866168 98	866168 98	1	A	G	ENSG00000178966	ENST00000325875	ENSP00000317039	<i>RMI1</i>	NM_024945.2	c.997A>G	p.T333A	rs146219782	0,00 43
9	959475 30	959475 30	1	G	A	ENSG00000165238	ENST00000395477	ENSP00000378860	<i>WNK2</i>	NM_006648.3	c.319G>A	p.A107T		
9	978430 13	978430 13	1	A	G	ENSG00000148120	ENST00000375315	ENSP00000364464	<i>C9orf3</i>	NM_001193329.1	c.2270A>G	p.K757R	rs143074032	0,00 03
9	107591 223	107591 223	1	C	T	ENSG00000165029	ENST00000374736	ENSP00000363868	<i>ABCA1</i>	NM_005502.3	c.2089G>A	p.A697T	rs114620717	0,00 26
9	139878 950	139878 950	1	G	A	ENSG00000214402	ENST00000408973	ENSP00000386162	<i>LCNLI</i>	NM_207510.3	c.131G>A	p.G44D	rs149819699	0,00 09
9	139906 828	139906 828	1	C	T	ENSG00000107331	ENST00000341511	ENSP00000344155	<i>ABCA2</i>	NM_212533.2	c.5188G>A	p.V1730I	rs192038143	0,00 05

Chr	Start	End	Size	Ref	Allele	Ens- Gene	EnsRNA	EnsProt	HGNC	RefSeq	Mut- CDNA	MutProt	Var- Name	VarFreq
<b>9</b>	140344 053	140344 053	1	T	A	ENSG00000165802	ENST00000265663	ENSP00000265663	<i>NELF</i>	NM_015537.4	c.1487A>T	p.Q496L		0,0002
<b>16</b>	299084 32	299084 33	2	(C) 2	TG	ENSG00000174938	ENST00000537485	ENSP00000439412	<i>SEZ6L2</i>	NM_001243333.1	c.89_90del(G) )2insCA	p.R30P		

Mittels dieser Strategie konnten zwei heterozygote Varianten in den Genen *LETMI* und *GLII* identifiziert werden, die als mögliche, ursächliche Veränderungen infrage kamen (Tabelle 46).

Tabelle 46: Übersicht der in Familie LKG-Kamerun LKG12 identifizierten Varianten und ihre Charakterisierung mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme.

Genomische Lokalisation (hg19)	Gen	Transkript	HGVS cDNA	HGVS Protein	Allelfrequenz (gnomAD)	Prädiktion			
						SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	CADD
chr4:1857638	<i>LETMI</i>	ENST00000302787	c.40C>T	p.(Pro14Ser)	0,0162	T	B	Poly	11.43
chr12:57864285	<i>GLII</i>	ENST00000228682	c.1762C>G	p.(Leu588Val)	-	T	B	Poly	16.04

T, *tolerated*; B, *benign*, Poly, *polymorphism*.

Bei beiden Varianten handelt es sich um Veränderungen, die auf Proteinebene zu einer Aminosäuresubstitution führen. Die Veränderung c.40C>T in *LETMI* führt an der Position 14 zu einem Austausch der Aminosäure Prolin durch Serin (p.Pro14Ser), während in *GLII* ein Leucin an Position 558 durch Valin ersetzt wird p.(Leu588Val). Die bioinformatische Analyse der beiden Varianten mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme ergab keine eindeutige Einordnung der Veränderungen als pathogen oder möglicherweise pathogen. Alle vier verwendeten Programme klassifizierten beide Varianten als Polymorphismus bzw. benigne Veränderungen (Tabelle 46). Zusätzlich zeigte die Ko-Segregationsanalyse zusätzlicher Familienmitglieder mittels Sanger-Sequenzierung für beide Veränderungen keine Überlappung der Varianten mit dem beobachteten Phänotyp in der Familie, so dass im Rahmen dieser Arbeit in dieser Familie keine ursächliche Variante für die vorliegende Lippen-Kiefer-Gaumenspalte identifiziert werden konnte.

## 4 Diskussion

Kraniofaziale Anomalien umfassen eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsbilder und Ausprägungsformen, die durch ein abnormes Wachstum und Entwicklungsstörungen des Schädels sowie des Gesichts hervorgerufen werden können. Neben Umweltfaktoren können kraniofaziale Anomalien auch durch eine Vielzahl verschiedener genetischer Faktoren hervorgerufen werden, die bislang allerdings nur teilweise aufgeklärt werden konnten. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein Patientenkollektiv mit unterschiedlichen syndromalen Formen der Kraniosynostose sowie isolierter Lippen-Kiefer-Gaumenspalte genetisch untersucht werden mit dem Ziel, bekannte und neue ursächliche genetische Faktoren zu identifizieren sowie ihren Einfluss auf die molekularen Mechanismen, die an der Entstehung der Erkrankungen beteiligt sind, zu charakterisieren.

### 4.1 Mutationsanalyse bei Patienten mit syndromalen Formen der Kraniosynostose

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Kohorte von 32 Patienten mit unterschiedlichen syndromalen Formen der Kraniosynostose bzw. nicht-syndromaler Form der Kraniosynostose untersucht. Die Patienten wurde von Dr. Krzysztof Dowgierd (Department of Maxillofacial, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Children's Hospital, Olsztyn, Polen) klinisch charakterisiert und Blutproben wurden zur Untersuchung der genetischen Grundlage der vorliegenden Erkrankungen zur Verfügung gestellt. Das klinische Spektrum des Patientenkollektivs umfasste dabei Fälle mit den klinischen Verdachtsdiagnosen Crouzon-Syndrom (9 Fälle), Apert-Syndrom (11 Fälle), Saethre-Chotzen-Syndrom (4 Fälle), Pierre-Robin-Syndrom (1 Fall) sowie un-spezifische Kraniosynostosen (7 Fälle). Da eine molekulargenetische Untersuchung dieser Patienten zuvor nicht erfolgt war, wurde initial das Patientenkollektiv hinsichtlich Mutationen in bekannten Genen untersucht, in denen bereits pathogene Veränderungen bei Patienten mit syndromalen Formen der Kraniosynostose beschrieben wurden. Diese initiale molekulargenetische Untersuchung umfasste dabei sogenannte *Hotspot*-Mutationsregionen der Gene *FGFR2* und *FGFR3* sowie des *TWIST1*-Gens, in denen Mutationen bei betroffenen Patienten dieses Erkrankungsspektrums gehäuft auftreten.

In sechs von neun Patienten (66,7 %), die klinisch die Diagnose eines Crouzon-Syndroms erhalten haben, konnte mittels dieser Strategie die genetische Ursache der vorliegenden Erkrankung ermittelt werden. Mittels PCR-basierter Amplifikation und Sequenzierung konnten bei

diesen Patienten heterozygote Missense-Veränderungen im *FGFR2*-Gen identifiziert werden, die bereits als kausale Veränderungen bei Patienten mit Crouzon-Syndrom beschrieben wurden (Robin et al. 1993; Cohen 1995; Meyers et al. 1996; Shotelersuk et al. 2003; Lajeunie et al. 2006; Al-Namnam et al. 2019). Auf molekularer Ebene konnte für drei der neun Patienten mit Crouzon-Syndrom die klinische Diagnose nicht molekulargenetisch abgesichert werden. Hier wurden in den untersuchten Bereichen im *FGFR2*-, *FGFR3*- sowie *TWIST1*-Gen keine ursächlichen Varianten detektiert. Die Gründe hierfür können unterschiedlicher Natur sein. Durch die gezielte Beschränkung der molekulargenetischen Analyse auf einzelne Abschnitte des *FGFR2*-Gens wird eine schnelle und effiziente Untersuchung großer Patientenkollektive ermöglicht. Gleichzeitig werden allerdings Mutationen, die sich außerhalb dieser Bereiche befinden, nicht detektiert. So beschreiben zum Beispiel Meyers et al. (1995), dass Mutationen in *FGFR3* zu Crouzon-Syndrom mit Acanthosis nigricans führen können. Eine Ausdehnung der untersuchten Regionen über die Grenzen der *Hotspot*-Bereiche im *FGFR2*-Gen hinweg könnte also gegebenenfalls zur Aufklärung der drei mutationsnegativen Patienten beitragen.

Mit rund 66,7% konnte mittels *Hotspot*-Mutation Screening eine recht hohe Aufklärungsrate erreicht werden. Das Crouzon-Syndrom ist assoziiert mit autosomal dominanten *gain-of-function*-Mutationen, Deletionen, Insertionen und Missense-Mutationen in *FGFR2*. In diesem Zusammenhang beschreiben Ornitz und Itoh (2015) die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundene Mutation an der Stelle p.Cys342Tyr, die u.a. zu Formveränderungen des Gehirns, aber nicht zu einer Gesamtvolumenänderung führt. Insgesamt führen Veränderungen im *FGFR*-Signalweg zu multiplen Veränderungen, da sie schon in der frühen Entwicklung der Organogenese beim Embryo oder auch später zum Beispiel bei dem Zellmetabolismus eine Rolle spielen (Ornitz und Itoh 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit lag die Probe eines Patienten vor, bei dem die klinische Verdachtsdiagnose eines Pierre-Robin-Syndroms bestand. Bei diesem Patienten konnte mittels der angewandten Analysemethode eine genetische Ursache für die vorliegende Erkrankung nicht detektiert werden. Es wurden sequenzielle Untersuchungen des *FGFR2*- und *FGFR3*-Gens vorgenommen und keine pathogenen Veränderungen in den untersuchten Bereichen gefunden. Das Pierre-Robin-Syndrom wird in den weiten Kreis der kraniofazialen Malformationen eingeordnet. Bislang wurden Mutationen in *BMPRI1B* (Yang et al. 2017), *SOX9* sowie *KCNJ2* (Jakobsen et al. 2007) als ursächlich für das Pierre-Robin-Syndrom beschrieben. Ferner können auch strukturelle Veränderungen wie Translokationen zu diesem Krankheitsbild führen. Diese Arten von Mutationen sind aber mit der für die vorliegende Arbeit gewählten Technik der PCR kaum

aufzudecken. Die Ausweitung der molekulargenetisch untersuchten Gene sowie die Anwendung zusätzlicher zytogenetischer sowie molekular-zytogenetischer Untersuchungsmethoden wie zum Beispiel Array-CGH, FISH könnten in diesem Fall dazu beitragen, die genetische Ursache der vorliegenden Erkrankung zu entschlüsseln (Ratan et al. 2017).

Ferner lagen sieben Proben von Patienten mit klinisch diagnostizierten Kraniosynostosen vor. Wie zuvor beschrieben werden bei Kraniosynostosen syndromale sowie nicht-syndromale Formen unterschieden. In ca. 80% der Fälle liegt eine nicht-syndromale Kraniosynostose vor (Rachwalski et al. 2013). Aufgrund von Zwillingsstudien wird derzeit angenommen, dass nicht-syndromale Kraniosynostosen multifaktoriellen Ursprungs sind, für deren Entstehung also sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse kausal sind (Lajeunie et al. 2005). In der Literatur wird oft ein Zusammenhang von *FGFR* zu Kraniosynostosen, vor allem zu syndromalen Formen von Kraniosynostosen, hergestellt (Buchanan et al. 2017). Um zu prüfen, ob dieser Zusammenhang auch auf die vorliegenden Patienten mit einer klinisch gestellten Verdachtsdiagnose einer nicht-syndromalen Kraniosynostose zutrifft, wurden hier Teile der Gene *FGFR2* und *FGFR3* untersucht, in denen bei syndromalen Kraniosynostosen häufig pathogene Veränderungen zu finden sind. Dabei konnten keine ursächlichen Mutationen identifiziert werden. Die Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen aus der wissenschaftlichen Literatur. Während bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer syndromalen Kraniosynostose häufig eine genetische Ursache identifiziert werden kann, bleiben isolierte Kraniosynostosen bzgl. ihrer genetischen Grundlage häufig ungeklärt (Robin et al. 1993; Massimi et al. 2012; Buchanan et al. 2017).

Aufgrund der multifaktoriellen Entstehung der letztlichen Ausschlussdiagnose einer nicht-syndromalen Kraniosynostose wäre an dieser Stelle eine Erweiterung oder Fortführung der Untersuchung bzw. eine Anschlussuntersuchung möglich. Neben Lebensstilinformationen, Gewohnheiten oder Verhalten während der Schwangerschaft könnten auch erweiterte genetische Analysen zum Beispiel aus dem Bereich des *next-generation sequencings* genutzt werden, um bei multifaktoriellen Erkrankungen mittels genomweiten Untersuchungen genetische Faktoren zu identifizieren, die einen Einfluss auf das Entstehen der Erkrankung haben. Grundlage dieser Untersuchungen bilden allerdings sehr große Patientenkollektive. Erst durch diese ist man in der Lage, bei multifaktoriellen Erkrankungen den Einfluss genetischer Komponenten zu ermitteln und konkrete genetische Veränderungen mit dem Auftreten einer Erkrankung in Verbindung zu bringen.



