

# Masterarbeit

Identifikation von kausalen familiären DNA-Varianten bei konsanguinen Familien mit nicht-syndromaler, autosomal rezessiv vererbter intellektueller Beeinträchtigung (NSARID)

eingereicht von  
Laura Schmidt, BSc.

zur Erlangung des akademischen Grades  
Master of Science (MSc) an der  
Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im Rahmen des  
Universitätslehrgangs Master of Science Medizinische Genetik  
(Am Institut für Humangenetik)

unter der Anleitung von Betreuer  
Assoz. Prof. Dr. Christian Windpassinger

Graz, Datum 19.08.2022

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 19.08.2022

Laura Schmidt eh

## Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Assoz. Prof. Dr. Christian Windpassinger für die Betreuung meiner Masterarbeit bedanken. Ebenso für die Unterstützung von Jasmin Blatterer bei der Auswertung und Johann Semmler-Bruckner und Anita Harb für die Unterstützung bei der Sequenzierung an ihrem Neurogenetik-Institut.

Mit großem Dank will ich auch meine Eltern, Freunde und meinen Freund erwähnen, die mir bei diesem Master zur Seite gestanden haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>X</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Intellektuelle Beeinträchtigung</i> .....	1
1.2. <i>Der Einfluss konsanguiner Familien auf genetische Erkrankungen</i> .....	4
1.3. <i>Autosomal rezessive Vererbung</i> .....	7
1.4. <i>Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen</i> .....	9
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1. <i>Rekrutierung der Patienten</i> .....	11
2.1.1.    MR23 1-3 .....	11
2.2. <i>Methoden</i> .....	13
2.2.1.    Whole Exom Sequenzierung (WES) .....	13
2.2.2.    Homozygotie-Mapping .....	13
2.2.3.    Varianten Screening.....	14
2.2.4.    Sanger-Sequenzierung .....	15
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>20</b>
3.1. <i>MR23</i> .....	20
3.1.1    Suche nach Kandidatengen .....	20
3.1.2    Sanger-Sequenzierung .....	25
3.1.3    Segregationsanalyse.....	27
3.2. <i>WDR62 Gen</i> .....	29
3.2.1 <i>WDR62 c.390G&gt;A</i> .....	31
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>36</b>
<b>5. Literatur</b> .....	<b>43</b>

## Abkürzungen

A	Adenin
AAIDD	American Association on Intellectual and Developmental Disabilities
AD	Autosomal dominant
APA	Amerikanische Psychiatrische Assoziation
AR	Autosomal rezessiv
AS	Aminosäure
ASPM	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein
BAM	Binäre Ausrichtungskarte
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CNV	copy number variations (Kopienzahlvarianten)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition
F	Inzuchtskoeffizient
G	Guanosin
HPO Term	Human Phenotype Ontology
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
ID	Intellektuelle Beeinträchtigung (Intellectual Disability)
IQ	Intelligenzquotient
LOF	Loss of Function
LOH	Loss of Heterozygosity
MB	Mega Basen
MCPH	Autosomal rezessive primäre Mikrozephalie
MCPH-2	Autosomal rezessive primäre Mikrozephalie-2
MRT	Magnetresonanztomografie
NGS	Next generation Sequencing

NSARID	Nicht-syndromale autosomal rezessive intellektuelle Beeinträchtigung
NSID	Nicht-syndromale intellektuelle Beeinträchtigung
nt	Nukleotid
OFC	okzipito-frontalen Kopfumfanges (occipito-frontal circumference)
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PCR	Polymerasenketten Reaktion
SD	Standardabweichung
SID	Syndromale intellektuelle Beeinträchtigung
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TrisHCl	Tris(hydroxymethyl)methylamin Hydrochlorid
VCF	Variant Call Format
WDR62	WD-Repeat domain 62
WES	Whole exome sequencing
WGS	Whole genome sequencing

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.: Die globale Prävalenz von Konsanguinität.** Quelle: (Consang.net)..... 6
- Abbildung 2.: Autosomal rezessiver Erbgang.** Vater und Mutter sind Mutationsträger, sie tragen die Variante auf einem Allel, somit sind sie heterozygot. Die Variante wird in Rot gezeigt. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% geben die Eltern entweder das gesunde Allel oder das betroffene Allel weiter, daraus ergeben sich folgende Wahrscheinlichkeiten: 75% für ein gesundes Kind, wobei davon 50% Mutationsträger sind, und 25% für ein betroffenes Kind. Quelle: (Kübelbeck, 2008) ..... 8
- Abbildung 3. Stammbaum der Familie MR23.** Die betroffenen Personen sind schwarz gekennzeichnet, nicht betroffene sind weiß gekennzeichnet. Familienmitgliedern von denen DNA-Proben entnommen worden sind, sind mit MR23 und einer Nummerierung gekennzeichnet. Die betroffenen Kinder stammen aus einer konsanguinen Ehe, es handelt sich dabei um drei weibliche Geschwister. Die Familie hat drei betroffene und vier nicht betroffene Kinder. Auf der Großmutter-Seite sind ebenfalls betroffene Individuen bekannt, von denen aber keine Proben zur Verfügung standen Quelle: Eigene Darstellung in CeGaT – Pedigree Chart Designer (<http://pedigree.cegat.de/>) ..... 12
- Abbildung 4.: Vergleich der VCF-Datei aller drei Schwestern im WDR62 Gen an der Position c.390.** Im oberen Teil der Abbildung wird das WDR62 Gen in Wildtyp-Form als Referenz gezeigt, in diesem Fall der hintere Bereich des Exon 4 des WDR62 Gens. Darunter wird die Basenabfolge dieses Bereiches gezeigt, markiert ist die Position c.390, an der sich die Base G befindet. Darunter befindet sich der Vergleich aller drei Schwestern MR23 1-3, markiert wurde die Stelle c.390. An dieser Position befindet sich bei allen drei die Base A. Dieser Vergleich wurde mit den VCF-Dateien im GoldenHelix Programm dargestellt. Quelle: eigene Darstellung in GoldenHelix ..... 22
- Abbildung 5.: Homozygotie Region der betroffenen Schwestern MR23 1-3 in Chromosom 19.** Die gemeinsame LOH-Region befindet sich zwischen folgenden Positionen Chr19: 35,945,035-38,162,353. Quelle: eigene Darstellung in GoldenHelix.... 24
- Abbildung 6.: Ergebnis der Sanger-Sequenzierung aller Familienmitglieder MR23 1-7.** Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Sequenz nach erfolgter Sequenzierung unter Verwendung des forward Primers (WDR62-E4f). In Rot gekennzeichnet wird die Position c.390, an der die Veränderung im WDR62 stattgefunden hat. MR23 1-3 zeigen an dieser Stelle die Basen A. MR23 4-7 zeigen an dieser Stelle ein R, dies steht für das heterozygote Vorkommen zweier Basen. R steht für das Vorkommen der Base G und Base A an der Position c.390. Quelle: Eigene Darstellung mittels SnapGene ..... 27

<b>Abbildung 7.: Segregationsanalyse der Familie MR23 der Variante c.390G&gt;A im Exon 4 im WDR62 Gen.</b> Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung wurden mit einem Plus und einem Minus Zeichen dargestellt. Bei den betroffenen Geschwistern MR23 1-3 (schwarz markiert) liegt die Variante homozygot vor, gezeigt mit +/+. Die nicht-betroffenen Geschwister MR23 4-5, sowie die Eltern MR23 6-7 (gezeigt in Weiß) sind heterozygot für die Variante, gezeigt mit -/+ und somit Träger der Variante. Quelle: Eigene Darstellung in CeGaT – Pedigree Chart Designer ( <a href="http://pedigree.cegat.de/">http://pedigree.cegat.de/</a> ) .....	28
<b>Abbildung 8. USCS Genom Browser Abschnitt vom WDR62 Gen an der Position c.390G&gt;A.</b> Der Abschnitt zeigt das Genom zwischen den Positionen Chr19:36,066,010 – 16,066,020. Quelle: UCSC Genome Browser ( <a href="https://genome.ucsc.edu/">https://genome.ucsc.edu/</a> ).....	32
<b>Abbildung 9.: VarSeak Online Splice Site Prediction der Variante c.390G&gt;A im Exon 4 im WDR62 Gen.</b> Quelle: VarSeak online ( <a href="https://varseak.bio/">https://varseak.bio/</a> ) .....	33
<b>Abbildung 10.: VarSeak Online Splice Site Prediction der Variante c.390G&gt;A im Exon 4 im WDR62 Gen.</b> Quelle: VarSeak online ( <a href="https://varseak.bio/">https://varseak.bio/</a> ) .....	34

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.: Klassifizierung des Schweregrades anhand von DCM-IV und DCM-5..	3
Tabelle 2. Primerliste für die Sanger-Sequenzierung: .....	16
Tabelle 3.: Nanodrop-Messung aller MR23 Familienmitglieder .....	16
Tabelle 4.: PCR-Programm für die Amplifikation .....	17
Tabelle 5.: PCR-Programm .....	18
Tabelle 6.: Variantenliste aus den gemeinsamen Homozygotie Regionen der drei betroffenen Schwestern .....	23

## Zusammenfassung

Entwicklungsstörungen des Zentralnervensystems im Gehirn können durch fehlerhafte Reifungsprozesse entstehen. Man spricht dabei nicht von Erkrankungen, sondern von neuro-kognitiven Auffälligkeiten.

Thema dieser Arbeit ist die genetische Charakterisierung einer pakistanischen Familie mit vorliegender Konsanguinität. In der Familie MR23 sind drei Schwestern vom selben klinischen Erscheinungsbild betroffen.

Mit Hilfe von Next-Generation Sequenzierungs-Technologien und Literaturrecherchen soll die krankheitsverursachende Variante in einem Gen identifiziert werden. Bei der Familie wird eine seltene erbliche Erkrankung mit autosomal rezessivem Erbgang vermutet.

Aufgrund einer vorliegenden Konsanguinität steigt die Wahrscheinlichkeit, das betroffene Allel in einer Homozygotie-Region vorzufinden. Mit Hilfe der Eingrenzung gemeinsamer Homozygotie-Regionen der drei Geschwister war es möglich, die Suche auf das Chromosom 19 einzugrenzen. Mit einer anschließenden Sanger-Sequenzierung wurde die Variante c.390G>A im *WDR62* in Exon 4 bestätigt.

Die kausale Variante verursacht eine autosomal rezessive, primäre Mikrozephalie-2 (MCPH-2) (MIM 613583) und steht mit einer intellektuellen Beeinträchtigung in Verbindung, wobei der Schweregrad variieren kann.

Die kausale Variante wurde anschließend mittels Segregationsanalyse innerhalb der Familie evaluiert und bestätigte den zuvor vermuteten autosomalen rezessiven Erbgang. Die drei betroffenen Schwestern erhielten jeweils maternal und paternal das betroffene Allel und prägten somit eine MCPH-2 aus. Sowohl die Eltern als auch die anderen Geschwister sind heterozygot auf diese Variante, weisen den Phänotyp somit nicht auf. Sie sind jedoch Träger dieser Variante und können diese mit einer 50%igen Wahrscheinlichkeit an ihre Nachkommen weitervererben.

Die Ergebnisse zusammen mit der Literaturrecherche bestätigen den kausalen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und der gefundenen Variante.

Erstmals wurde die Variante c.390G>A 2016 von Bastaki *et al.* beschrieben.

In dieser Publikation wird ein Fall mit zwei betroffenen Geschwistern dargestellt, die ebenfalls aus einer konsanguinen Partnerschaft stammen. Die Geschwister weisen ebenfalls eine Mikrozephalie auf sowie eine Entwicklungsstörung und Pachygyrie.

NGS-Technologien ermöglichen es, immer mehr krankheitsverursachende Gene zu identifizieren, dennoch bleiben viele Gene und Varianten, die zu seltenen Mendelschen Erkrankungen führen, noch unentdeckt.

Diese Arbeit zeigt die Relevanz von Untersuchungen der betroffenen Familien, vor allem in Regionen mit hoher Konsanguinität, sowohl um das Spektrum an Genen und die unterschiedliche Phänotyp-Ausprägung zu erweitern als auch um Diagnostik und Therapie voranzubringen.

## Abstract

Developmental disorders in the brain are caused by faulty maturation processes, which can lead to neural abnormalities.

The subject of this thesis is the genetic characterization of a Pakistan Family with consanguinity, with three family members affected by neural abnormalities. A rare hereditary disease with an autosomal recessive inheritance is suspected and with the help of next generation sequencing (NGS) Technologies and literature research, the pathogenic variant could be identified.

Consanguinity leads to an increase of the homozygosity region and the likelihood of finding the causal variant in this region. By limiting common homozygosity regions of the three affected sisters, it was possible to narrow down the search to chromosome 19. Sanger sequencing was then used to identify the variant c.390G>A in exon 4 in the *WDR62* gene. This causal variant results in an autosomal recessive, primary microcephalie-2 (MCPH-2) (MIM 61358). MCPH-2 is associated with intellectual impairment which varies in severity among patients.

The causal variant was further evaluated via segregation analysis within the family and confirmed the previously assumed autosomal recessive inheritance. The three affected sisters inherited the affected allele from both parents and developed MCPH-2 with intellectual impairment. The parents as well as their unaffected siblings are heterozygous for this variant and therefore do not express the same phenotype. They are all carrier of this variant which will be inherited by their offspring with a probability of 50%.

These results combined with the carried-out literature research confirm the causal relationship between the observed phenotype and the found variant. The variant c.390G>A was first described by Bastaki *et al.* 2016. This paper describes two cases of MCPH-2 within a consanguine family. The siblings developed microcephaly with pachygyria.

NGS technologies make it possible to identify more disease-causing genes, but many remain unknown. This work shows the importance of using these technologies to examine affected families in regions with high consanguinity to

broaden the spectrum of genes and phenotype characteristics to advance their diagnosis and therapy.

# 1. Einleitung

## 1.1. Intellektuelle Beeinträchtigung

Intellektuelle Beeinträchtigung (intellectual disability, ID), früher bekannt unter dem Namen „mentale Retardierung“, ist eine Erkrankung, die zu kognitiven Defiziten von unterschiedlicher Ausprägung führt.

Bereits in der frühen Kindheit zeigen sich Funktionseinschränkungen der intellektuellen und adaptiven Fähigkeiten mit Schwierigkeiten in der Schul- und Berufslaufbahn sowie der sozio-emotionalen Entwicklung. Während perinatal meist Geburtskomplikationen mit Hypoxie als Ursache für eine intellektuelle Beeinträchtigung gelten, werden pränatal neurologische, genetische und metabolische Störungen diskutiert.

Die erste und bekannteste Erkrankung, die mit einer Intelligenzminderung einhergeht, ist das Down-Syndrom und gilt seither als häufigste genetische Ursache von intellektueller Beeinträchtigung (Musante and Ropers, 2014; Vissers, Gilissen and Veltman, 2016).

Der klinische Phänotyp des Down-Syndroms wurde 1866 erstmals vom britischen Arzt Langdon Down beschrieben (Murken *et al.*, 2017, S. 204 - 207).

Seit 1991 wird auch das fragile X-Syndrom mit einer Intelligenzminderung und Verhaltensauffälligkeiten in Verbindung gebracht. Dadurch legte sich der Fokus der Forschung hin zur x-chromosomalen Vererbung.

Erst später wurde die Aufmerksamkeit auf die autosomal rezessive (AR) Vererbung der Erkrankung gelenkt. Lange Zeit war über diese Form der Vererbung wenig bekannt, da der Phänotyp nur in homozygoter Form in Erscheinung tritt. Heterozygote Träger der Veränderungen weisen zumeist keine Symptome auf.

In den westlichen und europäischen Regionen sind Kleinfamilien typisch, wodurch autosomal rezessiv vererbte Erkrankungen eher sporadisch und nur sehr selten auftreten. Weit häufiger sind in diesen Regionen compound heterozygote Varianten, dabei liegen zwei unterschiedliche Mutationen am gleichen Gen vor

(Boycott *et al.*, 2013; Musante and Ropers, 2014; Vissers, Gilissen and Veltman, 2016).

Intellektuelle Beeinträchtigung kann hinsichtlich der Art der Vererbung eingeteilt werden. Man unterscheidet die x-chromosomale Vererbung von der autosomal rezessiven bzw. dominanten Form.

Intellektuelle Beeinträchtigung wird neben der Vererbung auch in die nicht-syndromale (NSID) und syndromale ID (SID) eingeteilt, wobei eine klare Begrenzung zwischen den beiden Formen nicht immer eindeutig ist.

Syndromale ID wird dadurch definiert, dass Patienten/innen zusätzlich andere klinische Eigenschaften sowie Fehlbildungen aufweisen. Die intellektuelle Beeinträchtigung wird daher häufig mit neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen assoziiert, nach dem ICD-10 (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision) liegt bei 14-39% neben einer ID eine komorbide psychiatrische Diagnose vor, ein frühkindlicher Autismus oder ein Aufmerksamkeitsdefizit-Syndrom. Epilepsie zählt dabei zu den häufigsten assoziierten neurologischen Erkrankungen.