Im Rahmen dieser Arbeit wurden darüber hinaus vier Patienten mit der klinischen Diagnose Saethre-Chotzen-Syndrom untersucht und hinsichtlich einer möglichen Mutation in den Genen *FGFR2* und *TWIST1* charakterisiert. Bei einem der vier Patienten konnte die kausale Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit in *TWIST1* gefunden werden. Die identifizierte Mutation wurde allerdings bisher noch nicht beschrieben, kann jedoch trotzdem als höchstwahrscheinlich kausale Mutation, die zu dem beschriebenen Phänotyp führt, eingeordnet werden. Einige Mutationen, die zum Saethre-Chotzen-Syndrom führen, sind in *TWIST1* bekannt (Howard et al. 1997; Paznekas et al. 1998). In diesem Fall liegt eine Deletion von 13 Basenpaaren vor, welche zu einer Leserasterverschiebung führt und einen verfrühten Abbruch der Proteinbiosynthese hervorruft, was sehr wahrscheinlich einen Funktionsverlust des TWIST1-Proteins induziert. Diese Veränderung ist bei dem beschriebenen Patienten wahrscheinlich *de novo* aufgetreten. Die Mutter des Patienten trägt die Veränderung in *TWIST1* nicht. Eine paternale Probe lag nicht zur Testung vor. Trunkierende Mutationen, die zu einem verfrühten Abbruch der Proteinsynthese und zu einem Funktionsverlust des TWIST1-Proteins führen, sind in der wissenschaftlichen Literatur bereits bei Patienten mit Saethre-Chotzen-Syndrom beschrieben worden (Gripp et al. 2000; Elanko et al. 2001; Foo et al. 2009). Darüber hinaus zeigt ein Abgleich mit der gnomAD Datenbank, die die Genom- und Exom-Datensätze von etwa 120.000 gesunden Individuen umfasst, dass es sich bei der Sequenzveränderung c.80\_92del, p.Gln27Profs\*94 nicht um eine auch bei Normalpersonen nachweisbare Normvariante handelt. Trunkierende Veränderungen, die mit einem Funktionsverlust des TWIST1-Proteins einhergehen, sind in den Datensätzen dieser Datenbank stark unterrepräsentiert. Im Gegensatz zu den statistisch, aufgrund der Größe des Gens ermittelten 4,5 Varianten, die zu einem Funktionsverlust des Gens führen, befindet sich nur eine Variante in dieser Datenbank. Die Unterrepräsentierung von *loss-of-function*-Veränderungen in *TWIST1* in gesunden Kontrollindividuen unterstützt daher ebenfalls die Klassifizierung der identifizierten Varianten c.80\_92del im *TWIST1*-Gen als pathogenen und ursächlich für die vorliegende Erkrankung des Patienten.

Bei den übrigen drei Patienten konnte auf molekulargenetischer Ebene die klinische Verdachtsdiagnose Saethre-Chotzen-Syndrom nicht bestätigt werden. Paznekas et al. (1998) weisen neben Veränderungen in *TWIST1* auch auf einen möglichen Zusammenhang zu einer *FGFR*-Mutation und dem Saethre-Chotzen-Syndrom hin. Diese Verbindung konnte bei keinem der in dieser Arbeit vorliegenden Patientendaten festgestellt werden, da auch hier Teile von *FGFR2* und *FGFR3* untersucht wurden. Allerdings müssen auch bei dieser Beurteilung die Grenzen der angewandten molekulargenetischen Untersuchungsmethoden berücksichtigt werden. Größere strukturelle Deletionen oder Rearrangements im Bereich des *TWIST1*-Gens werden durch die

PCR-basierte Sequenzanalyse, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, nicht erfasst. Sie wurden in der wissenschaftlichen Literatur allerdings bereits bei Patienten mit Saethre-Chotzen-Syndrom beschrieben. Darüber hinaus müssen bei der Verdachtsdiagnose eines Saethre-Chotzen-Syndroms differenzialdiagnostisch zum Beispiel das Muenke-Syndrom oder die isolierte, einseitige Koronarhaftsynostosen berücksichtigt werden, die ihren genetischen Ursprung in anderen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchten Genen und genetischen Veränderungen haben (Gallagher et al. 1993).

Bei 100% (11 von 11) der Patienten aus dem vorliegenden Patientenkollektiv, bei denen die klinische Verdachtsdiagnose eines Apert-Syndroms vorlag, konnte diese Diagnose auch molekulargenetisch bestätigt werden. Bei vier Patienten konnte die heterozygote Mutation c.758C>G (p.Pro253Arg) in *FGFR2* gefunden werden. Bei sieben Patienten lag die heterozygote Mutation c.755C>G (p.Ser252Trp) in *FGFR2* vor. Alle Mutationen sind in *FGFR2* gelagert. In diesem Fall kongruieren die klinischen Ergebnisse mit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten genetischen Untersuchung. Die gefundenen ursächlichen Varianten im vorliegenden Patientenkollektiv sind bereits in der Literatur beschrieben (Wilkie et al. 1995; Slaney et al. 1996). Zieht man einen Vergleich mit Slaney et al. (1996), lässt sich erkennen, dass dieser bei 45 von 70 untersuchten Patienten die Ursache mit der Mutation p.Ser252Trp in *FGFR2* beziffern konnte. Dies entspricht in diesem Kollektiv einer Quote von ~64,3%. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der in dieser Arbeit untersuchten Gruppe von elf Patienten, so wird deutlich, dass von elf Patienten sieben die Mutation p.Ser252Trp in *FGFR2* trugen. Dies entspricht ~63,6% der hier betrachteten Patienten. Weiterhin haben Slaney et al. (1996) in dem untersuchten Patientenkollektiv von 70 Personen bei 25 Patienten die Mutation p.Pro253Arg gefunden. Dies entspricht im Patientenkollektiv von Slaney et al. (1996) ~35,7%. Analog konnte im Rahmen dieser Arbeit bei vier von elf Patienten die Mutation p.Pro253Arg in *FGFR2* nachgewiesen werden. Dies entspricht ~36,4%. Diese durchaus vergleichbare Tendenz lässt sich weiter untermauern, wenn eine weitere Verbindung zu Lajeunie et al. (2006) gezogen wird. Diese konnten bei 29 von 47 Patienten (~61,7%) mit dem Apert-Syndrom die Mutation p.Ser252Trp finden, wobei in dem hier vorliegenden Kollektiv ~63,6% diese Mutation tragen. Weiterhin lagen bei Lajeunie et al. (2006) bei 17 von 47 Patienten die Mutation p.Pro253Arg vor. Dies entspricht ~36,2%, wohingegen in dieser Arbeit der Anteil der Pro253Arg Mutationen bei ~36,4% in *FGFR2* gefunden werden konnte. Ferner konnten Lajeunie et al. (2006) bei einem der 47 Patienten mit dem Apert-Syndrom die Mutation p.Ser252Phe in *FGFR2* zeigen (~2,1%).

Vergleicht man den Anteil der gefundenen Mutationen innerhalb dieser unterschiedlichen Kollektive so wird ersichtlich, dass trotz einer in der vorliegenden Arbeit recht kleinen untersuchten

Patientengruppe die Mutationen in ähnlicher Frequenz auftreten. Um diese Tendenz weiter zu untermauern, könnte es im Weiteren von Interesse sein, die phänotypischen Ausprägungen, die Lebensstile der Vorfahren oder auch weitere mögliche Ursachen, die das Auftreten der gefundenen Mutationen begünstigen können, zu untersuchen. Glaser et al. (2003) haben sich bereits einem Teilaspekt dieses Thema angenommen und konnten eine erhöhte Auftretungswahrscheinlichkeit in Bezug auf das steigende Alter der Väter durch Mutationen in Spermien zeigen, die zum Apert-Syndrom führen können. Jedoch korrelierte die erhöhte Anzahl in prädisponierenden *FGFR2*-Mutationen in den Spermien nicht mit der Auftretungswahrscheinlichkeit bei den Kindern. Ein Vergleich von 70 Patienten gegenüber 11 Patienten mit dem Apert-Syndrom könnte durch eine größere Gesamtzahl der untersuchten Patienten in weiterführenden Studien mit höherer Evidenz untersucht werden. Denn im Vergleich von nur wenigen, ähnlichen Studien könnte es auch Zufall sein, dass eine ähnliche Verteilung der gefundenen Mutation in der vorliegenden Untersuchung aufgetreten ist. Pollock et al. (2007) beschreiben auch einen Zusammenhang von der p.Ser252Trp-Mutation in *FGFR2* mit auftretenden Endometriumkarzinomen. Hieraus lassen sich neue, weiterführende und interessante Fragestellungen ableiten. So könnte geprüft werden, ob die Keimbahn-Mutation in *FGFR2*, p.Ser252Trp auch zu einer erhöhten Auftretungswahrscheinlichkeit von Endometriumkarzinomen führt. Das vorliegende Patientenkollektiv lieferte keine Anzeichen für ein erhöhtes Auftreten von Tumoren, zum Beispiel Endometriumkarzinomen oder anderen Tumoren.

Die erzielten Ergebnisse untermauern ebenso wie die Angaben in der wissenschaftlichen Literatur, dass es sich beim Apert-Syndrom um eine homogene Erkrankung handelt, deren Ursache spezifische Veränderungen in *FGFR2* sind, die zu einer Aktivitätssteigerung des Signalweges führen.

Von dem betrachteten Patientenkollektiv, das 32 Patienten umfasste, konnten insgesamt 18 Fälle aufgeklärt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aufklärungsquote dabei stark abhängig von der jeweiligen Verdachtsdiagnose war. Die syndromalen Formen, die etwa mit einem Crouzon- oder Apert-Syndrom einhergingen, wiesen eine sehr gute, hohe Aufklärungsquote auf. Allerdings gab es auch bei den syndromalen Patienten nicht aufgeklärte Fälle, was für eine genetische Heterogenität (insbesondere bei zum Beispiel dem Pierre-Robin-Syndrom oder auch Saethre-Chotzen-Syndrom) spricht. Auch könnte hier die eher niedrige Anzahl der vorliegenden Fälle eine Ursache für die geringere Aufklärungsquote darstellen. Neue *next-*

*generation-sequencing*-basierte Methoden können einen zukünftigen Beitrag dazu leisten, ungelöste Fälle aufzuklären und neue, genetische Faktoren zu identifizieren. Darüber hinaus ist es wichtig, eine gute klinische Diagnostik durchzuführen. Denn wenn beispielsweise klinisch die Diagnose eines Saethre-Chatzen-Syndroms gestellt wird, dann wird – sofern die PCR-Technik zum Einsatz kommt – zunächst in anderen Genen gesucht als dort, wo gegebenenfalls bei der klinischen Diagnose eines Apert-Syndroms geforscht worden wäre. Hier bietet der Einsatz einer modernen Panel-Diagnostik einen Vorteil.

#### 4.1.1 Genetische Charakterisierung von Varianten in *MEGF8*

Neben der Untersuchung und Bestimmung von pathogenen Varianten in Mutationsschwerpunkten der Gene *FGFR2*, *FGFR3* und *TWIST1* bei Patienten mit syndromalen und isolierten Kraniosynostosen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ein Patient genetisch charakterisiert, der zuvor im Institut für Humangenetik (UMG) diagnostisch untersucht wurde. Mittels der Multigen-Panel-Analyse konnte bei diesem Patienten eine heterozygote Sequenzvariante in Exon 31 des *MEGF8*-Gens identifiziert werden. Diese Veränderung, c.5210C>A, generiert ein Stoppcodon und führt auf Proteinebene zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese des *MEGF8*-Proteins an Position 1737 (p.Ser1737\*) (König 2018). Zusätzlich wurde bei diesem Patienten eine weitere Veränderung in Intron 13 des *MEGF8*-Gens identifiziert. Dabei handelt es sich um eine Deletion von 4 bp in unmittelbarer Nähe der Akzeptor-Spleißstelle von Intron 13, c.2098-15\_-12delTCAC, die diagnostisch als Variante unklarer Signifikanz eingestuft wurde. Biallelische pathogene Veränderungen in *MEGF8* sind in der wissenschaftlichen Literatur als ursächlich für das autosomal rezessiv vererbte Carpenter-Syndrom beschrieben (Jenkins et al. 2007; Twigg et al. 2012). *MEGF8* gilt speziesübergreifend als stark konserviert und Mutationen können zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen führen (Zhang et al. 2009). Das Carpenter-Syndrom stellt eine syndromale Form einer Kraniosynostose dar, zu welchem der hier untersuchte Patient klinische Überlappungen aufwies. Daher stellte sich die Frage, ob die im diagnostischen Rahmen identifizierte Veränderung c.2098-15\_-12delTCAC in *MEGF8* einen pathogenen Effekt ausübt, indem zum Beispiel das korrekte Spleißen des *MEGF8*-Primärtranskripts beeinflusst wird. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Durch Analysen auf RNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass der Spleißvorgang an dieser Position nicht durch die Variante beeinflusst wird (vgl. Kapitel 3.1.3). Vor diesem Hintergrund kann eine Ursächlichkeit der identifizierten intronischen Veränderung in *MEGF8* ausgeschlos-

sen werden. Trotzdem stellt die Tatsache der Detektion einer eindeutig als pathogen eingestuft Variante, wie sie bei diesem Patienten bei der *nonsense*-Veränderung c.5210C>A (p.Ser1737\*) in *MEGF8* vorliegt, in einem klinisch relevanten Gen ein seltenes Ereignis dar. Im Rahmen der diagnostischen Untersuchung und der nachfolgenden wissenschaftlichen Aufarbeitung der identifizierten Veränderungen konnte zwar ein Effekt der intronischen Veränderung auf die unmittelbar angrenzenden exonischen Regionen ausgeschlossen, weitere Analysen der *MEGF8*-Transkripte wurden jedoch nicht durchgeführt (König 2018). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesem Patienten weitere, tief intronische Veränderungen vorliegen, die einen Einfluss auf den Spleißvorgang ausüben. Solche tief intronischen Varianten sind bereits für andere Gene und Erkrankungen beschrieben und werden im diagnostischen Rahmen nur teilweise erfasst, da sich routinediagnostische Genanalysen in der Regel auf die kodierenden Regionen sowie die unmittelbar angrenzenden intronischen Bereiche (+/- 30 bp von den jeweiligen Exon-/Intron- Übergänge) beschränken (Vaz-Drago et al. 2017; Malekkou et al. 2020). Es bedarf weiterführender Analysen der *MEGF8*-Transkripte zum Ausschluss bislang nicht entdeckter struktureller Veränderungen. Die Bestätigung oder das Ausschließen der Kausalität und Pathogenität von *MEGF8* sollte daher im Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen stehen.

#### **4.2 Mutationsanalyse mittels Multigen-Panels bei ausgewählten Patienten mit isolierter Kraniosynostose**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Patienten, bei denen klinisch eine Kraniosynostose festgestellt wurde, zur Identifizierung einer kausalen genetischen Veränderung einer Multigen-Panel-Analyse unterzogen. Diese bietet die Möglichkeit, größere DNA-Abschnitte und/oder mehrere Gene parallel auf pathogene Veränderungen zu untersuchen. Die Multigen-Panel-Analyse erfolgte auf Basis eines etablierten Kraniosynostose-Gen-Panels in Kooperation mit dem Molekulargenetischen Diagnostiklabor des Instituts für Humangenetik (Universitätsmedizin Göttingen). Das verwendete Kraniosynostose-Gen-Panel deckte dabei die kodierenden Bereiche von insgesamt 29 Genen ab, für die pathogene Veränderungen bei Patienten mit syndromalen und isolierten Kraniosynostosen beschrieben wurden. Eine Auswertung der 29 Gene ergab im Rahmen dieser Arbeit keine Veränderungen, die als kausale genetische Ursache für den vorliegenden Phänotyp der beiden Patienten infrage kommen. Die klinische Diagnose einer isolierten Kraniosynostose konnte also für diese beiden Patienten nicht auf eine ursächliche genetische Veränderung in den untersuchten Bereichen eines dieser Gene zurückgeführt werden.

Klinisch betrachtet handelt es sich bei nicht-syndromalen Kraniosynostosen um ein Erkrankungsspektrum, welches multifaktorielle Ursachen haben kann. Neben genetischen Faktoren können bei der Entstehung von Kraniosynostosen auch äußere Faktoren wie maternale Medikamenteneinnahme, Alkohol oder Rauchen während der Schwangerschaft, der vorgeburtliche Aufenthaltsort der Mutter oder eine Schilddrüsenerkrankung der Mutter und deren Behandlung ursächlich sein (Alderman et al. 1995; Reefhuis et al. 2003; Källén und Robert-Gnansia 2005; Rasmussen et al. 2007; Carmichael et al. 2008). Genetische Faktoren spielen insbesondere bei der Entstehung von syndromalen Formen von Kraniosynostosen eine Rolle. Andere Faktoren können aber auch für isolierte Kraniosynostose-Fälle verantwortlich sein (Messing-Jünger und Martini 2018). Daher ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass primär keine genetische Ursache für die Kraniosynostose der Patienten Gö224 und K4081 vorliegt. Die klinischen Angaben, die für diese beiden Patienten und ihre Familie vorlagen, zeigten nämlich darüber hinaus, dass es sich bei beiden Patienten um sporadische Fälle handelt. Für beide Betroffenen lagen keine Angaben über weitere Familienmitglieder mit isolierter Kraniosynostose vor, was die Möglichkeit einer genetischen Ursache der Erkrankung unterstützt hätte. Zur Klärung der Faktoren, die bei diesen beiden Patienten zur Entstehung der Kraniosynostose geführt haben, ist also eine weitere klinische Abklärung wichtig, mit dem Ziel, nicht-genetische Ursachen abzuklären, die im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen können. Zusätzlich kann im Rahmen einer klinischen Reevaluation auch abgeklärt werden, ob weitere Symptome bzw. phänotypische Merkmale bei den Patienten vorliegen, die richtungsweisend bezüglich eines (überlappenden) Krankheitsbildes sein können.

Generell stellt die Multigen-Panel-Analyse eine gute Möglichkeit dar, klinisch relevante Gene eines Erkrankungsspektrums zusammenzufassen und simultan auf Veränderungen zu analysieren. Die Beschränkung auf eine definierte Anzahl an Genen, die mit einer Erkrankung assoziiert sind, gewährleistet eine schnelle und kosteneffiziente Untersuchung der häufigsten genetischen Faktoren für eine Erkrankung oder ein Erkrankungsspektrum. Die Anzahl der identifizierten Varianten, die hinsichtlich ihrer möglichen Ursächlichkeit beurteilt und klassifiziert werden müssen, ist aufgrund des klar definierten Gen-Sets gering und erleichtert die Interpretation der gefundenen Veränderungen in Zusammenhang mit dem klar definierten klinischen Kontext. Ein weiterer Vorteil der Multigen-Panel-Analyse im Vergleich zur Exomsequenzierung ist die bessere und uniformere Abdeckung der Gene, wodurch strukturelle Varianten wie Deletionen und Duplikationen besser ermittelt werden können. Die Beschränkung auf eindeutig erkrankungsspezifische Gene vermindert zudem die Wahrscheinlichkeit von sekundären, zufälligen Befunden, die nicht der aktuellen Untersuchungsindikation entsprechen und häufig schwierig

zu interpretieren sind, wodurch eine zeitnahe und schnelle Analyse der genetischen Daten gewährleistet werden kann (Arneemann 2019). Insgesamt hat die Multigen-Panel-Analyse als Methode auch in anderen Gebieten der Medizin u.a. zu erheblicher Kostenreduktion und auch zu höherer Effizienz geführt (Eggermann et al. 2018; Pilarski 2021).

Allerdings werden im Rahmen der Multigen-Panel-Analyse in erster Linie genetische Faktoren untersucht, für die bereits ein Zusammenhang zur in Frage stehenden Erkrankung aufgezeigt werden konnte. Für die Identifizierung neuer, bislang nicht beschriebener Gene ist diese Methodik daher nicht geeignet. Für diese Zielsetzung ebenso wie für die Untersuchung von Patienten, die Merkmale unterschiedlicher Erkrankungsspektren aufweisen und daher nicht eindeutig klinisch einem bestimmten Syndrom zugeordnet werden können, bietet sich die Durchführung einer Exomsequenzierung an. Bei dieser werden die proteinkodierenden Bereiche aller etwa 19.000 humanen Gene simultan untersucht, wodurch sowohl bereits bekannte, erkrankungsspezifische Gene analysiert als auch neue genetische Varianten in bislang nicht mit dieser Erkrankung assoziierten Genen identifiziert werden können. Zwar stellt die Auswertung von Exomsequenzierungsdaten in einem diagnostischen Rahmen eine größere Herausforderung dar, da eine höhere Anzahl an Varianten detektiert wird und diese klassifiziert und hinsichtlich ihrer Ursächlichkeit eingeordnet werden müssen. Sie stellt aber insbesondere bei wissenschaftlichen Fallanalysen eine geeignete Methode zur molekulargenetischen Aufarbeitung von Patientenproben dar. Ein Vorteil dieser Methode stellt insbesondere auch für weitere Diagnose-schritte – etwa in der Zukunft – der bereits gewonnene Datensatz dar. Ist dieser einmal vorhanden, kann er, angepasst an neue wissenschaftliche Erkenntnisse oder auch Verdachtsdiagnosen, auch nachträglich wieder genutzt und untersucht werden. Dies kann als Chance betrachtet werden, es sollte jedoch auch bedacht werden, dass bei einer Begutachtung von vielen Genen auch Neben- bzw. Zusatzbefunde erkannt werden können (Fisher et al. 2015).

Die Durchführung einer Exomsequenzierung stellt daher einen möglichen nächsten Untersuchungsschritt zur Abklärung einer genetischen Ursache bei den beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten dar und sollte insbesondere für den Fall in Erwägung gezogen werden, dass eine neue klinische Reevaluation der Patienten zusätzliche Hinweise auf eine genetische Ursache der Kraniosynostose der Patienten liefert. Bei der Entschlüsselung von neuen krankheitsassoziierten Genen kommen unterschiedliche Methoden bzw. Analyseverfahren zum Tragen. So wird unter anderem auch auf die entsprechende Ko-Segregation geachtet und nach weiteren Patienten mit Mutationen in dem entsprechenden Gen bzw. Genen gesucht.

### 4.3 Identifizierung molekulargenetischer Ursachen für isolierte, nicht-syndromale Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Familien mit isolierten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten mittels *next-generation-sequencing*-basierter Exomsequenzierung untersucht, mit dem Ziel, neue kausale Gene für diese Erkrankung zu identifizieren. (vgl. Kapitel 3.2). Dazu wurden die Exomsequenzierungsdaten neun betroffener und zwei klinisch unauffälliger Familienmitglieder mittels der Exomanalysesoftware Varbank analysiert und mögliche Kandidatengene für das Auftreten einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte ermittelt. Die gefundenen Varianten wurden nachfolgend hinsichtlich ihrer funktionellen Effekte sowie der zellulären Rolle der kodierten Proteine aufgearbeitet und priorisiert sowie ausgewählte Varianten mittels Sanger-Sequenzierung auf ihre Ko-Segregation in den jeweiligen Familien untersucht. Insgesamt konnten mit dieser Strategie in zwei Familien Varianten in Kandidatengenomen identifiziert werden, die als genetische Ursache für die klinischen Merkmale der betroffenen Patienten in Frage kommen. In drei weiteren Familien ergab die Analyse der Exomsequenzierungsdaten keine Varianten, für die ein pathogener oder möglicherweise pathogener Einfluss im Zusammenhang mit der klinischen Diagnose einer isolierten Lippen-Kiefer-Gaumenspalte ermittelt werden konnte.

#### 4.3.1 Identifizierung einer pathogenen Veränderung in *PAX7* als molekulare Ursache für isolierte Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Im Zuge der Untersuchung der molekulargenetischen Ursache für isolierte Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in der indischen Familie LKG8 konnte im Rahmen meiner Arbeit eine Variante im *PAX7*-Gen identifiziert werden, die als ursächlich für den vorliegenden Phänotyp eingeschätzt werden kann. In beiden betroffenen Individuen dieser Familie konnte die heterozygote Nukleotidsubstitution c.229C>T im *PAX7*-Gen nachgewiesen werden, die auf Proteinebene zu einem Austausch der evolutionär hochkonservierten Aminosäure Arginin an Position 77 durch Cystein führt (p.Arg77Cys) (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20).

Das *paired-box-7*-(*PAX7*)-Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert und kodiert für den 520 Aminosäuren umfassenden Transkriptionsfaktor *PAX7*. Insgesamt umfasst die humane *PAX*-Familie neun Mitglieder, welche Heterodimere bilden können, die insbesondere in der Differenzierung von Geweben in frühen Entwicklungsstadien von Vertebraten eine wichtige Rolle spielen (Dahl et al. 1997; Monsoro-Burq 2015). Für *PAX7* wurde dabei eine wichtige Funktion in der embryonalen Entwicklung ermittelt. Diesbezüglich wird *PAX7* früh im Bereich des Schädels



exprimiert und ist entscheidend für die Neuralleisten-Induktion, indem es unter anderem die Expression der Neuralleisten-Marker *SOX9* und *SOX10* reguliert (Basch et al. 2006; Leslie et al. 2015; Monsoro-Burq 2015). In Untersuchungen transgener Mäusen konnte gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen das *PAX7*-Gen deletiert wurde, unter anderem nasale und maxilläre Malformationen aufzeigen (Mansouri et al. 1996; Leslie et al. 2015). Unterstützt wird die Rolle, die *PAX7* insbesondere in der maxillären und nasalen Entwicklung ausübt, auch durch eine Genomweite Assoziationsstudie, in deren Zuge ein Zusammenhang zwischen *PAX7* und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten hergestellt werden konnte (Beaty et al. 2013).

Die *PAX7*-Variante, die in dieser Familie identifiziert wurde, betrifft dabei eine Aminosäure innerhalb der *paired-box*-Domäne des *PAX7*-Proteins. Eine bioinformatische Analyse unter Verwendung vier unterschiedlicher Prädiktionsprogramme, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, ordnete den Austausch der Aminosäure Arginin an Position 77 des *PAX7*-Proteins durch Cystein als pathogen ein. Die betroffene Aminosäure ist dabei nicht nur speziesübergreifend in *PAX7*-Proteinen hochkonserviert, sondern ebenfalls innerhalb der humanen *PAX*-Proteinfamilie (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20). Die *paired-box*-Domäne der *PAX*-Proteinfamilie vermittelt konzertiert mit der Homöobox-Domäne des Proteins die Bindung des Transkriptionsfaktors an seine Zielsequenzen. Untersuchungen des *paired*-Proteins, dem *Drosophila* homolog des humanen *PAX3*, zeigten, dass die funktionelle Integrität beider Domänen notwendig für die Bindung an die DNA ist (Miskiewicz et al. 1996). Punktmutationen, bei denen die DNA-Bindefähigkeit der beiden Domänen separat und in Kombination ausgeschaltet wurde, führten zu einem Verlust der transaktivierende Eigenschaften des *paired*-Proteins (Miskiewicz et al. 1996). Auf struktureller Ebene führt die hier in der Arbeit identifizierte Veränderung zum Austausch der positiv geladenen Aminosäure Arginin durch Cystein. Arg77 befindet sich innerhalb der *paired-box*-Domäne von *PAX7* in einer *loop*-Region, die sich im Komplex mit DNA in unmittelbarer Nähe zum DNA-Rückgrat befindet, wie mittels kristallstruktureller Untersuchungen des humanen *PAX6* ermittelt werden konnte (Xu et al. 1999). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass der Austausch des Arginin 77 zu einer beeinträchtigten Interaktion mit der (negativ geladenen) DNA führt, wodurch die DNA-Bindekapazität der *paired-box*-Domäne reduziert und damit die Funktionen des gesamten *PAX7*-Proteins beeinflusst wird.