Die nicht-syndromale intellektuelle Beeinträchtigung (NSID) wird definiert durch das alleinige Vorkommen von Intelligenzminderung als klinische Eigenschaft, jedoch ist es schwer, neurologische oder psychiatrische Erkrankungen eindeutig davon abzugrenzen und zu diagnostizieren, da einige Syndrome zu subtilen Symptomen aufweisen (Kaufman, Ayub and Vincent, 2010; Musante and Ropers, 2014).

Neben der Art der Vererbung haben sich zwei Systeme für eine weitere Klassifizierung etabliert. Einerseits die AAIDD („American Association on Intellectual and Development Disabilities“) und das DSM-5 („Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition“) von der Amerikanischen Psychiatrischen Assoziation (APA). In beiden Klassifikationssystemen wird die ID durch signifikante Defizite in kognitiven, funktionalen und adaptiven Fähigkeiten beschrieben.

Die formale Diagnose bezog sich bislang auf einen IQ-Score unter 70, der nach dem standardisierten Intelligenztest erfolgt (siehe Tabelle 1).

Das DSM hat es sich in der 5. Auflage zur Aufgabe gemacht, in die Diagnose weitaus mehr Parameter miteinspielen zu lassen. Neben dem Intelligenztest werden auch klinische Symptome miteinbezogen.

Der Schweregrad ergibt sich aus der benötigten Hilfe im alltäglichen Leben. Der Grad der Hilfe wird von den Defiziten in den adaptiven Fähigkeiten beeinflusst. Somit lässt sich der Schweregrad der ID in fünf Kategorien unterteilen, die in folgender Tabelle aufgelistet sind, sowie deren Prävalenz (American Psychiatric Association, 2013; Boat and Wu, 2015).

*Tabelle 1.: Klassifizierung des Schweregrades anhand von DSM-IV und DSM-5.*

<b>Schweregrad</b>	<b>Prävalenz</b>	<b>DSM-IV</b>	<b>DSM-5</b>
<b>Leichte</b>	85%	IQ 50-69	Personen benötigen etwas Hilfe in alltäglichen Aufgaben
<b>Mittelschwere</b>	10%	IQ 36-49	Personen können sich um persönliche Bedürfnisse kümmern, benötigen aber mehr Zeit, um unabhängig zu werden
<b>Schwere</b>	3.5%	IQ 20-35	Personen sind bei vielen täglichen Aufgaben wie Essen, Anziehen, Baden etc. auf Unterstützung angewiesen
<b>Schwerste</b>	1,5%	IQ <20	Die Unterstützung bei allen alltäglichen Aufgaben ist erforderlich

Quelle: In Anlehnung an (American Psychiatric Association, 2013; Boat and Wu, 2015).

DSM-5 definiert die intellektuelle Beeinträchtigung als eine neurologische Erkrankung, die charakterisiert wird durch eine Beeinträchtigung der allgemeinen geistigen Fähigkeiten, die wiederum Einfluss auf Bereiche der adaptiven Funktion haben. Dazu gehören die konzeptionellen Fähigkeiten (Sprachkenntnisse, Lesen, Schreiben, Rechnen), die soziale Kompetenz (Empathie, soziales Urteilsvermögen, zwischenmenschliche Kommunikation und die Fähigkeit, Freundschaften zu schließen) und schlussendlich den Praxisbereich (Selbstmanagement wie Körperpflege, Beruf, Verantwortung und Organisation in Schul- bzw. Arbeitsaufgaben) (American Psychiatric Association, 2013; Boat and Wu, 2015).

Im diagnostisch statistischen Manual psychischer Störungen, DSM-5 werden drei Kriterien für die Diagnose einer Intellektuellen Beeinträchtigung gefordert.

- 1) Defizite in intellektuellen Funktionen wie Urteilungsvermögen, Problemlösung, Planen, Lernen, Lernen nach Erfahrungen usw.
  - 2) Defizite in adaptiven Funktionen
  - 3) Das Auftreten von Entwicklungsdefiziten bereits im Kindesalter
- (American Psychiatric Association, 2013)

Beide Klassifikationssysteme charakterisieren den Ausbruch der Erkrankung in der Entwicklungsphase vor dem 18. Lebensjahr (American Psychiatric Association, 2013; Boat and Wu, 2015).

Die Prävalenz der einzelnen Formen unterscheidet sich stark: die der schweren Form ist im Grunde stabil, die der milden Form jedoch sehr variabel.

Die milde intellektuelle Beeinträchtigung wird von externen Faktoren wie der mütterlichen Bildung, dem Zugang zur Bildung und dem Gesundheitssystem stark beeinflusst (Kaufman, Ayub and Vincent, 2010).

Die globale Prävalenz von intellektueller Beeinträchtigung liegt bei 1% in der gesamten Bevölkerung.

In ärmeren und unterentwickelten Ländern ist die Prävalenz weitaus höher, vor allem in Ländern mit einem hohen Anteil an Konsanguinität (siehe Abbildung 1) (Kaufman, Ayub and Vincent, 2010; Iqbal and van Bokhoven, 2014). In diesen Regionen ist das Vorkommen der autosomal rezessiven, intellektuellen Beeinträchtigung (ARID) weitaus häufiger und bietet Potenzial für die Forschung hinsichtlich Diagnosen und Präventionen (Iqbal and van Bokhoven, 2014).

## 1.2. Der Einfluss konsanguiner Familien auf genetische Erkrankungen

Konsanguinität wird definiert als Vereinigung zwischen zwei Individuen, die als Cousins/Cousinen zweiten Grades oder näher miteinander verwandt sind.

Entsteht aus dieser Partnerschaft ein Kind, so ist die Wahrscheinlichkeit, krankheitsverursachende Allele eines Genes zu erhalten, damit deutlich erhöht. Daraus ergibt sich für Nachkommen ein Inzuchtskoeffizient (F) von 0,0156 (Bittles, 2001).

Der Inzuchtskoeffizient ergibt sich aus der Wahrscheinlichkeit, dass eine betroffene, homozygote Person beide Allele des Gens von einem Vorfahren der Eltern erhält (Murken *et al.*, 2017, S.255).

20% der Weltbevölkerung bevorzugen konsanguine Ehen, in der westlichen Kultur hingegen werden diese eher abgelehnt. Zu jenen Kulturen, in denen konsanguine Ehen in den familiären Kreisen bevorzugt werden, gehören Regionen wie Nord-Afrika, West-Asien und Süd-Indien und machen 20-50% der Ehen aus (siehe Abbildung 1).

Die Rate an Konsanguinität variiert in den Populationen je nach Religion, Kultur und Geografie. Vor allem soziale Faktoren spielen dabei eine wichtige Rolle. Verwandtenehen haben eine Tradition. Der Konsanguinität wird nachgesagt, die familiäre Bindung zu stärken sowie finanzielle und gesundheitliche Probleme zu reduzieren und familiäre Unterstützung in schweren Zeiten zu gewährleisten. Der Großteil davon sind Ehen zwischen Cousins und Cousinen ersten Grades (Bittles, 2001; Hamamy, 2012; Jabeen and Malik, 2014; Bener and Mohammad, 2017).

Pakistan weist mit 60% die höchste Rate an Ehen unter Verwandten auf (siehe Abbildung 1). Hochzeiten sind dort sehr häufig traditionell arrangiert und nur ein Bruchteil davon selbst-arrangiert. Bei traditionellen Hochzeiten liegt die Entscheidung über den Ehebund bei den Eltern des Pärchens.

Im Iran liegt die Rate hingegen bei 40% und in Indien, je nach Region, bei 16-33% (siehe Abbildung 1). Zurückzuführen sind diese Unterschiede auf Religion, demografische und soziale Faktoren (Kaufman, Ayub and Vincent, 2010; Iqbal and van Bokhoven, 2014).