Die Ko-Segregationsanalyse der c.229C>T Variante in *PAX7* innerhalb der Familie LKG8 mittels Sanger-Sequenzierung ergab eine Ko-Segregation der Variante mit dem Auftreten der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte innerhalb der Familie bei allen mit Ausnahme von zwei Individuen, von denen DNA-Proben zur Untersuchung vorlagen: Bei dem ebenfalls betroffenen Individuum

Gö142 konnte die *PAX7*-Variante nicht nachgewiesen werden, während Gö144, eine klinisch als unauffällig charakterisierte Person, Trägerin der Veränderung in *PAX7* ist. Unterschiedliche Erklärungen für die fehlende Übereinstimmung des Genotyps dieser beiden Personen mit ihrem Phänotyp sind möglich. Es handelt sich bei der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte um eine Erkrankung, die unterschiedliche Ursachen haben kann und häufig ist. Neben genetischen Faktoren, die hier im Fokus der Untersuchung standen, können zum Beispiel auch Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle in der Entstehung dieses Phänotyps haben (vgl. Kapitel 1.1.3). Daher kann bei Patient Gö142 das Vorliegen einer Phänokopie nicht ausgeschlossen werden, also einer abweichenden, möglicherweise ebenfalls genetisch bedingten Ursache für die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte im Vergleich zu den übrigen betroffenen Individuen in der Familie. Gö144, als klinisch unauffällig beschrieben, ist dagegen Träger der identifizierten *PAX7*-Variante. Eine klinische Reevaluation des Phänotyps dieses Individuums im Rahmen dieser Arbeit war nicht möglich, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Gö144 aufgrund von variabler Expressivität initial als klinisch gesund charakterisiert wurde, trotzdem aber, wenn auch schwächer ausgeprägt, krankheitsspezifische Merkmale zeigt. Ebenso muss ein Erbgang mit reduzierter Penetranz für diese *PAX7*-Variante bei Patienten mit isolierter Lippen-Kiefer-Gaumenspalte berücksichtigt werden, da es sich bei *PAX7* um ein Gen handelt, welches bereits von Leslie et al. (2015) in Verbindung mit dem Auftreten einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte bei einem Patienten als pathogene *de novo* Veränderung (c.766C>T, in *PAX7*) beschrieben wurde. Es liegen allerdings bislang noch keine ausreichenden genetischen Daten vor, die die Ermittlung der Penetranz ermöglichen. Diese könnten auch mutationsabhängig sein. Die von Leslie et al. (2015) beschriebene Veränderung (c.766C>T, in *PAX7*) führt zum Aminosäureaustausch innerhalb der Homöobox-Domäne des *PAX7*-Proteins (p.Ala259Val), welcher essentiell für die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA und damit die Funktion des *PAX7*-Proteins ist. Mittels eines Luciferase-basierten Reporterassays konnten Leslie et al. (2015) nachweisen, dass durch diesen Aminosäureaustausch die transaktivierende Fähigkeit von *PAX7* reduziert wird, was zu einer verminderten Aktivierung der Expression von *PAX7*-Zielgenen führt (Leslie et al. 2015). Der Patient, der Träger dieser Veränderung ist, wurde durch Leslie et al. (2015) im Rahmen der Untersuchung eines Kollektivs an 1500 Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten identifiziert. Die phänotypischen Merkmale dieses Patienten entsprechen also denen, die für die Familie LKG8 klinisch zusammengefasst wurden. In beiden Fällen handelt es sich um Patienten mit isolierter, nicht-syndromaler Lippen-Kiefer-Gaumenspalte.

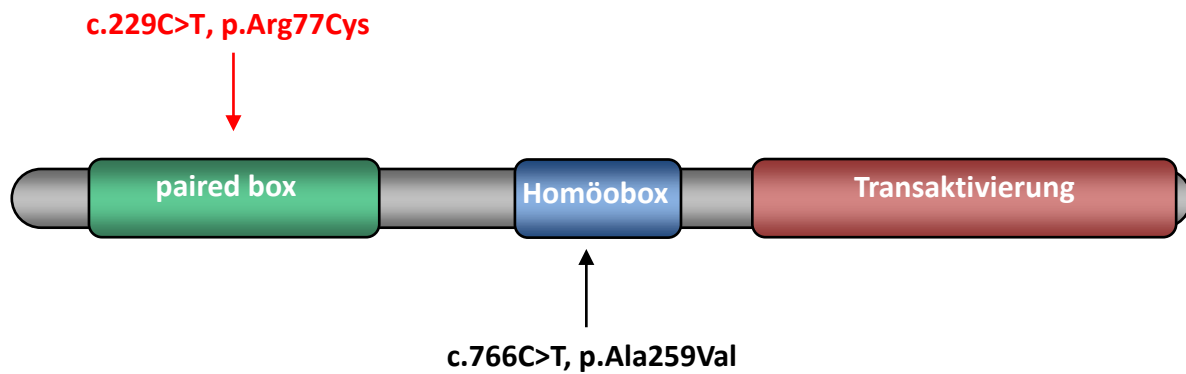


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors *PAX7*.

(Quelle: modifiziert nach Leslie et al. (2015)). Die Position der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Variante ist in Rot, die durch Leslie et al. (2015) beschriebene Veränderung in Schwarz markiert (Pfeile).

Um den Einfluss der in dieser Arbeit identifizierten Veränderung *p.Arg77Cys* auf die *PAX7*-Funktion zu untersuchen, wurde analog zu der von Leslie et al. (2015) durchgeführten Untersuchung ein Luciferase-Assay etabliert. Zusätzlich zu dieser Variante wurden dabei auch Expressionskonstrukte für wildtypisches *PAX7* sowie *PAX7* mit der Veränderung *p.Ala259Val*, die von Leslie et al. (2015) gefunden wurden, verwendet. Die Auswertung des Assays ergab ein starkes transaktivierendes Potential für wildtypisches *PAX7*, welches allerdings weder durch die *p.Arg77Cys* Variante noch durch die von Leslie et al. (2015) beschriebene Veränderung signifikant beeinflusst wurde. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte also weder ein möglicher Einfluss der *p.Arg77Cys* Variante nachgewiesen noch die Beeinträchtigung der *PAX7*-Funktion durch die von Leslie et al. (2015) beschriebenen Veränderung bestätigt werden. Ein direkter Vergleich der Luciferase-Assays, die zur Ermittlung der transaktivierenden Kapazität von *PAX7* durch Leslie et al. (2015) sowie im Zuge dieser Arbeit verwendet wurden, zeigt jedoch einige Unterschiede auf. In beiden Versuchsabläufen wurde die Promotorregion des murinen *Id3*-Gen als Zielsequenz für die Bindung von *PAX7* und Aktivierung der Luciferase-Expression verwendet. Bei dieser handelt es sich um eine Region, für die bereits die Bindung von *PAX7* sowie die Aktivierung der Expression des *Id3*-Gens nachgewiesen wurde (Kumar et al. 2009). Leslie et al. (2015) haben in ihrer Studie jedoch Reporterkonstrukte verwendet, in denen diese Sequenz in vierfacher Kopienzahl vor das Reporter gen kloniert wurde, während in dieser Arbeit nur eine einzelne Kopie dieser *PAX*-Zielregion verwendet wurde. Zusätzlich wurden unterschiedliche *PAX7*-Expressionsvektoren verwendet. In dieser Arbeit wurde *PAX7* in den pcDNA3-Vektor eingebracht. Dieser ermöglicht eine sehr starke Expres-

sion der Zielgene in den zellulären Systemen, die mit dem Vektor transfiziert werden. Möglicherweise wurden durch diese teilweise unphysiologisch hohen *PAX7*-Proteinmengen funktionelle Effekte der Varianten maskiert, was insgesamt zu dem negativen Ergebnis bezüglich einer funktionellen Beeinträchtigung sowohl durch die hier identifizierte p.Arg77Cys-Variante als auch die p.Ala259Val-Veränderung, die durch Leslie et al. (2015) als beschrieben wurde, geführt haben könnte. Zusammenfassend führen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu dem Ergebnis, dass die vorliegende Variante in *PAX7* ursächlich für die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte in der entsprechenden Familie ist, und führen unter Berücksichtigung des aktuellen Stands der Forschung *PAX7* als neues, ursächliches Gen für isolierte Lippen-Kiefer-Gaumenspalten ein.

#### **4.3.2 Identifizierung einer pathogenen Veränderung in *NEDD4L* als molekulare Ursache für isolierte Lippen-Kiefer-Gaumenspalten**

Im Zuge dieser Arbeit konnte in einer weiteren Familie mit isolierter Lippen-Kiefer-Gaumenspalte ebenfalls ein weiteres Kandidatengen ermittelt werden, welches möglicherweise ursächlich für die Erkrankung in dieser Familie ist. In Familie LKG11 konnte mittels Exomsequenzierung die Variante c.551C>T in *NEDD4L* identifiziert werden, die auf Proteinebene zu einem Austausch von Serin zu Phenylalanin an der Position 184 (p.Ser184Phe) führt.

Das *neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like (NEDD4L)*-Gen kodiert für eine 975 Aminosäuren umfassende E3-Ubiquitin Ligase (Harvey et al. 2001). *NEDD4L* wird ubiquitär exprimiert und spielt unter anderem in der Zellproliferation, Zellmigration und Apoptose eine wichtige Rolle (Broix et al. 2016). 2016 beschrieben Broix et al. (2016) erstmalig pathogene Veränderungen in *NEDD4L* in Patienten mit einer neuronalen Entwicklungsstörung mit periventrikulärer nodulärer Heterotopie. Sie identifizierten heterozygote, meist *de novo* Veränderungen in *NEDD4L* in sieben Patienten, die neben dem neuronalen Phänotyp zusätzlich faziale Auffälligkeiten sowie bilaterale Syndaktylien aufwiesen. Bei allen beschriebenen Varianten handelte es sich um *missense*-Veränderungen, die zu einem Aminosäureaustausch im *NEDD4L*-Protein führen, und Broix et al. (2016) konnten zeigen, dass diese Veränderungen, welche im C-Terminalen Bereich des Proteins clustern, die Funktion von *NEDD4L* beeinträchtigen. Die Veränderungen innerhalb der katalytisch aktiven HECT-Domäne des Proteins führen zu einer erhöhten Autoubiquitylierung von *NEDD4L* und induzieren dadurch einerseits den proteolytischen Abbau des Proteins selbst sowie darüber hinaus eine

Fehlregulation in mTor-/AKT-abhängigen Signalweg. In weiteren Studien konnte diese Schlüsselposition, die *NEDD4L* in der Kommunikation zwischen den PI3K-mTORC2 und TGF- $\beta$ -activin-Smad2-Smad3 Signalwegen innehat, bestätigt werden (Gao et al. 2009; Yu et al. 2015). Neben den oben genannten Merkmalen zeigten sechs der sieben durch Broix et al. (2016) beschriebenen Patienten zusätzlich eine Gaumenspalte. Neben seiner Funktion in neuronalem Gewebe unterstützt dies eine mögliche Rolle von *NEDD4L* in der Entstehung dieses Merkmals (Hsia et al. 2014). Im Gegensatz dazu liegt die hier im Zuge dieser Arbeit gefundene Variante in der N-terminalen Region des *NEDD4L*-Proteins und führt dort zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure innerhalb der C2-Domäne des Proteins, welche in die Ca<sup>2+</sup>abhängige Bindung von Phospholipiden involviert ist (Rizo und Südhof 1998). Anders als die von Broix et al. (2016) beschriebenen Varianten ergibt sich also für die p.Ser184Phe-Variante kein direkter Einfluss auf die katalytische Aktivität des Proteins, was eine Erklärungsmöglichkeit für den klinisch zwar überlappenden, dennoch aber distinkten Phänotyp bieten kann.

Durch die Analyse der Verteilung der Variante innerhalb der Familie LKG11 konnte gezeigt werden, dass die c.551C>T-Veränderung in *NEDD4L* mit der Erkrankung ko-segregiert. Ein Individuum, Gö295, welches klinisch als unauffällig charakterisiert wurde, konnte allerdings ebenfalls als Träger der *NEDD4L*-Variante identifiziert werden. Wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben, kommen unterschiedliche Gründe dafür in Frage, die trotz des möglicherweise pathogenen Effekts der Variante ihr Vorliegen bei diesem Individuum erklären.

Zusammenfassend kann die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Variante c.551C>T in *NEDD4L* (vgl. Abbildung 29) als mögliche genetische Ursache für die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte in dieser Familie angesehen werden. Allerdings sind weitere genetische und insbesondere funktionelle Untersuchungen notwendig, um einerseits die Kausalität dieser Variante zu bestätigen, zusätzlich aber auch die Pathomechanismen aufzuklären, die zu den unterschiedlichen klinischen Erscheinungsformen führen, die mit pathogenen Veränderungen in *NEDD4L* einhergehen, zu erklären.

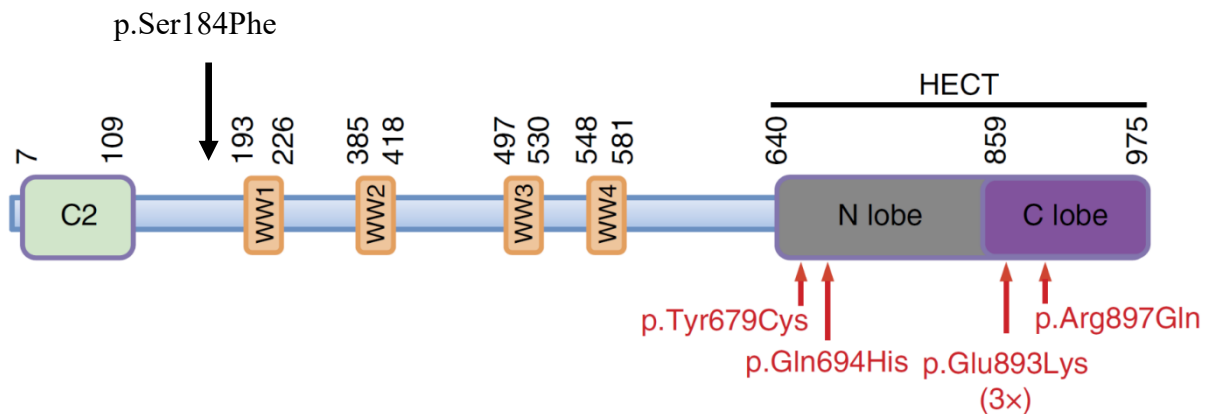


Abbildung 9: NEDD4L-Protein.