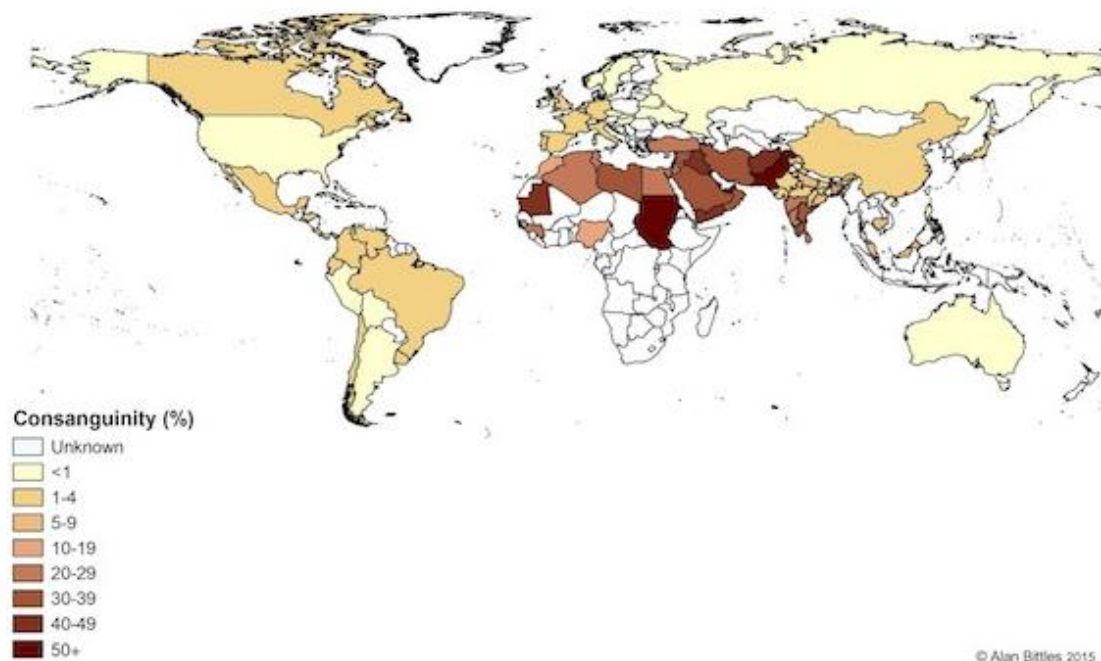


Abbildung 1.: Die globale Prävalenz von Konsanguinität. Quelle: (Consang.net)

Konsanguinität hat für die klinische Genetik eine große Bedeutung, da sie mit einer Häufung von genetischen Defekten einhergeht. Die Expression von autosomal rezessiv (AR) vererbten Erkrankungen steigt erheblich.

Grund für das erhöhte genetische Risiko liegt nicht nur an der Verwandtschaftsehe, sondern an den Großfamilien und der höheren Kinderzahl in diesen Kulturen.

In den westlichen Regionen sind autosomal rezessiv vererbte Erkrankungen wie die ID selten, da sie in kleineren Familien nur sporadisch auftreten. Kleinere Familien erschweren die Unterscheidung zwischen de-novo und vererbten Erkrankungen, wobei ein Großteil der ID-Fälle compound heterozygot ist. Daher sind Populationen mit hoher Konsanguinität für die klinische Genetik in den Fokus gerückt, vor allem im Bereich von Diagnose und Prävention (Musante and Ropers, 2014; Bener and Mohammad, 2017).

Bei konsanguinen Ehen zwischen Cousinen/Cousins ersten Grades liegt das Risiko von Geburtsproblemen 2-3% höher als in der Normalbevölkerung (Hamamy, 2012). Es wird auch ein erhöhtes Risiko für andere schwere Erkrankungen beschrieben, die Abtreibungsrate hingegen ist unverändert.

Zurückzuführen ist dies auf die Tatsache, dass sich Cousinen/Cousins ersten Grades  $1/8$  aller Gene teilen und somit 6,25% der Genloci bei den Nachkommen homozygot sind (Bennett *et al.*, 2002; Hamamy, 2012).

### 1.3. Autosomal rezessive Vererbung

Beim autosomal rezessiven Erbgang handelt es sich um eine Form der Vererbung, bei der für einen krankheitsauslösenden Effekt bzw. phänotypische Auswirkung die Veränderung im homozygoten Zustand vorliegen muss.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Formen der autosomalen Vererbung, die dominante und die rezessive Form. Bei der dominanten Vererbung reicht die krankheitsbedingt Variante auf einem der Allele aus, dies kann maternal oder paternal vererbt werden, und führt so zur phänotypischen Ausprägung.

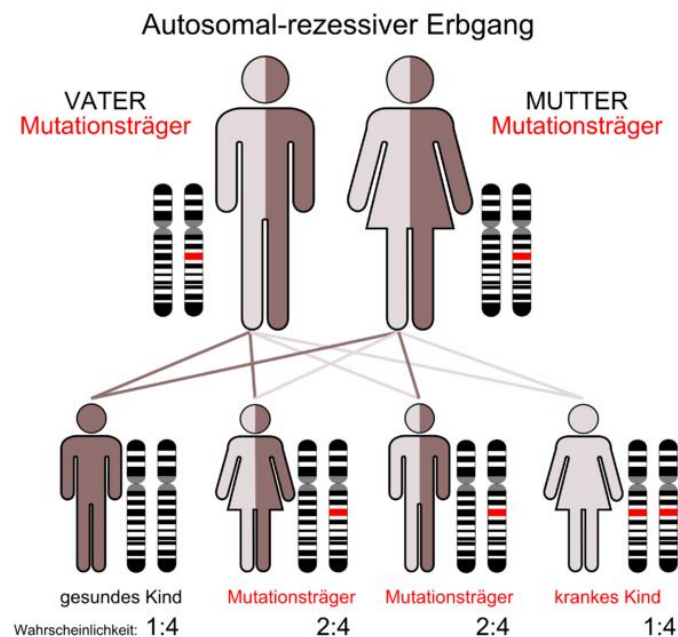
Bei der autosomal rezessiven Form muss die Veränderung an beiden Allelen vorliegen und somit von beiden Elternteilen stammen.

Bei der autosomalen Vererbung sind die Autosome betroffen, dabei handelt es sich um Chromosomen, die nicht an der Geschlechtsbestimmung beteiligt sind. Somit ist die Vererbung geschlechtsunabhängig. In der menschlichen Körperzelle befinden sich 22 Autosomen-Paare.

In der Theorie werden meist zwei gesunde Eltern beschrieben, die ein betroffenes/kranken Kind bekommen. Die Eltern weisen die Variante zwar heterozygot auf, dies führt bei ihnen zu keiner phänotypischen Ausprägung. Das betroffene Kind hat die Veränderung von beiden Eltern vererbt bekommen und ist somit homozygot für diese Variante. Nur im homozygoten Zustand exprimiert sich der Phänotyp.

Das generelle Wiederholungsrisiko für Eltern mit heterozygoten Allelen für eine Variante liegt für ein betroffenes Kind bei 25%. Daraus resultiert eine Wahrscheinlichkeit für ein gesundes Kind von 75%, 50% davon sind heterozygot und somit Träger der Variante (Schaaf and Zschocke, 2013; Murken *et al.*, 2017).

Das Wiederholungsrisiko wird in Abbildung 2 gezeigt, es resultiert sich aus der Wahrscheinlichkeit, dass heterozygote Eltern mit einer 50%igen Wahrscheinlichkeit entweder das krankheitsassoziierte Allel oder das gesunde Allel an ihr Nachkommen weitergeben (Murken *et al.*, 2017). Die krankheitsassoziierte Variante wird hier in Rot gezeigt.



**Abbildung 2.: Autosomal rezessiver Erbgang.** Vater und Mutter sind Mutationsträger, sie tragen die Variante auf einem Allel, somit sind sie heterozygot. Die Variante wird in Rot gezeigt. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% geben die Eltern entweder das gesunde Allel oder das betroffene Allel weiter, daraus ergeben sich folgende Wahrscheinlichkeiten: 75% für ein gesundes Kind, wobei davon 50% Mutationsträger sind, und 25% für ein betroffenes Kind. Quelle: (Kübelbeck, 2008)

Das Erkrankungsrisiko für Nachkommen bei Eltern mit Konsanguinität steigt stark an. Das Risiko ergibt sich daraus, dass, wie bereits beschrieben, Cousins und Cousinen ersten Grades  $1/8$  aller Gene gemeinsam haben.

In der Stammbaumanalyse gibt es typische Merkmale für den autosomal rezessiven Erbgang, diese lauten wie folgt:

- Die Krankheit tritt in nur einer Generation auf und meist sind Kinder nur eines Paares betroffen. Es tritt nicht in Generationen hintereinander auf.

- Geschlechtsunabhängig
- Gehäuftes Auftreten bei Konsanguinität

(Schaaf and Zschocke, 2013)

#### 1.4. Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen

Die Identifizierung krankheitsverursachender Gene kann bei der Diagnose und in weiterer Folge bei der Etablierung und Weiterentwicklung von Therapieansätzen helfen. Bevor NGS (Next Generation Sequencing) etabliert wurde, erfolgte die Identifizierung von Kandidatengenen mittels Sanger-Sequenzierung.

Bei der Sanger-Sequenzierung konnte nicht einfach das gesamte Genom oder alle Exons sequenziert, sondern nur bestimmte Bereiche analysiert werden. Daher erfolgte zuvor eine genetische Kartierung. Mit dieser Kartierung wurde der zu sequenzierende Bereich auf vermutete Gene eingegrenzt, wodurch eine Sequenzierung mit Sanger erst möglich wurde.

Die genetische Kartierung erfolgte anhand zuvor erfasster Informationen von den Kopplungsanalyse, Homozygotie Regionen, Karyotypisierung, CNVs (copy number variation) und SNP-abhängigen Analysen (Gilissen *et al.*, 2012).

Bei der Kopplungsanalyse wird z.B. versucht phänotypische Merkmale mit Genen zu koppeln. Eine Möglichkeit um die Region in der Sequenz einzugrenzen (Arnemann, 2019).

Mit dem Next Generation Sequencing (NGS) war es zuletzt möglich, schnell und günstig das gesamte Genom zu sequenzieren.

Weitaus häufiger wird die Sequenzierung aller Exons durchgeführt.

Die Exons machen zwar nur 1% der gesamten DNA aus, enthalten aber über 85% der krankheitsverursachenden Varianten. Seit der erfolgreichen Etablierung von NGS Technologien hat sich die Zahl der gefundenen Gene exponentiell erhöht (Bamshad, Nickerson and Chong, 2019; Vinkšiel *et al.*, 2021).

Die neue Technologie des NGS brachte den Ansatz zur Identifizierung in eine andere Richtung. Es wird nun nach Varianten gesucht, die selten in der Population auftreten, in einer proteincodierenden Region des Genoms zu finden sind und die

Funktion des Proteins somit beeinträchtigen (Gilissen *et al.*, 2012; Boycott *et al.*, 2013).

In der Publikation von Gilissen *et al.* werden sechs verschiedene Strategien beschrieben, die bei der Suche nach krankheitsverursachenden Genen verwendet werden können. Die Strategien werden je nach Form der Vererbung, Anzahl der betroffenen Individuen usw. verwendet.

Für die aktuelle Fragestellung wird in dieser Arbeit die auf Homozygotie basierende Strategie eingesetzt, da es sich um eine seltene, rezessiv vererbte Erkrankung mit vermuteter Konsanguinität im Stammbaum handelt. Erwartet wird in so einem Fall eine homozygote Variante, die von beiden Eltern an die betroffenen Nachkommen vererbt wurde und sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer großen Homozygotie-Region befindet. Dies kommt daher, dass die Anzahl an homozygoten Varianten den Grad der Konsanguinität widerspiegelt.

Nachkommen von Verwandtschaftssehen ersten Grades besitzen im Schnitt 15-20 homozygote seltene Varianten, wohingegen bei Cousins/Cousinen dritten Grades nur mehr 5-10 zu finden sind.

Je stärker sich eine Generation von den Ahnen betroffener Individuen entfernt, desto seltener ist die Rekombination mit anderen und desto länger sind die Homozygotie-Bereiche.

Somit finden Untersuchungen in Homozygotie-Regionen vor allem Einsatz bei der Identifizierung von Varianten bei vermuteter Blutsverwandtschaft.

Die Analyse dieser Homozygotie-Regionen kann mit Hilfe WES-Daten (Whole exome Sequencing) oder SNP (Single Nucleotid Polymorphism) Mikroarrays ermittelt werden.

Mit bioinformatischen Strategien ist es möglich, aus Varianten von tausenden mindestens Hunderten zu filtern, bis zuletzt die gesuchte krankheitsverursachende Variante gefunden werden kann. Dazu werden unterschiedliche Filterstrategien herangezogen (Majewski *et al.*, 2011; Gilissen *et al.*, 2012; Boycott *et al.*, 2013).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Rekrutierung der Patienten

Die Arbeit befasst sich mit einer Familie aus Pakistan, die von Dr. Muzammil Ahmad Khan von der Gomal University rekrutiert wurden. Die Zustimmung der Familie, sowie der Ethikantrag für die weiteren Untersuchungen wurde von ihm eingeholt. Die Ethikkommission von der Gomal Universität in Pakistan (Ethical review Board, Gomal University) hat das Votum bewilligt (04/ERB/GU).

Die Familie wurde aufgrund von einer vorliegenden konsanguinen Partnerschaft und dem Auftreten von phänotypischen Auffälligkeiten ausgewählt.

Nach vorheriger Aufklärung der Familie konnten anschließend klinischen Daten und Informationen der familiären Strukturen im Zuge eines Stammbaums gesammelt werden. Diese Informationen wurden anschließend anonymisiert und mit einer Fall-Bezeichnung versehen, die anhand der ersten Diagnose beschrieben wurde. Die Fall-Bezeichnung dieser Familie mit Verdacht auf eine nicht-syndromale intellektuelle Beeinträchtigung wurde mit MR23 betitelt.

Anschließend wurden die Daten der Medizinische Universität Graz zur weiteren genetischen Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Von den betroffenen und nicht betroffenen Familienmitgliedern wurden auch Blutproben entnommen. Aus dem Blut wurde die DNA nach Standard-Verfahren isoliert und an die Humangenetik der Medizinischen Universität Graz geschickt.

#### 2.1.1. MR23 1-3

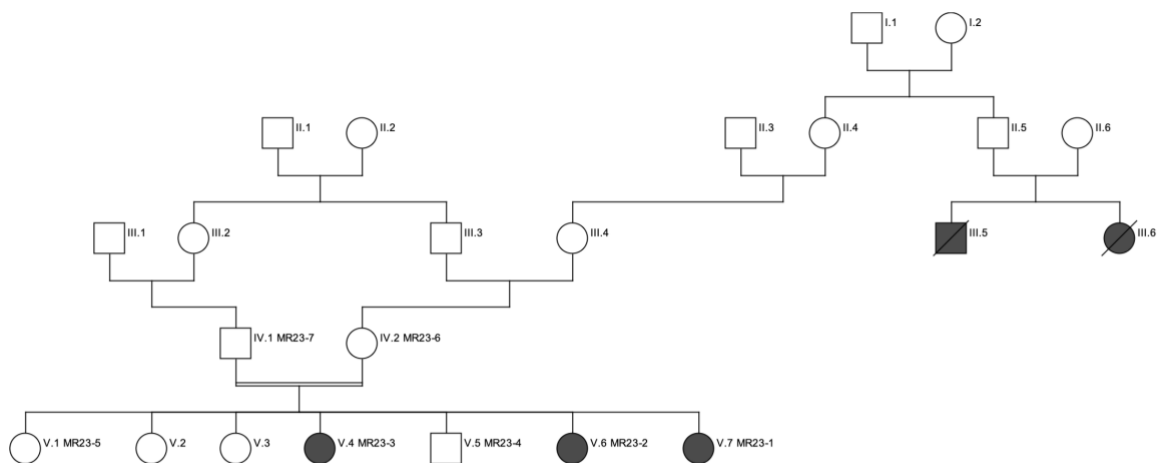
Die Familie, die in dieser Arbeit untersucht wurde, hat 5 bekannte betroffene Individuen, wobei nur DNA-Proben von einer Seite der Familie zur Verfügung standen. Die betroffenen Familienmitglieder der großmütterlichen Seite sind bereits verstorben und konnten somit nicht in die Analyse der Erkrankung miteinfließen.

Jene Familienmitglieder von denen DNA-Proben entnommen wurden, sind in diesem Stammbaum mit MR23 und einer fortlaufenden Nummerierung gekennzeichnet.

Bei den betroffenen Individuen handelt es sich um drei Schwestern, der fünften Generation, die mit einer intellektuellen Beeinträchtigung vorab diagnostiziert wurden.

Diese drei Geschwister sind im Stammbaum schwarz gekennzeichnet und bekamen die Fall-Bezeichnung MR23-1, MR23-2 und MR23-3 (siehe Abbildung 3).

Die betroffenen Kinder stammen aus einer konsanguinen Ehe aus Cousins/Cousins ersten Grades. Die Eltern MR23-6 und MR23-7 und die anderen Geschwister MR23-4 und MR23-5 der fünften Generation waren jedoch von der Intelligenzminderung nicht betroffen (weiße Kennzeichnung).



**Abbildung 3. Stammbaum der Familie MR23.** Die betroffenen Personen sind schwarz gekennzeichnet, nicht betroffene sind weiß gekennzeichnet. Familienmitgliedern von denen DNA-Proben entnommen worden sind, sind mit MR23 und einer Nummerierung gekennzeichnet. Die betroffenen Kinder stammen aus einer konsanguinen Ehe, es handelt sich dabei um drei weibliche Geschwister. Die Familie hat drei betroffene und vier nicht betroffene Kinder. Auf der Großmutter-Seite sind ebenfalls betroffene Individuen bekannt, von denen aber keine Proben zur Verfügung standen Quelle: Eigene Darstellung in CeGaT – Pedigree Chart Designer (<http://pedigree.cegat.de/>)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Whole Exom Sequenzierung (WES)

Nach Erhalt der DNA-Proben wurden diese anhand ihrer Qualität überprüft und die vielversprechendsten Proben wurden für das WES (Whole exome sequencing) ausgewählt. Bei der beschriebenen Familie MR23 konnten alle drei betroffenen Geschwister (MR23-1, MR23-2 und MR23-3) für die Sequenzierung herangezogen werden.