(Quelle: modifiziert nach Broix et al. (2016)). Positionen der beschriebenen Mutationen gegenüber der gefundenen Mutation von Broix et al. (2016) sind in Rot dargestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundene Mutationen sind in Schwarz dargestellt.

### 4.3.3 Ergebnis der genetischen Analysen der Familien LKG12, LKG21 sowie LKG-Kamerun

Für Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten aus drei weiteren Familien aus Indien sowie Kamerun konnten innerhalb der vorliegenden Arbeit keine krankheitsverursachenden Veränderungen mittels Exomsequenzierung identifiziert werden. Insgesamt wurden fünf betroffene Individuen aus den Familien LKG12, LKG21 sowie LKG-Kamerun mittels Exomsequenzierung untersucht. Die Analysen ergaben keine Kandidatengene, welche kausale, pathogene oder möglicherweise pathogene Veränderungen enthielten.

Für zwei Varianten, die in Familie LKG12 in den Genen *FGFR1* und *FGFR2* identifiziert wurden, konnten durch nachfolgende molekulargenetische und bioinformatische Analysen gezeigt werden, dass diese Veränderungen keinen Einfluss auf die Funktion des kodierten Proteins ausüben (*FGFR1*) oder nicht mit der Erkrankung in der Familie ko-segregierten (*FGFR3*). Weitere Veränderungen konnten im Zuge der Analyse der Exomsequenzierungsdaten nicht ermittelt werden. In der Familie LKG-Kamerun konnte aufgrund der fehlenden funktionellen Konsequenz der ermittelten Varianten ein Effekt für zwei identifizierte Veränderungen in den Genen *LETM1* und *GLI1* in Bezug auf die Entstehung der Erkrankung ausgeschlossen werden. Die bioinformatische Analyse dieser Varianten mittels unterschiedlicher Prädiktionsprogramme ergab, dass beide Veränderungen keinen Einfluss auf die Funktion der kodierten Proteine ha-

ben. In der Familie LKG21, in der ein Patient mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte molekulargenetisch untersucht wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Kandidatengen ermittelt werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse aus diesen drei Familien die Grenzen der hier verwendeten molekulargenetischen Methodik auf. Generell kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass die Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in diesen drei Familien einen nicht-genetischen Ursprung haben, durch die Auswahl der Familien und die Vielzahl der betroffenen Personen innerhalb jeder Familie wurde die Wahrscheinlichkeit dafür allerdings versucht zu minimieren. Eher verdeutlichen diese Ergebnisse daher die Limitierungen und Grenzen der Exomsequenzierung als Methodik zur Identifizierung krankheitsverursachender Veränderungen genetischer Erkrankungen. Im Rahmen der Exomsequenzierung werden die (protein-)kodierenden Bereiche aller etwa 19.000 Gene des humanen Genoms sequenziert und einer Analyse zugänglich gemacht. Die generierten Sequenzdaten beschränken sich dabei auf die Exons der Gene sowie angrenzende intronische Bereiche. Tief intronische Veränderungen ebenso wie Varianten, die sich in intergenen Bereichen befinden, werden dagegen durch Exomsequenzierungsansätze nicht erfasst (Punetha und Hoffman 2013). Dadurch können Veränderungen, die sich zum Beispiel in regulatorischen Bereichen für bestimmte Gene befinden, nur zu einem geringen Anteil detektiert werden. Darüber hinaus stellt die Exomsequenzierung, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, eine Methodik dar, die auf der Hochdurchsatz-Sequenzierung kurzer DNA-Fragmente, sogenannter *short reads* von 50 bis 400 bp Länge, basiert. Während sich diese Methodik durch eine hohe Genauigkeit und geringe Fehlerquote bei der Detektion einzelner Nukleotide auszeichnet, ist sie nur bedingt geeignet, um strukturelle genomische Veränderungen zu erfassen. Dies gilt insbesondere für balancierte Veränderungen, die nicht mit einer veränderten Kopienzahl einzelner Gene oder Teilen von Genen einhergehen. Molekular-zytogenetische Untersuchungsmethoden, die zur Detektion dieser strukturellen genomischen Veränderungen geeignet sind, wie zum Beispiel Array-CGH, wurden im Rahmen der genetischen Aufarbeitung dieser Patienten bislang nicht durchgeführt und stellen somit einen möglichen nächsten Schritt zur Aufklärung einer ursächlichen genetischen Komponente für die vorliegende Erkrankung in Familien dar (Shashi et al. 2014; Ferguson 2020).

Auch genetische Untersuchungen mittels Genomsequenzierung stellen eine mögliche weiterführende Untersuchung in diesen Familien dar (Markl et al. 2018; Schwarze et al. 2018). Diese ebenfalls auf einer Hochdurchsatz-Sequenzierung kurzer, 50 bis 400 bp langer DNA-Fragmente basierende Methode liefert Sequenzinformationen über das gesamte Genom und ermöglicht

somit auch die Detektion von Veränderungen außerhalb unmittelbar proteinkodierender Bereiche. Zusätzlich können Genomsequenzierungsdaten aufgrund ihrer uniformen Qualität und einheitlicheren Sequenzierungstiefe im Gegensatz zu Exomsequenzierungsdaten eine wesentlich zuverlässigere Detektion von (insbesondere heterozygoten) Kopiezahlveränderungen (*copy number variations*, CNVs) gewährleisten. Der großen Herausforderung, die die Analyse und Auswertung von Genomsequenzierungsdaten insbesondere aufgrund der Vielzahl an detektierten Varianten und einer häufig unklaren direkten funktionellen Relevanz derzeit noch darstellt, kann im Fall der vorliegenden Familien dadurch begegnet werden, dass möglichst viele Mitglieder der entsprechenden Familien untersucht werden (Biesecker 2012). Dies ermöglicht über das Filtern nach gemeinsamen Varianten in den Betroffenen eine Reduktion der hohen Anzahl an initial detektierten Veränderungen und bietet somit eine Möglichkeit zur Aufklärung einer möglichen genetischen Komponente, die zur Entstehung der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in den vorliegenden Familien geführt hat. Neben der Generierung von *short reads*, welche einige hundert bp lang sein können, gibt es auch andere Ansätze, die auch zukünftig von hoher Relevanz sein könnten. Bei *long reads*-Sequenzierungstechnologien können *reads* bestehend aus bis zu mehreren tausend Kilobasen generiert werden. Dies macht es einfacher, das ganze Genom zu analysieren, da das Zusammenfügen der erstellten Sequenzen erleichtert wird. So können zum Beispiel auch strukturelle Veränderungen, wie etwa Deletionen, Insertionen oder balancierte Translokationen, besser und genauer erkannt und die Bruchpunkte exakter bestimmt werden (Logsdon et al. 2020).

#### 4.4 Ausblick/Perspektive

Für Patienten mit erblichen Erkrankungen haben die diesbezüglichen Untersuchungsmöglichkeiten, so wie sie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen, eine hohe Relevanz. Zum einen können sie Klarheit in Bezug auf mögliche Verdachtsdiagnosen bringen, zum anderen sind – zumindest teilweise – weiterführende Therapien daraus identifizierbar, ableitbar oder zu entwickeln. Auch können für die betroffenen Personen in Bezug auf die Familienplanung individuelle Vererbungsrisiken abgeklärt werden. Eine humangenetische Diagnose benennen zu können, kann demnach einen persönlichen Wert sowie Einfluss auf die medizinische Betreuung haben. Aber nicht nur für die explizit betroffenen Individuen selbst, sondern auch für weitere Forschungsarbeiten und -schwerpunkte sind Erkenntnisse, die aus speziellen humangenetischen Untersuchungen hervorgehen, Basis und Anknüpfungspunkt zugleich.



Insbesondere *next-generation-sequencing*-basierte Untersuchungen ermöglichen es, effizient, vergleichbar kostengünstig und in kurzer Zeit enorme Datenmengen zu generieren, die dann Aufschluss über genetische Erkrankungen geben können. So ist es möglich, ein ganzes Mendelium, Exom oder Genom zu analysieren, nicht nur in Bezug auf die hier beschriebene Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, Syndrome und unspezifische Formen von Kraniosynostosen. *Next-generation-sequencing*-basierte Methoden kamen auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Tragen und es gelang so, für einen Teil des betrachteten Patientenkollektivs Kandidatengene für klinisch auffällige Krankheitsbilder einzelner Individuen und Familien ausfindig zu machen. Dies kann für diese Patienten, aber auch für weitere Forschungsschritte oder bei der Klärung ähnlicher Auffälligkeiten als relevant eingeschätzt werden. Es wird deutlich, dass das Finden und Bewerten von Genen, die im Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen stehen können, durch *next-generation-sequencing*-basierte Methoden erleichtert und vorangebracht werden können. Vergleicht man *next-generation sequencing* mit der Sanger-Sequenzierung ist der Datensatz bei der neueren Methode um ein Vielfaches größer und die Chance, Krankheiten aufzuklären, somit wahrscheinlicher. Auch das Kosten-Nutzen-Verhältnis erscheint durch die Weiterentwicklung besser zu sein.

Deutlich wurde im Laufe der vorliegenden Untersuchungen aber auch, dass jede Technik ihre Vor- und Nachteile sowie Grenzen hat. So war es nicht möglich, alle im Rahmen der Arbeit betrachteten Krankheitsbilder mit den angewandten humangenetischen Untersuchungsmethoden und Sequenzierungen aufzuklären. Dementsprechend hat auch das *next-generation sequencing* limitierende Aspekte. So werden etwa *short reads* generiert, die strukturelle chromosomale Veränderungen, große Deletionen und Duplikationen unter Umständen gar nicht sichtbar machen. Hier haben dann andere Techniken ihren Vorteil und sollten, insbesondere dann, wenn das *next-generation sequencing* innerhalb einer Forschungsarbeit zu keinen signifikanten Ergebnissen führt, in Betracht gezogen werden. Auch hier bietet die vorliegende Arbeit Anknüpfungspunkte für weitere Untersuchungen. Ein weiteres Problem, welches bei der Generierung von großen Datenmengen mitschwingt, ist, dass diese Daten erst einmal analysiert und bewertet werden müssen. Ursächliche Varianten müssen von benignen Varianten unterschieden werden. Es muss differenziert werden zwischen Polymorphismen und tatsächlich pathogenen Mutationen bzw. Varianten.

Allerdings hat sich das *next-generation sequencing* aufgrund der Kosten- und Zeiteffektivität, der Genauigkeit und des hohen Durchsatzes in der klinischen Praxis trotz limitierender Faktoren immer mehr etabliert, vor allem in Bezug auf hereditäre Erkrankungen. So waren lange Zeit

Sequenzierungsuntersuchungsmethoden durch zu hohe Kosten begrenzt. *Next-generation sequencing* als Sequenzierung der jetzigen und nächsten Generation bietet demnach die Möglichkeit, die Medizin immer mehr zu personalisieren und für mehr Patienten zugänglich zu machen, denn Krankheiten können genauer klassifiziert werden. Pharmakogenetische Marker können leichter detektiert werden und den Patienten somit auch gezieltere Therapien zukommen. Auch für Labore, das Gesundheitswesen im Allgemeinen und Forscher verschiedener Gebiete werden Sequenzierungsmethoden zunehmend zugänglicher. *Next-generation sequencing* könnte somit in Zukunft immer mehr als Routinediagnostik zum Einsatz kommen. *Longread sequencing* wäre diesbezüglich dann auch zur Detektion von strukturellen Veränderungen denkbar. Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft die Sequenzierung einzelner Genome von zunehmender Bedeutung sein wird. Diese Annahme wird auch im aktuellen wissenschaftlichen Diskurs und in der Literatur vertreten (Shendure und Ji 2008; Gonzalez-Garay 2014; Goodwin et al. 2016; Gupta und Verma 2019; Hartman et al. 2019). Auch auf bundesweiter Ebene und im politischen Diskurs wird die Relevanz von genetischen Untersuchungen deutlich. So ist die genomDE Initiative hervorzuheben, die auf die Verbesserung der Versorgung von Patientinnen und Patienten mit genetischen Erkrankungen zielt. Die Vernetzung von gewonnenen Daten sowie individuell angepasste Behandlungskonzepte sollen mithilfe dieser Initiative ermöglicht werden. Ziel ist es, Forschung und Gesundheitsversorgung aufeinander abzustimmen und so zu optimieren. In diesem Zusammenhang ist Deutschland im Jahre 2020 einem europaweiten Genomprojekt beigetreten (Bundesministerium für Gesundheit 2021).

Die Ergebnisse der hier beschriebenen Untersuchungen sowie die generierten Daten und gefundenen Kandidatengene stellen eine gute Basis sowie Anknüpfungsmöglichkeit für weitere Forschungsarbeiten dar, denn sie könnten im Sinne eines internationalen *Data Sharing* genutzt werden (Sobreira et al. 2015). Sie wären dann nicht nur relevant für das betrachtete Patientenkollektiv, sondern könnten die Suche nach weiteren Patienten mit ähnlicher Symptomatik und den Abgleich sowie die Bewertung der gefundenen Varianten erheblich erleichtern.