Das WES wurde mittels dem NovaSeq 6000 von Illumina (*Illumina Inc.*) am Institut für Humangenetik an der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

Nach der Sequenzierung wird eine Alignment der Rohdaten an das Referenzgenom GRC38/hg38 durchgeführt. Allgemein ist das Alignment ein Abgleich zweier Sequenzen, um Unterschiede im Genom zu identifizieren, aus der eine Liste an Varianten entsteht. Dadurch generiert man in weiteren Schritten eine BAM- und VCF-Datei. Die VCF- (variant call format) Datei enthält diese Gensequenz-Variationen.

### 2.2.2. Homozygotie-Mapping

Die Homozygotie Regionen sind für die Identifizierung und Suche nach Kandidatengenen von Relevanz, da sie bei der Eingrenzung der Varianten nützlich sind. Diese Regionen können einerseits mit dem Homozygosity Mapper identifiziert werden. Dazu wird die VCF-Datei von je einer der betroffenen Schwestern (MR23-1, MR23-2 und MR23-3) auf die Webseite Homozygosity Mapper (Verfügbar unter <https://www.homozygositymapper.org/>) hochgeladen (Seelow *et al.*, 2009). Alle Regionen über 1MB wurden in eine BED-Datei exportiert. Die BED-Datei wird genutzt, um die Regionen der drei Schwestern abzugleichen, um so gemeinsame Homozygotie-Regionen zu erhalten. Dazu wird das Tool der Website Galaxy (Verfügbar unter: <https://galaxy.medunigraz.at/root/login?redirect=%2F>) genutzt.

Andererseits können die Homozygotie Regionen auch im GoldenHelix Programm, ohne die externe Nutzung einer weiteren Website, bestimmt werden.

Für die Filterung nach Kandidatengenomen wird die VCF-Datei in das GoldenHelix (Golden Helix, Inc.) Programm geladen. Die Homozygotie-Regionen, ob direkt im GoldenHelix Programm oder aus der BED-Datei, wurden für die anschließende Filterung nach der kausalen Variante herangezogen.

In GoldenHelix kann für Geschwister mit demselben Phänotyp ein gemeinsames Projekt geöffnet werden, wodurch man alle Dateien gleichzeitig analysieren kann.

### 2.2.3. Varianten Screening

Für das Screening nach der gesuchten Variante werden die VCF-Dateien der betroffenen Individuen herangezogen. Dafür werden die Daten mittels dem Programm GoldenHelix analysiert.

Nach dem Alignment mit dem Referenzgenom erhält man durchschnittlich 20 000 – 50 000 Varianten pro sequenziertem Individuum (Gilissen *et al.*, 2012).

Mit Hilfe des Programms können unterschiedliche Filterungsschritte angewendet werden, um die Menge an Varianten so weit zu minimieren, dass die gesuchte krankheitsverursachende Variante identifiziert werden kann, die den Phänotyp erklärt.

Im aktuellen Fall konnten die betroffenen Schwestern in ein Projekt zusammengefügt werden, wodurch die VCF-Dateien abgeglichen wird, sodass nur noch gemeinsame Varianten übrigbleiben. Dies kann nur erfolgen, wenn es sich in um den gleichen Phänotyp handelt und die betroffenen Individuen direkt verwandt sind.

Die Grundfilterung im GoldenHelix Programm wurde mit Hilfe von Kollegin Jasmin Blatterer durchgeführt, da nur ihr das Programm über ihre Arbeit am Institut der Humangenetik Graz zur Verfügung stand

Die Grundfilterung erfolgt anhand folgender Kriterien:

- Hohe Qualität (=PASS)

- Read tiefe  $\geq 5$
- Abgleich mit dem internen Frequency-Katalog (nicht größer als 15x Allelcounts)
- Frequency: GnomAD Exomes, Genomes, v3 NICHT BA1 (=  $<0.5\%$  Maximale Allelfrequenz in der Population)
- NICHT mitochondrial
- ClinVar: NICHT likely benign/ benign
- ACMG: NICHT likely benign/benign/weak benign

In weiteren Schritten wurden zusätzliche Filterungsschritte angewendet für die weitere Eingrenzung nach der kausalen Variante.

Zusätzliche Filterungsschritte:

- HPO-Term: HP:0001249 (intellektuelle Beeinträchtigung)
- PhoRank  $> 0,8$
- Homozygote Varianten

#### 2.2.4. Sanger-Sequenzierung

Die Validierung der gefundenen Varianten und die Segregationsanalyse wurde mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung durchgeführt.

Die für die Sequenzierung benötigten Primer wurden mit USCS Genome Browser (Verfügbar unter <https://genome.ucsc.edu/>) und dem dort zur Verfügung stehenden Tool „Exon Primer“ designt (siehe Tabelle 2).

Überprüft wurden die Primer mit dem „in silico prediction“ Tool von USCS Genome Browser, bevor sie anschließend bei der Firmer *Microsynth* (Microsynth AG) bestellt wurden.

Nach Erhalt der Bestellung werden die Primer nach Anweisung von der Firmer in LiChrosolv Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100mM gebracht. Aus dieser Stocklösung wurden die Primer auf eine Konzentration von 10mM weiter verdünnt, dies erfolgte mittels TrisHCl Buffer. Die Verdünnung wurde für die anschließende Sanger-Sequenzierung verwendet.

Tabelle 2. Primerliste für die Sanger-Sequenzierung:

Primer	Sequenz (5'-3')	N [nt]	Tm [C]
<b>WDR62_E4f</b>	tatcagagtcgccaggatgg	20	61,2°C
<b>WDR62_E4r</b>	tgcccaagacataggatgc	19	59,6°C

Zunächst wird mit einer PCR die Amplifizierung des zu sequenzierenden Bereichs durchgeführt. Die Amplifizierung erfolgt für alle Familienmitglieder. Folgende Komponenten wurden für jeden PCR-Ansatz eingesetzt:

DNA [~50ng]	x
5-fach Buffer (Promega)	5 µl
Forward Primer [12,5 pmol]	0,125 µl
Reverse Primer [12,5 pmol]	0,125 µl
dNTPs (Roche) [100µM]	0,1 µl
<i>GoTaq G2 DNA Polymerase (Promega) [0,5 U]</i>	4,5µl
<i>Nucleasefreies Wasser</i>	x
	12µl

Mit dem Nucleasefreiem Wasser wird jeder Ansatz auf 12µl aufgefüllt, abhängig von der Menge an DNA, die eingesetzt werden muss für eine Endkonzentration von 50ng. Zuvor wurde die DNA der einzelnen Familienmitglieder mittels Nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™) gemessen (siehe Tabelle 3). Die Proben MR23-2 und MR23-3 wurden mit TrisHCl Buffer verdünnt, um die Gesamtmenge von 12µl nicht zu überschreiten. Von diesen Proben wurde je 1µl im PCR-Ansatz eingesetzt.

Tabelle 3.: Nanodrop-Messung aller MR23 Familienmitglieder

Proben:	
MR23-1	57,1 ng/µl

MR23-2	204,2 ng/μl
MR23-3	250 ng/μl
MR23-4	30,2 ng/μl
MR23-5	101 ng/μl
MR23-6	67,55 ng/μl
MR23-7	64 ng/μl

Folgendes PCR-Programm wurde für die Amplifizierung verwendet:

*Tabelle 4.: PCR-Programm für die Amplifikation*

96°C	2 min	
96°C	10 sec	} 35x
57°C	10 sec	
72°C	15 sec	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Die korrekte Amplifizierung der PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Für die Herstellung des Gels mit 1,5 % Agarose wurde 1,5g LE Agarose (Biozym Scientific GmbH) eingewogen und in einem Kolben mit 100ml 1xTBE Buffer in der Mikrowelle aufgelöst. Der flüssige Agarose wurde 10μl GelRed (Stocklösung 10 000x) beigefügt.

Für die Überprüfung wurden je 3μl des PCR-Produktes entnommen mit 3μl Loading Dye versetzt und auf das Gel aufgetragen, sowie den 100bp Standard von der Firma Invitrogen.

Nach erfolgter Überprüfung findet die PCR für die anschließende Sanger-Sequenzierung statt.

Zuvor wurden die PCR-Produkte aufgereinigt, dies erfolgt anhand des ExoSAP-IT™ Protokolls (Thermo Fischer Scientific Inc.). ExoSAP-IT™ wird für die enzymatische Reinigung von den zuvor amplifizierten PCR-Produkten verwendet.