## 5 Zusammenfassung

Die moderne Humangenetik leistet einen großen Beitrag dazu, Krankheiten besser zu verstehen und hilft dabei, deren Ursachen herauszufinden. Sie macht es möglich, Therapieschritte und -verfahren (weiter) zu entwickeln. Indem verschiedene humangenetische Verfahren zur Anwendung kommen, können menschliche Gene untersucht und so herausgefunden werden, ob und inwiefern sie eine Rolle bei klinisch gestellten Diagnosen spielen. Hierzu soll auch die vorliegende Arbeit einen konkreten Beitrag leisten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Diagnosen betrachtet. Die genutzten Materialien sowie die angewandten Methoden wurden hierzu genauer dargestellt und erläutert.

Zu den für die Untersuchungen vorliegenden Krankheiten zählten sowohl syndromale Diagnosen aber auch Krankheitsbilder, die nicht mit einem klinisch diagnostizierten Syndrom einhergehen. Ziel war es zum einen, die molekulare Diagnose zu stellen und den untersuchten Patienten die Ursache für ihre Erkrankung besser erläutern zu können, zum anderen ging es auch darum, anhand von exemplarischen Untersuchungen neue humangenetisch gestützte Erkenntnisse zu den vorliegenden Erkrankungen zu liefern, die – im weiteren Verlauf und in Bezug zum aktuellen Forschungsstand – Basis für weitere humangenetische Arbeiten liefern können.

Oro- und kraniofaziale Fehlbildungen umfassen eine Gruppe an angeborenen Entwicklungsstörungen des Gesichts und/oder Schädels. Diese können unterschiedliche Ausprägungsformen annehmen und zusätzlich sowohl als isolierte Fehlbildungen des Kopfes als auch in Kombination mit anderen, nicht-fazialen Dysmorphien als Bestandteil eines übergeordneten Syndroms auftreten. Die Ursachen oro- und kraniofazialer Fehlbildungen können sowohl genetischer als auch nicht-erblicher Natur sein, hervorgerufen zum Beispiel durch Kontakt des Ungeborenen mit unterschiedlichen Noxen während der Schwangerschaft. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Identifizierung ursächlicher genetischer Faktoren für oro- und kraniofaziale Fehlbildungen mittels unterschiedlicher molekulargenetischer Analysemethoden sowie die bioinformatische und funktionelle Charakterisierung dieser Veränderungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Patientenkollektiv mit syndromalen und nicht-syndromalen Kraniosynostosen genetisch charakterisiert. Dazu wurden sowohl klassische molekulargenetische Untersuchungsmethoden als auch neue, *next-generation-sequencing*-basierte Analysen durchgeführt. Von den insgesamt 32 untersuchten Patienten konnten mit Hilfe dieser Strategie in 18 Patienten die ursächlichen genetischen Veränderungen identifiziert werden. Die

Aufklärungsquote war dabei abhängig von initialen Verdachtsdiagnose und schwankte zwischen 100% (11/11 Patienten mit Verdacht auf Apert-Syndrom) und 0% (0/7 Patienten mit isolierter Kraniosynostose). Im Zuge dieser Analysen konnte zusätzlich bei einem Patienten mit Verdacht auf Saethre-Chotzen-Syndrom eine genetische Veränderung im *TWIST1*-Gen identifiziert werden, die bislang in der wissenschaftlichen Literatur noch nicht beschrieben wurde. Durch bioinformatische und molekulargenetische Analysen konnte die Ursächlichkeit dieser Veränderung für die Erkrankung des Patienten nachgewiesen werden.

Bei einem weiteren Patienten mit der Verdachtsdiagnose der Kraniosynostose und einer mutmaßlichen ursächlichen Variante im *MEGF8*-Gen konnte die genetische Ursache nicht bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden fünf Familien mit nicht-syndromalen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten mittels Exomanalysen zur Ermittlung der zugrundeliegenden, genetischen Ursache der Erkrankung untersucht. Die genetischen Daten betroffener sowie klinisch unauffälliger Familienmitglieder wurden verglichen und detektierte Varianten in Bezug auf ihre funktionellen Effekte sowie ihre Pathogenität und ihres Vorkommens in der gesunden Allgemeinbevölkerung bioinformatisch analysiert und klassifiziert. Ausgewählte Varianten in Kandidatengenen wurde nachfolgend molekulargenetisch hinsichtlich ihrer Ko-Segregation in den jeweiligen Familien untersucht. Mit Hilfe dieser Analysestrategie konnten in zwei Familien Varianten in Kandidatengenen ermittelt werden, die als möglicherweise pathogen und ursächlich eingestuft wurden. So konnte mittels Exomanalyse in einer Familie mit isolierter Lippen-Kiefer-Gaumenspalte die missense-Variante p.Arg77Cys (c.229C>T) in *PAX7* identifiziert und durch nachfolgende molekulargenetische, bioinformatische sowie funktionelle Untersuchungen mittels Luciferase-basierten Reporterassays als möglicherweise pathogen charakterisiert werden. Ursächliche Veränderungen im *PAX7*-Gen wurden bislang erst bei einem Einzelpatienten mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Identifizierung einer vorbeschriebenen Variante in *PAX7* in zusätzlichen Patienten ermöglicht somit die Etablierung des *PAX7*-Gens als kausales Gen für nicht-syndromale Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. In einer weiteren Familie konnte durch die Verwendung von Exomsequenzierungen eine Variante, c.551C>T; p.Ser184Phe, in *NEDD4L* identifiziert werden. Pathogene Veränderungen in *NEDD4L* sind bislang in der wissenschaftlichen Literatur im Zusammenhang neuronalen Entwicklungsstörungen mit periventrikulärer nodulärer Heterotopie beschrieben worden.

Die Identifizierung einer möglicherweise ursächlichen Variante in Patienten mit isolierten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten kann somit erste Hinweise auf das Vorliegen von genetischer Variabilität für Veränderungen in diesem Gen liefern.

Zusammenfassend erweitern die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse unser Verständnis über die genetischen Ursachen und die zugrundeliegenden Pathomechanismen für unterschiedliche Formen der Kraniosynostose sowie für isolierte und nicht-syndromale Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Die Identifizierung einer bislang unbekannt, pathogenen Veränderung in *TWIST1* sowie der zwei neuen Kandidatengene *PAX7* und *NEDD4L* kann zukünftig die molekulargenetische Diagnostik von Erkrankungen dieses Spektrums beeinflussen und den Betroffenen und ihren Familien eine schnelle Klärung möglicher genetischer Ursachen liefern.

Die vorliegende Arbeit bietet Anknüpfungspunkte für weitere Untersuchungen, die auch in Zukunft bei der Klärung von unterschiedlichen humangenetischen Fragestellungen, bei der Ursachenforschung für verschiedene medizinische Diagnosen sowie bei der weiterführenden Therapieentwicklung und -bereitstellung helfen sollen. Dieses Ziel betrifft – so wie in dieser Arbeit – konkrete Patientenkollektive, Familien oder auch Einzelpersonen, die mit Hilfe von Untersuchungen wie der vorliegenden beim Leben mit einer (genetisch assoziierten) Erkrankung unterstützt werden sollen. Grundlegend ist das genannte Ziel aber auch auf prinzipielle medizinische Fragestellungen zu beziehen, um diese mit Hilfe der Humangenetik aufdecken, verstehen und lösen zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

- Agochukwu NB, Solomon BD, Muenke M (2012): Impact of genetics on the diagnosis and clinical management of syndromic craniosynostoses. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg* 28, 1447–1463
- Akingbola OA, Singh D, Srivastav SK, Walsh JW, Jansen DA, Frieberg EM (2011): Intensive care unit course of infants and children after cranial vault reconstruction for craniosynostosis. *BMC Res Notes* 4, 347
- Alderman BW, Zamudio S, Barón AE, Joshua SC, Fernbach SK, Greene C, Mangione EJ (1995): Increased risk of craniosynostosis with higher antenatal maternal altitude. *Int J Epidemiol* 24, 420–426
- Al-Namnam NM, Hariri F, Thong MK, Rahman ZA (2019): Crouzon syndrome: Genetic and intervention review. *J Oral Biol Craniofacial Res* 9, 37–39
- Arnemann J: Panel-Sequenzierung. In: Gressner AM, Arndt T (Hrsg.): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (Springer Reference Medizin). Springer, Berlin, Heidelberg 2019, 1814–1814
- Basch ML, Bronner-Fraser M, García-Castro MI (2006): Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* 441, 218–222
- Beaty T, Taub M, Scott A, Murray J, Marazita M, Schwender H, Parker M, Hetmanski J, Balakrishnan P, Mansilla M, et al. (2013): Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study. *Hum Genet* 132, 771–781
- Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, McIntosh I (2002): Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol* 22, 1–11
- Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, Wu T, Murray T, Fallin MD, et al. (2010): A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet* 42, 525–529
- Beenken A, Mohammadi M (2009): The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8, 235–253
- Belov AA, Mohammadi M (2013): Molecular Mechanisms of Fibroblast Growth Factor Signaling in Physiology and Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, 1–24
- Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, et al. (2009): Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nat Genet* 41, 359–364
- Bertola DR, Rodrigues MG, Quaio CRDC, Kim CA, Passos-Bueno MR (2013): Vertical transmission of a frontonasal phenotype caused by a novel ALX4 mutation. *Am J Med Genet A* 161A, 600–604
- Bhattacharya S, Khanna V, Kohli R (2009): Cleft lip: The historical perspective. *Indian J Plast Surg Off Publ Assoc Plast Surg India* 42, 4–8

- Biesecker LG (2012): Opportunities and challenges for the integration of massively parallel genomic sequencing into clinical practice: lessons from the ClinSeq project. *Genet Med* 14, 393–398
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, Baluardo C, Ferrian M, Almeida de Assis N, Alblas MA, et al. (2009): Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet* 41, 473–477
- Bowling EL, Burstein FD (2006): Crouzon syndrome. *Optom - J Am Optom Assoc* 77, 217–222
- Broix L, Jagline H, L Ivanova E, Schmucker S, Drouot N, Clayton-Smith J, Pagnamenta AT, Metcalfe KA, Isidor B, Louvier UW, et al. (2016): Mutations in the HECT domain of NEDD4L lead to AKT–mTOR pathway deregulation and cause periventricular nodular heterotopia. *Nat Genet* 48, 1349–1358
- Brooklyn S, Jana R, Aravinthan S, Adhisivam B, Chand P (2014): Assessment of folic Acid and DNA damage in cleft lip and cleft palate. *Clin Pract* 4, 608
- Buchanan EP, Xue Y, Xue AS, Olshinka A, Lam S. <https://www.dovepress.com/multidisciplinary-care-of-craniosynostosis-peer-reviewed-fulltext-article-JMDH>; abgerufen am 21.07.2019
- Bundesministerium für Gesundheit. <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/gesundheitswesen/personalisierte-medizin/genomde-de.html>; abgerufen am 04.09.2021
- Bush PG, Williams AJ (1983): Incidence of the Robin Anomalad (Pierre Robin syndrome). *Br J Plast Surg* 36, 434–437
- Callaway E (2013): Deal done over HeLa cell line. *Nat News* 500, 132
- Carla L, Maria PA (2017): Unravelling molecular pathways shared by Kabuki and Kabuki-like syndromes. *Clin Genet* 283–295
- Carmichael SL, Ma C, Rasmussen SA, Honein MA, Lammer EJ, Shaw GM, National Birth Defects Prevention Study (2008): Craniosynostosis and maternal smoking. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol* 82, 78–85
- Cavalheiro MG, Lamônica DAC, de Vasconsellos Hage SR, Maximino LP (2019): Child development skills and language in toddlers with cleft lip and palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 116, 18–21
- Christensen K, Mitchell LE (1996): Familial recurrence-pattern analysis of nonsyndromic isolated cleft palate—a Danish Registry study. *Am J Hum Genet* 58, 182–190
- Cohen DM, Green JG, Miller J, Gorlin RJ, Reed JA (1987): Acrocephalopolysyndactyly type II-Carpenter syndrome: clinical spectrum and an attempt at unification with Goodman and Summit syndromes. *Am J Med Genet* 28, 311–324
- Cohen MM (1995): Craniosynostoses: Phenotypic/molecular correlations. *Am J Med Genet* 56, 334–339

- Cohen MM, Kreiborg S, Lammer EJ, Cordero JF, Mastroiacovo P, Erickson JD, Roeper P, Martínez-Frías ML (1992): Birth prevalence study of the Apert syndrome. *Am J Med Genet* 42, 655–659
- Dahl E, Koseki H, Balling R (1997): Pax genes and organogenesis. *BioEssays* 19, 755–765
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC (2011): Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12, 167–178
- Drafahl KA, McAndrew CW, Donoghue DJ: Chapter 237 - Signaling from Fibroblast Growth Factor Receptors in Development and Disease. In: Bradshaw RA, Dennis EA (Hrsg.): *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*. Academic Press, San Diego 2010, 1939–1947
- Eggermann T, Söllner L, Kurth I, Eggermann K, Begemann M (2018): Next Generation Sequencing (NGS) von DNA: Mehr Informationen durch mehr Daten? *BU Prakt - Online-J Für Den Biol* 1, 6–6
- Ehrenfeld M, Schwenger N, Bacher M, Schramm T: Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten. In: Schwenger N, Ehrenfeld M (Hrsg.): *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Lehrbuchreihe zur Aus-und Weiterbildung / hrsg. von Norbert Schwenger ...; Bd. [2])*. 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011, 186–226
- El Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Munnich A, Bonaventure J (1997): Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chatzen syndrome. *Nat Genet* 15, 42–46
- El Ghouzzi V, Lajeunie E, Le Merrer M, Cormier-Daire V, Renier D, Munnich A, Bonaventure J (1999): Mutations within or upstream of the basic helix–loop–helix domain of the TWIST gene are specific to Saethre-Chatzen syndrome. *Eur J Hum Genet* 7, 27–33
- Elanko N, Sibbring JS, Metcalfe KA, Clayton-Smith J, Donnai D, Temple IK, Wall SA, Wilkie AO (2001): A survey of TWIST for mutations in craniosynostosis reveals a variable length polyglycine tract in asymptomatic individuals. *Hum Mutat* 18, 535–541
- Engelhard C, Sarsfield S, Merte J, Wang Q, Li P, Beppu H, Kolodkin AL, Sucov HM, Ginty DD (2013): MEGF8 is a modifier of BMP signaling in trigeminal sensory neurons. *eLife* 2, 1–16
- Feragen KB, Stock NM, Sharratt ND, Kvaalem IL (2016): Self-perceptions of romantic appeal in adolescents with a cleft lip and/or palate. *Body Image* 18, 143–152
- Ferguson E. <https://inspirestudentjournal.co.uk/wp-content/uploads/2020/10/Inspire-Student-Journal-Emily-Ferguson.pdf>; abgerufen am 30.05.2021
- Fisher E, Achilles S, Tönnies H, Schmidtke J (2015): Konzepte zur Mitteilung genetischer Zusatzbefunde in der medizinischen Diagnostik und Forschung. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 58, 166–173
- FitzPatrick DR, Raine PA, Boorman JG (1994): Facial clefts in the west of Scotland in the period 1980-1984: epidemiology and genetic diagnoses. *J Med Genet* 31, 126–129