Dabei werden die überschüssigen Primer und Nukleotide hydrolysiert. Die Proben können anschließend direkt für die Sequenzierung verwendet werden.

Für die PCR für die anschließende Sequenzierung, wird je einmal der forward und einmal der reverse Primer eingesetzt, somit wird für jedes PCR-Produkt aus der Amplifizierung zwei Reaktionsmixe hergestellt, mit folgenden Komponenten:

BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems)	1 µl
5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	2 µl
Primer (10 µM)	1 µl
Nucleasefreies Wasser	5,5 µl
PCR Produkt	0,5 µl
	10µl

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

*Tabelle 5.: PCR-Programm*

96°C	30sec	} 35x
50°C	15sec	
60°C	4min	
8°C		∞

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Sephadex™ G-50 (GE Healthcare) aufgereinigt. Dazu werden die CentriStep™ Säulchen in leere MicroAmp Optical 8-tube Strip gesteckt und anschließend wird in jedes Säulchen 380µl Sephadex pipettiert. Um das überschüssige Wasser zu entfernen, werden zwei Zentrifugation Schritte durchgeführt, jeweils bei 700g für 1 Minute. Nach jeder Zentrifugation wird das überschüssige Wasser aus dem MicroAmp Optical 8-tube Strip weggeschüttet. Nun werden die CentriStep™ Säulchen in neue MicroAmp Optical 8-tube Strip gesteckt. Das Sequenzierprodukt (PCR-Produkt) wird 1:1 mit Nucleasefreien Wasser verdünnt und auf das Gel vorsichtig in der Säule aufgetragen. Der Ansatz wird für 2min bei 700g zentrifugiert. Nun können die

gereinigten PCR-Produkte auf eine 96er-well Platte für die Sequenzierung aufgetragen werden.

Die Sequenzierung erfolgt mittels einem Illumina Sequenzierungsgerät. Es wird das long-Seq Programm verwendet, da die PCR-Produkt eine Länge von 610bp aufweisen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. MR23

#### 3.1.1 Suche nach Kandidatengen

Die pakistanische Familie mit der Fall-Bezeichnung MR23 zeigt eine Form der intellektuellen Beeinträchtigung. In der Voruntersuchung wurde eine nicht-syndromale intellektuelle Beeinträchtigung mit autosomalem rezessivem Erbgang vermutet, da mehrere Kinder dieser Familie betroffen waren.

Die klinische Symptomatik zeigt sich bei drei von fünf Nachkommen der fünften Generation aus einer konsanguinen Partnerschaft (siehe Abbildung 3).

Wie bereits im Kapitel „Methoden“ beschrieben, liefert WES rund 20 000 – 50 000 Varianten. Aus den vielen tausenden Varianten wird schließlich die gesuchte kausale Variante herausgefiltert. Dazu wird zuerst die Grundfilterung durchgeführt, diese filtert nach hoher Qualität, Allelfrequenz < 0.5%, pathogene Varianten usw. Die Grundfilterung wird bei fast jedem Fall als Voreinstellung verwendet, um hier schon viele Varianten herauszufiltern.

Anschließend können Information über den Erbgang, sowie den vermuteten Phänotyp zusätzliche Filterungsschritte liefern.

Da es sich um drei betroffene Schwestern (MR23-1, MR23-2 und MR23-3) handelt können alle drei WES-Datensätze im GoldenHelix Programm abgeglichen werden, sodass nur noch Varianten übrigbleiben, die bei allen dreien gemeinsam auftreten.

Für die weitere Eingrenzung an Varianten werden im nächsten Schritt die Homozygotie-Regionen der drei Schwestern abgeglichen. Vermutet man eine seltene rezessive Erkrankung aufgrund der Blutsverwandtschaft, so kann die Suche innerhalb dieser Bereiche eingegrenzt werden. Bei Konsanguinität können diese Regionen in der Regel mehrere Megabasen (MB) lang sein.

Diese Regionen wurden daher einerseits mit der Website Homozygoty Mapper und im GoldenHelix Programm analysiert.

Beim Homozygoty Mapper kann jede Schwester nur einzeln analysiert werden, dazu wird die VCF-Datei auf die Webseite hochgeladen. Anschließend können alle Regionen, die über 1MB groß sind in eine BED-Datei exportiert werden.

Die BED-Dateien kann man mit Hilfe eines Tools der Website Galaxy (Verfügbar unter: <https://galaxy.medunigraz.at/root/login?redirect=%2F>) abgleichen.

Daraufhin erhält man eine Liste an gemeinsamen Homozygotie Bereichen der Schwestern, wodurch die Suche nach Kandidatengenen eingegrenzt werden kann.

Aus der oben beschriebenen Grundfilterung und den gemeinsamen Homozygotie Regionen ergaben sich 9 Varianten.

Um die kausale Variante zu finden, werden die weitere klinische Informationen in die Filterung miteinbezogen. Diese Filterungsschritte beinhalten, dass gemeinsame phänotypische Erscheinungsbild der Schwestern (HPO-Term: HP:0001249), sowie den vermuteten autosomal rezessiven Erbgang, aufgrund der vorliegenden Konsanguinität.

Damit hat sich durch verschiedene Filterungsschritte aus den 9 Varianten eine kausale Veränderung herauskristallisiert.

Diese Variante befindet sich am Chromosom 19 (19q13.12) im *WDR62* Gen.

Folgende Veränderung können in diesem Gen bei allen Schwestern mittels der VCF-Datei festgestellt werden: NM\_001083961.2:c.390G>A (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4.:** Vergleich der VCF-Datei aller drei Schwestern im WDR62 Gen an der Position c.390. Im oberen Teil der Abbildung wird das WDR62 Gen in Wildtyp-Form als Referenz gezeigt, in diesem Fall der hintere Bereich des Exon 4 des WDR62 Gens. Darunter wird die Basenabfolge dieses Bereiches gezeigt, markiert ist die Position c.390, an der sich die Base G befindet. Darunter befindet sich der Vergleich aller drei Schwestern MR23 1-3, markiert wurde die Stelle c.390. An dieser Position befindet sich bei allen drei die Base A. Dieser Vergleich wurde mit den VCF-Dateien im GoldenHelix Programm dargestellt. Quelle: eigene Darstellung in GoldenHelix

Die anderen 8 Varianten (siehe Tabelle 6) wurden mit Hilfe von Literaturrecherchen in den verschiedensten Datenbanken ausgeschlossen. Bei diesen Varianten handelt es sich um vier Missense Varianten, um drei Intron Varianten und eine intergenische Variante. Diese Varianten werden einerseits nicht weiter behandelt, da sie mit dem klinischen Erscheinungsbild der Schwestern nicht in Verbindung stehen.

Andererseits ergaben Recherchen auch keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation aus diesen Varianten.

Bei dem vorliegenden Basenaustausch handelt es sich um keine konservierten Basen. Bei konservierten Basen geht man von drastischeren Auswirkungen aufgrund eines Basenaustausches aus.

Tabelle 6.: Variantenliste aus den gemeinsamen Homozygotie Regionen der drei betroffenen Schwestern

Gen	NM-Nummer	Chr. Position	Varianten Art
FGF19	NM_005117.3:c.118G>A	11:69703759	Missense Variante
SLC29A2	NM_001532.3:c.176C>T	11:66369468	Missense Variante
MUC12	NM_001164462.2:c.13651A>G	7:101004214	Missense Variante
SPDYE6	NM_001146210.4:c.1010A>G	7:102348423	Missense Variante
		15:58933723	Intergenische Variante
SMURF1	NM_181349.3:c.806+462delC	7:99050895	Intron Variante
ORAI2	NM_001126340.3:c.226-17G>A	7:102446496	Intron Variante
OSGEPL1	NM_022353.3:c.221+327_221+330delTAGT	2:189761090	Intron Variante

Anschließend wurde die kausale Variante weiter untersucht.

Im GoldenHelix Programm wurde der Homozygotie Bereich von Chromosom 19, in dem sich das *WDR62* befindet, von MR23-1, MR23-2 und MR23-3 genauer analysiert. Dabei haben sich folgende Bereiche feststellen lassen (siehe auch Abbildung 5):

MR23-1: Chr19: 24,127,230 - 39,893,965

MR23-2: Chr19: 35,945,035 - 38,162,353

MR23-3: Chr19: 24,127,230 - 39,866,701



**Abbildung 5.: Homozygotie Region der betroffenen Schwestern MR23 1-3 in Chromosom 19.** Die gemeinsame LOH-Region befindet sich zwischen folgenden Positionen Chr19: 35,945,035-38,162,353. Quelle: eigene Darstellung in GoldenHelix

Aus den drei Homozygotie-Regionen ergibt sich ein gemeinsamer Bereich der sich zwischen den Positionen Chr19: 35,945,035-38,162,353 befindet. Dieser Bereich ergibt sich aus der kleinsten LOH- (loss of heterozygosity) Region von MR23-2 und dessen Überlappung mit MR23-1 und MR23-3.