- Foo R, Guo Y, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Whitaker LA, Bartlett SP (2009): The natural history of patients treated for TWIST1-confirmed Saethre-Chotzen syndrome. *Plast Reconstr Surg* 124, 2085–2095
- French LR, Jackson IT, Melton LJ (1990): A population-based study of craniosynostosis. *J Clin Epidemiol* 43, 69–73
- Gallagher ER, Ratisoontorn C, Cunningham ML: Saethre-Chotzen Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, Amemiya A (Hrsg.): *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA) 1993
- Gao S, Alarcón C, Sapkota G, Rahman S, Chen P-Y, Goerner N, Macias MJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Massagué J (2009): Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF  $\beta$  signaling. *Mol Cell* 36, 457–468
- Glaser RL, Jiang W, Boyadjiev SA, Tran AK, Zachary AA, Van Maldergem L, Johnson D, Walsh S, Oldridge M, Wall SA, et al. (2000): Paternal origin of FGFR2 mutations in sporadic cases of Crouzon syndrome and Pfeiffer syndrome. *Am J Hum Genet* 66, 768–777
- Glaser RL, Broman KW, Schulman RL, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Jabs EW (2003): The Paternal-Age Effect in Apert Syndrome Is Due, in Part, to the Increased Frequency of Mutations in Sperm. *Am J Hum Genet* 73, 939–947
- Gonzalez-Garay ML (2014): The road from next-generation sequencing to personalized medicine. *Pers Med* 11, 523–544
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016): Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17, 333–351
- Gripp KW, Zackai EH, Stolle CA (2000): Mutations in the human TWIST gene. *Hum Mutat* 15, 150–155
- Grollemund B, Galliani E, Soupre V, Vazquez MP, Guedeney A, Danion A (2010): [The impact of cleft lip and palate on the parent-child relationships]. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr* 17, 1380–1385
- Gupta N, Verma VK (2019): Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. *Microb Technol Welf Soc* 17, 313–341
- Hartman P, Beckman K, Silverstein K, Yohe S, Schomaker M, Henzler C, Onsongo G, Lam HC, Munro S, Daniel J, et al. (2019): Next generation sequencing for clinical diagnostics: Five year experience of an academic laboratory. *Mol Genet Metab Rep* 19
- Harvey KF, Dinudom A, Cook DI, Kumar S (2001): The Nedd4-like protein KIAA0439 is a potential regulator of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 276, 8597–8601
- Haye D, Collet C, Sembely-Taveau C, Haddad G, Denis C, Soulé N, Suc AL, Listrat A, Toutain A (2014): Prenatal findings in carpenter syndrome and a novel mutation in RAB23. *Am J Med Genet A* 164, 2926–2930

- Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD, Jabs EW (1997): Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15, 36–41
- Hsia HE, Kumar R, Luca R, Takeda M, Courchet J, Nakashima J, Wu S, Goebbels S, An W, Eickholt BJ, et al. (2014): Ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 acts as a downstream target of PI3K/PTEN-mTORC1 signaling to promote neurite growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 13205–13210
- Illumina, Inc. <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>; abgerufen am 11.02.2019
- Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen. [https://www.humangenetik-umg.de/wp-content/uploads/2019/10/hg-umg-untersuchungsauftrag\\_kraniosynostosen.pdf](https://www.humangenetik-umg.de/wp-content/uploads/2019/10/hg-umg-untersuchungsauftrag_kraniosynostosen.pdf); abgerufen am 07.02.2021
- Jabs EW, Li X, Scott AF, Meyers G, Chen W, Eccles M, Mao J, Charnas LR, Jackson CE, Jaye M (1994): Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat Genet* 8, 275–279
- Jakobsen LP, Ullmann R, Christensen SB, Jensen KE, Mølsted K, Henriksen KF, Hansen C, Knudsen MA, Larsen LA, Tommerup N, Tümer Z (2007): Pierre Robin sequence may be caused by dysregulation of SOX9 and KCNJ2. *J Med Genet* 44, 381–386
- Jenkins D, Seelow D, Jehee FS, Perlyn CA, Alonso LG, Bueno DF, Donnai D, Josifova D, Josifiova D, Mathijssen IMJ, et al. (2007): RAB23 mutations in Carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. *Am J Hum Genet* 80, 1162–1170
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, et al. (2003): Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 40, 399–407
- Jiyan L, Zeqiang G, Yongjuan C, Kaihong D, Bing D, Rongsheng L (2010): Analysis of interactions between genetic variants of BMP4 and environmental factors with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate susceptibility. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39, 50–56
- Jones KL, Smith DW, Harvey MA, Hall BD, Quan L (1975): Older paternal age and fresh gene mutation: data on additional disorders. *J Pediatr* 86, 84–88
- Jones MC (1988): Etiology of facial clefts: prospective evaluation of 428 patients. *Cleft Palate J* 25, 16–20
- Källén B, Robert-Gnansia E (2005): Maternal drug use, fertility problems, and infant craniofacial anomalies. *Cleft Palate-Craniofacial J Off Publ Am Cleft Palate-Craniofacial Assoc* 42, 589–593
- Kapp-Simon KA (2004): Psychological issues in cleft lip and palate. *Clin Plast Surg* 31, 347–352
- Kaur H, Singh Waraich H, Sharma CM (2006): Crouzon syndrome: A case report and review of literature. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 58, 381–382

- Kayserili H, Uz E, Niessen C, Vargel I, Alanay Y, Tuncbilek G, Yigit G, Uyguner O, Candan S, Okur H, et al. (2009): ALX4 dysfunction disrupts craniofacial and epidermal development. *Hum Mol Genet* 18, 4357–4366
- Keupp K, Li Y, Vargel I, Hoischen A, Richardson R, Neveling K, Alanay Y, Uz E, Elcioğlu N, Rachwalski M, et al. (2013): Mutations in the interleukin receptor IL11RA cause autosomal recessive Crouzon-like craniosynostosis. *Mol Genet Genomic Med* 1, 223–237
- Kilcoyne S, Luscombe C, Scully P, Jayamohan J, Magdum S, Wall S, Johnson D, Wilkie AOM (2019): Language Development, Hearing Loss, and Intracranial Hypertension in Children With TWIST1-Confirmed Saethre-Chotzen Syndrome. *J Craniofac Surg* 30, 1506–1511
- Kimonis V, Gold JA, Hoffman TL, Panchal J, Boyadjiev SA (2007): Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol* 14, 150–161
- Ko JM (2016): Genetic Syndromes Associated with Craniosynostosis. *J Korean Neurosurg Soc* 59, 187–191
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RLLF, Daack-Hirsch S, Sander A, et al. (2002): Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 32, 285–289
- König E-M. [https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/17518/file/Koenig\\_EvaMaria\\_Dissertation.pdf](https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/17518/file/Koenig_EvaMaria_Dissertation.pdf); abgerufen am 30.05.2021
- Kreiborg S, Barr M, Cohen MM (1992): Cervical spine in the Apert syndrome. *Am J Med Genet* 43, 704–708
- Kumar D, Shadrach JL, Wagers AJ, Lassar AB (2009): Id3 Is a Direct Transcriptional Target of Pax7 in Quiescent Satellite Cells. *Mol Biol Cell* 20, 3170–3177
- Kumar GR, Jyothisna M, Ahmed SB, Lakshmi KS (2013): Crouzon’s Syndrome: A Case Report. *Int J Clin Pediatr Dent* 6, 33–37
- Lajeunie E, Cameron R, El Ghouzzi V, de Parseval N, Journeau P, Gonzales M, Delezoide AL, Bonaventure J, Le Merrer M, Renier D (1999): Clinical variability in patients with Apert’s syndrome. *J Neurosurg* 90, 443–447
- Lajeunie E, Crimmins DW, Arnaud E, Renier D (2005): Genetic considerations in nonsyndromic midline craniosynostoses: a study of twins and their families. *J Neurosurg* 103, 353–356
- Lajeunie E, Heuertz S, Ghouzzi VE, Martinovic J, Renier D, Merrer ML, Bonaventure J (2006): Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent FGFR2 mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome. *Eur J Hum Genet* 14, 289
- Leslie EJ, Taub MA, Liu H, Steinberg KM, Koboldt DC, Zhang Q, Carlson JC, Hetmanski JB, Wang H, Larson DE, et al. (2015): Identification of functional variants for cleft lip with or without cleft palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by targeted sequencing of GWAS loci. *Am J Hum Genet* 96, 397–411

- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, et al. (1998): Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 63, 557–568
- Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE (2020): Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet* 21, 597–614
- Malekkou A, Sevastou I, Mavrikiou G, Georgiou T, Vilageliu L, Moraitou M, Michelakakis H, Prokopiou C, Drousiotou A (2020): A novel mutation deep within intron 7 of the GBA gene causes Gaucher disease. *Mol Genet Genomic Med* 8
- Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S, Reutter H, de Assis NA, Chawa TA, Mattheisen M, et al. (2010): Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet* 42, 24–26
- Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P (1996): Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7<sup>-/-</sup> mutant mice. *Development* 122, 831–838
- Mantilla-Capacho JM, Arnaud L, Díaz-Rodríguez M, Barros-Núñez P (2005): Apert syndrome with preaxial polydactyly showing the typical mutation Ser252Trp in the FGFR2 gene. *Genet Couns Geneva Switz* 16, 403–406
- Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, Liu Y (2002): Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in China: Assessment of Candidate Regions. *Cleft Palate Craniofac J* 39, 149–156
- Markl J, Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Hacker SD (2018): Genome. *Purves Biol* 513–541
- Martin LA, Assif N, Gilbert M, Wijewarnasuriya D, Seandel M (2014): Enhanced Fitness of Adult Spermatogonial Stem Cells Bearing a Paternal Age-Associated FGFR2 Mutation. *Stem Cell Rep* 3, 219–226
- Massimi L, Caldarelli M, Tamburrini G, Paternoster G, Di Rocco C (2012): Isolated sagittal craniosynostosis: definition, classification, and surgical indications. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg* 28, 1311–1317
- Mee L, Honkala H, Kopra O, Vesa J, Finnilä S, Visapää I, Sang TK, Jackson GR, Salonen R, Kestilä M, Peltonen L (2005): Hydrolethalus syndrome is caused by a missense mutation in a novel gene HYLS1. *Hum Mol Genet* 14, 1475–1488
- Messing-Jünger AM, Martini M: Ätiologie und Genetik der KraniosynostosenKraniosynostoseGenetikKraniosynostoseÄtiologie. In: Bächli H, Lütschg J, Messing-Jünger M (Hrsg.): Pädiatrische Neurochirurgie. Springer, Berlin, Heidelberg 2018, 305–310
- Metodiev Y, Gavrilova N, Katzarov A (2011): Anesthetic management of a child with Apert syndrome. *Saudi J Anaesth* 5, 87–89
- Meyers GA, Orlow SJ, Munro IR, Przylepa KA, Jabs EW (1995): Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat Genet* 11, 462–464

- Meyers GA, Day D, Goldberg R, Daentl DL, Przylepa KA, Abrams LJ, Graham JM, Feingold M, Moeschler JB, Rawnsley E, et al. (1996): FGFR2 exon IIIa and IIIc mutations in Crouzon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing. *Am J Hum Genet* 58, 491–498
- Michael Cohen Jr. MM: Apert, Crouzon, and Pfeiffer Syndromes. In: Muenke M, Kress W, Collmann H, Solomon BD (Hrsg.): *Monographs in Human Genetics*. Band 19; KARGER, Basel 2011, 67–88
- Miskiewicz P, Morrissey D, Lan Y, Raj L, Kessler S, Fujioka M, Goto T, Weir M (1996): Both the paired domain and homeodomain are required for in vivo function of Drosophila Paired. *Dev Camb Engl* 122, 2709–2718
- Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, et al. (2013): MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 161A, 2234–2243
- Monsoro-Burq AH (2015): PAX transcription factors in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 44, 87–96
- Moore KL, Persaud TVN, Viebahn C: *Embryologie: Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik*. 5. Auflage, [Nachdr.]; Elsevier, Urban & Fischer, München 2007
- Moosa S, Wollnik B (2016): Altered FGF signalling in congenital craniofacial and skeletal disorders. *Semin Cell Dev Biol* 53, 115–125
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC (2009): Cleft lip and palate. *Lancet Lond Engl* 374, 1773–1785
- Neveling K, Hoischen A (2012): Exom-Sequenzierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen. *Med Genet* 24, 4–11
- Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin M, Gildersleeve H, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, et al. (2010): Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 42, 790–793
- Nieminen P, Morgan NV, Fenwick AL, Parmanen S, Veistinen L, Mikkola ML, van der Spek PJ, Giraud A, Judd L, Arte S, et al. (2011): Inactivation of IL11 signaling causes craniosynostosis, delayed tooth eruption, and supernumerary teeth. *Am J Hum Genet* 89, 67–81
- Oldridge M, Wilkie AOM, Slaney SF, Poole MD, Pulleyn LJ, Rutland P, Hockley AD, Wake MJC, Goldin JH, Winter RM, et al. (1995): Mutations in the third immunoglobulin domain of the fibroblast growth factor receptor-2 gene in Crouzon syndrome. *Hum Mol Genet* 4, 1077–1082
- Ornitz DM, Itoh N (2015a): *The Fibroblast Growth Factor signaling pathway*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 4, 215–266
- Osoegawa K, Vessere GM, Utami KH, Mansilla MA, Johnson MK, Riley BM, L'Heureux J, Pfundt R, Staaf J, van der Vliet WA, et al. (2008): Identification of novel candidate

- genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation. *J Med Genet* 45, 81–86
- Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, Korf BR, Lipson MH, Grix AW, Feingold M, Goldberg R, Borochowitz Z, Aleck K, et al. (1998): Genetic Heterogeneity of Saethre-Chotzen Syndrome, Due to TWIST and FGFR Mutations. *Am J Hum Genet* 62, 1370–1380
- Pilarski R (2021): How Have Multigene Panels Changed the Clinical Practice of Genetic Counseling and Testing. *J Natl Compr Canc Netw* 19, 103–108
- Poggiani C, Zambelloni C, Auriemma A, Colombo A (2007): Acrocephalosyndactyly, Apert type, in a newborn: Cerebral sonography. *J Ultrasound* 10, 139–142
- Pollock P, Gartside M, Dejeza L, Powell M, Mallon M, Davies H, Mohammadi M, Futreal P, Stratton M, Trent J, Goodfellow P (2007): Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* 26, 7158–7162
- Punetha J, Hoffman EP (2013): Short Read (Next-gen) Sequencing: A Tutorial with Cardiomyopathy Diagnostics as an Exemplar. *Circ Cardiovasc Genet* 6, 427–434
- Rachwalski M, Wollnik B, Kress W (2013): Klinik und Genetik syndromaler und nichtsyndromaler Kraniosynostosen. *Med Genet* 25, 373–387
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, et al. (2008): Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet* 40, 1341–1347
- Rasmussen SA, Yazdy MM, Carmichael SL, Jamieson DJ, Canfield MA, Honein MA (2007): Maternal thyroid disease as a risk factor for craniosynostosis. *Obstet Gynecol* 110, 369–377
- Ratan ZA, Zaman SB, Mehta V, Haidere MF, Runa NJ, Akter N (2017): Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus* 9, 1–13
- Reardon W, Winter RM, Rutland P, Pulleyn LJ, Jones BM, Malcolm S (1994): Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet* 8, 98–103
- Reefhuis J, Honein MA, Shaw GM, Romitti PA (2003): Fertility treatments and craniosynostosis: California, Georgia, and Iowa, 1993-1997. *Pediatrics* 111, 1163–1166
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M (2005): A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948–953
- Riley BM, Murray JC (2007): Sequence Evaluation of FGF and FGFR Gene Conserved Non-Coding Elements in Non-Syndromic Cleft Lip and Palate Cases. *Am J Med Genet A* 143A, 3228–3234

- Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, Russo ET, Vieira AR, Dodé C, Mohammadi M, et al. (2007): Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4512–4517
- Rizo J, Südhof TC (1998): C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca<sup>2+</sup>-binding Domain. *J Biol Chem* 273, 15879–15882
- Robin NH, Falk MJ, Haldeman-Englert CR: FGFR-Related Craniosynostosis Syndromes. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, Amemiya A (Hrsg.): GeneReviews®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA) 1993
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC (1999): Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 59, 39–50
- Sadler TW, Langman J, Drews U: Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 11. Auflage; Thieme, Stuttgart 2008
- Saethre H (1931): Ein Beitrag zum Turmschädelproblem, (Pathogenese, Erblichkeit und Symptomatologie). *Dtsch Z Für Nervenheilkd* 117–119, 533–555
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467
- Schwarze K, Buchanan J, Taylor JC, Wordsworth S (2018): Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. *Genet Med* 20, 1122–1130
- Schwenzer N, Arold R (1998): Lippen-Kiefer-Gaumenspalten - *Dtsch Arztebl* 1998; 95(37). A-2262-2267
- Sesenna E, Magri AS, Magnani C, Brevi BC, Anghinoni ML (2012): Mandibular distraction in neonates: indications, technique, results. *Ital J Pediatr* 38:7, 1–8
- Sharma VP, Fenwick AL, Brockop MS, McGowan SJ, Goos JAC, Hoogeboom AJM, Brady AF, Jeelani N u O, Lynch SA, Mulliken JB, et al. (2013): Mutations of TCF12, encoding a basic-helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nat Genet* 45, 304–307
- Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, Schoch K, Vellore K, McDonald M, Jiang Y-H, Xie P, Need A, Goldstein DB (2014): The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med* 16, 176–182
- Shendure J, Ji H (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 1135–1145
- Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L, Lozada A, Morris RW, Lovett M, Murray JC (2007): Orofacial Cleft Risk Is Increased with Maternal Smoking and Specific Detoxification-Gene Variants. *Am J Hum Genet* 80, 76–90

- Shishido E, Higashijima S, Emori Y, Saigo K (1993): Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* 117, 751–761
- Shotelersuk V, Mahatumarat C, Ittiwut C, Rojvachiranonda N, Srivuthana S, Wacharasindhu S, Tongkobetch S (2003): FGFR2 mutations among Thai children with Crouzon and Apert syndromes. *J Craniofac Surg* 14, 101–104; discussion 105–107
- Sigma-Aldrich. [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_85120602?lang=de&region=DE&gclid=CjwKCAjw57b3BRBIEiwA1ImytgoXpn1ue3GF4BRr6jqay\\_HzOGOrsrsRR-HIJ7ofGxBQRWtHL-8VBoCymUQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_85120602?lang=de&region=DE&gclid=CjwKCAjw57b3BRBIEiwA1ImytgoXpn1ue3GF4BRr6jqay_HzOGOrsrsRR-HIJ7ofGxBQRWtHL-8VBoCymUQAvD_BwE); abgerufen am 20.06.2020a
- Sigma-Aldrich. [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_93021013?lang=de&region=DE&gclid=CjwKCAjw57b3BRBIEiwA1ImythuxHr455mpwRZyTmV0ze9bZDs42yP683xe9-Yn5sV3kORnVjJ9k0BoCRa-QQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_93021013?lang=de&region=DE&gclid=CjwKCAjw57b3BRBIEiwA1ImythuxHr455mpwRZyTmV0ze9bZDs42yP683xe9-Yn5sV3kORnVjJ9k0BoCRa-QQAvD_BwE); abgerufen am 20.06.2020b
- Slaney SF, Oldridge M, Hurst JA, Moriss-Kay GM, Hall CM, Poole MD, Wilkie AO (1996): Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 58, 923–932
- Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A (2015): GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat* 36, 928–930
- Suazo J, Santos JL, Scapoli L, Jara L, Blanco R (2010): Association between TGFB3 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chilean population. *Cleft Palate-Craniofacial J Off Publ Am Cleft Palate-Craniofacial Assoc* 47, 513–517
- Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Miwa N, Hing A, Jugessur A, Natsume N, Shimozato K, Ohbayashi N, Suzuki Y, et al. (2009): Mutations in BMP4 are associated with subepithelial, microform, and overt cleft lip. *Am J Hum Genet* 84, 406–411
- Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper ME, Viet LT, Nguyen TDT, Hai H, Natsume N, et al. (2004): In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 6, 117–125
- Tan TY, Kilpatrick N, Farlie PG (2013): Developmental and genetic perspectives on Pierre Robin sequence. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 163, 295–305
- Teven CM, Farina EM, Rivas J, Reid RR (2014): Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes Dis* 1, 199–213
- Thompson JM, Stone PR, Sanders M, van der Zee H, Borman B, Fowler PV (2016): The incidence of Orofacial Cleft in live births in New Zealand. *N Z Med J* 129, 64–71
- Twigg SRF, Lloyd D, Jenkins D, Elçioğlu NE, Cooper CDO, Al-Sannaa N, Annagür A, Gillissen-Kaesbach G, Hüning I, Knight SJL, et al. (2012): Mutations in Multidomain Protein MEGF8 Identify a Carpenter Syndrome Subtype Associated with Defective Lateralization. *Am J Hum Genet* 91, 897–905



- Uz E, Alanay Y, Aktas D, Vargel I, Gucer S, Tuncbilek G, von Eggeling F, Yilmaz E, Deren O, Posorski N, et al. (2010): Disruption of ALX1 Causes Extreme Microphthalmia and Severe Facial Clefting: Expanding the Spectrum of Autosomal-Recessive ALX-Related Frontonasal Dysplasia. *Am J Hum Genet* 86, 789–796
- Van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK (2000): MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet* 24, 342–343
- Van Laarhoven PM, Neitzel LR, Quintana AM, Geiger EA, Zackai EH, Clouthier DE, Artinger KB, Ming JE, Shaikh TH (2015): Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development. *Hum Mol Genet* 24, 4443–4453
- Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M (2017): Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet* 136, 1093–1111
- Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, van Gosliga D, Kayserili H, Xu C, Ozono K, et al. (2005): Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet* 37, 468–470
- Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC (2003): MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res* 82, 289–292
- Vlad Ciurea A, Toader C (2009): Genetics of craniosynostosis: review of the literature. *J Med Life* 2, 5–17
- Von Gernet S, Golla A, Ehrenfels Y, Schuffenhauer S, Fairley JD (2000): Genotype-phenotype analysis in Apert syndrome suggests opposite effects of the two recurrent mutations on syndactyly and outcome of craniofacial surgery. *Clin Genet* 57, 137–139
- Welzenbach J, Hammond NL, Nikolić M, Thieme F, Ishorst N, Leslie EJ, Weinberg SM, Beaty TH, Marazita ML, Mangold E, et al. (2021): Integrative approaches generate insights into the architecture of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet Genomics Adv* 2, 100038
- Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, David DJ, Pulleyn LJ, Rutland P (1995): Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet* 9, 165–172
- Xu HE, Rould MA, Xu W, Epstein JA, Maas RL, Pabo CO (1999): Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev* 13, 1263–1275
- Yang Y, Yuan J, Yao X, Zhang R, Yang H, Zhao R, Guo J, Jin K, Mei H, Luo Y, et al. (2017): BMPR1B mutation causes Pierre Robin sequence. *Oncotarget* 8, 25864–25871
- Yu JSL, Ramasamy TS, Murphy N, Holt MK, Czapiewski R, Wei SK, Cui W (2015): PI3K/mTORC2 regulates TGF- $\beta$ /Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. *Nat Commun* 6, 1–12

- Zhang Z, Alpert D, Francis R, Chatterjee B, Yu Q, Tansey T, Sabol SL, Cui C, Bai Y, Koriabine M, et al. (2009): Massively parallel sequencing identifies the gene *Megf8* with ENU-induced mutation causing heterotaxy. *Proc Natl Acad Sci* 106, 3219–3224
- Zöller JE: Kraniofaziale Fehlbildungen. In: Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg.): *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Lehrbuchreihe zur Aus-und Weiterbildung / hrsg. von Norbert Schwenzer ...; Bd. [2])*. 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011, 263–277
- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, et al. (2004): Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med* 351, 769–780

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich beim Anfertigen der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Danken möchte ich an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Bernd Wollnik (Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen) für die langjährige Betreuung vor, während und auch nach Anfertigung der Arbeit, das Vertrauen, die großartige Unterstützung, die fachliche Begleitung, die hilfreichen Ratschläge und konstruktive Kritik. Danke, dass ich ein Teil des Teams und ein Teil der Forschung am Institut für Humangenetik sein durfte und dass mir dieses Projekt anvertraut wurde.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. Henning Schliephake (Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen) für die Betreuung und Begleitung, die Update-Gespräche sowie die Begutachtung meiner Arbeit.

Den Kooperationspartnern des Instituts für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen danke ich für die Organisation und Bereitstellung von Patientenmaterial. Diesbezüglich möchte ich mich insbesondere bei Dr. Martin Rachwalski (Department of Maxillofacial and Plastic Surgery, National Reference Center for Cleft Lip and Palate, Hopital Universitaire Necker-Enfants Malades, Paris, Frankreich) sowie Dr. Dr. Jürgen Lichtensteiner (MKG-Chirurgie, Uniklinik Kiel) und Dr. Abhilash Pasare Ravindranath (Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Oxford Dental College, Bangalore, Indien) bedanken. Auch ein Dank an alle Patientinnen und Patienten, die auf unterschiedlichen Wegen Teil dieser Arbeit waren. Es ist nicht selbstverständlich, auf diese Art und Weise an wissenschaftlicher Forschung teilzunehmen. Danke für die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank richtet sich an Dr. Gökhan Yiğit. Danke für deine jahrelange Unterstützung, deine konstruktive Kritik und die zahlreichen Rückmeldungen zu meiner Arbeit, deine Geduld und dafür, dass ich mich bei Hürden und Schwierigkeiten immer an dich wenden konnte. Darüber hinaus möchte ich mich bedanken bei meinen Kolleginnen und Kollegen sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen für die freundliche Aufnahme ins Team, die vielen offenen Ohren, die tatkräftige Unterstützung, die Beantwortung verschiedener Fragen und das umfassende Feedback. Auch an der täglichen „Werkbank-Arbeit“ hatte ich viel Spaß mit den Kolleginnen und Kollegen. Ich möchte mich hier explizit für die vielen praktischen Tipps und Tricks sowie die Unterstützung im Labor bedanken.