Nach weiteren Recherchen konnte festgestellt werden, dass sich die Veränderung c.390G>A im *WDR62* an der Position Chr19:36066015 befindet und sich somit in der gemeinsamen Homozygotie-Region der drei Schwestern befindet.

Nach erneutem Gespräch mit Dr. Muzammil Ahmad Khan von der Gomal University stellt sich heraus, dass bei den betroffenen Geschwistern auch eine milde Mikrozephalie neben der milden intellektuellen Beeinträchtigung vermutet wird.

Dieser Phänotyp würde mit dem Fund im *WDR62* Gen übereinstimmen, daher wurde für diese Variante ein Primer erstellt und mittels Sanger-Sequenzierung bei den betroffenen und nicht betroffenen Familienmitgliedern überprüft.

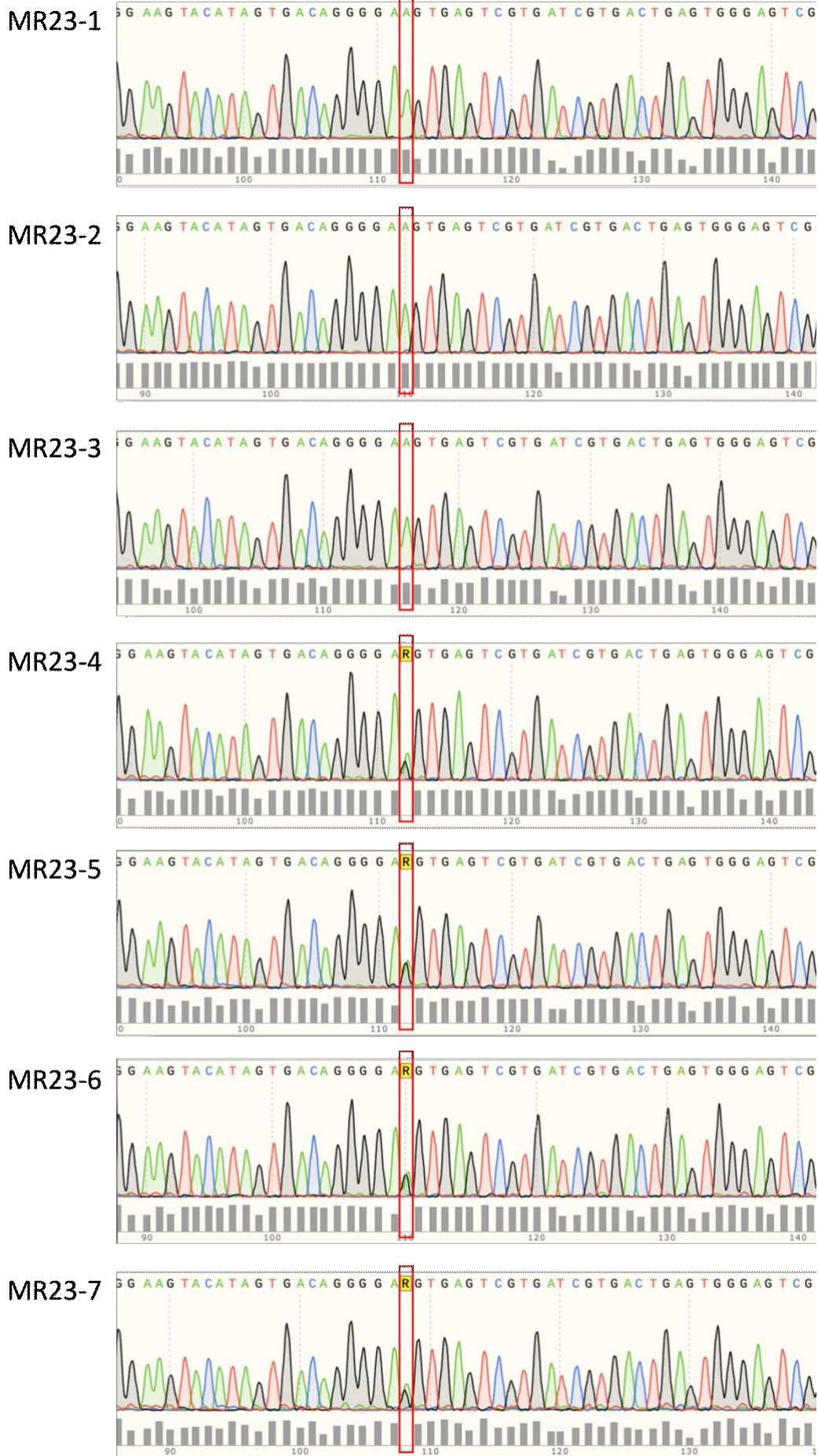
### 3.1.2 Sanger-Sequenzierung

Die Variante c.390G>A, die sich im Exon 4 des *WDR62* Gens befindet, wurde mit der Sanger-Sequenzierung in allen Familienmitgliedern untersucht. Dabei wurden die Primer WDR62-E4f und WDR62\_E4r (siehe Tabelle 2. Primerliste für die Sanger-Sequenzierung:) verwendet.

Die Primer wurden zuvor mit dem ExonPrimer Tool von USCS Genome Browser designt (siehe Kapitel „Methoden“).

Das Ergebnis der Sequenzierung an der Position c.390 des Exon4 im *WDR62* Gens lieferte Einsicht in den Genotypen aller Familienmitglieder. Die Genotypen sehen wie folgt aus (siehe auch Abbildung 6):

MR23-1	A/A
MR23-2	A/A
MR23-3	A/A
MR23-4	G/A
MR23-5	G/A
MR23-6	G/A
MR23-7	G/A



**Abbildung 6.: Ergebnis der Sanger-Sequenzierung aller Familienmitglieder MR23 1-7.** Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Sequenz nach erfolgter Sequenzierung unter Verwendung des forward Primers (WDR62-E4f). In Rot gekennzeichnet wird die Position c.390, an der die Veränderung im WDR62 stattgefunden hat. MR23 1-3 zeigen an dieser Stelle die Basen A. MR23 4-7 zeigen an dieser Stelle ein R, dies steht für das heterozygote Vorkommen zweier Basen. R steht für das Vorkommen der Base G und Base A an der Position c.390. Quelle: Eigene Darstellung mittels SnapGene

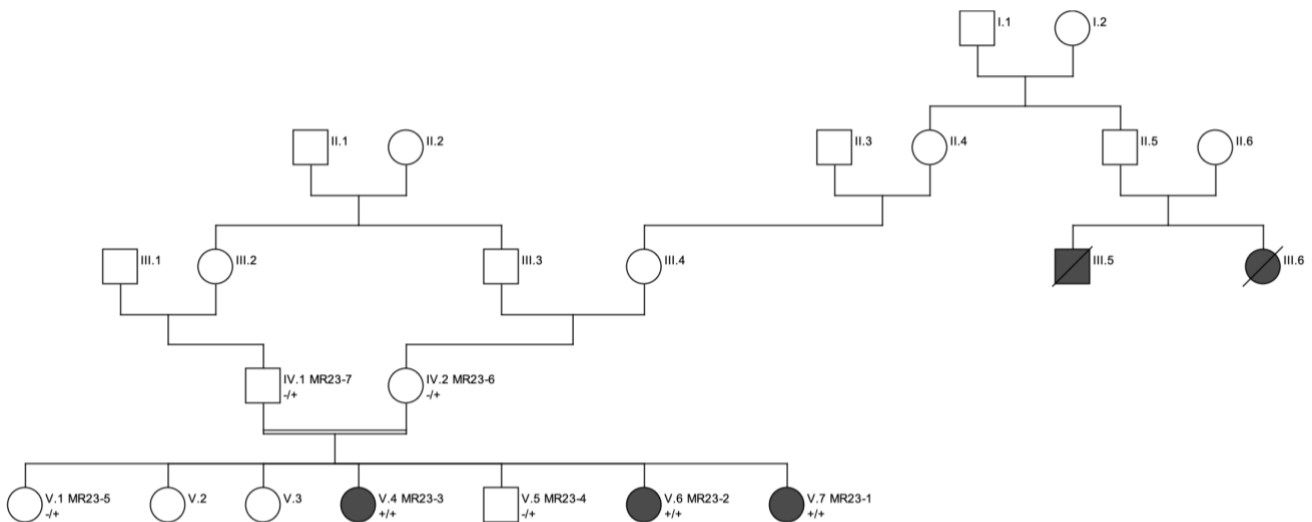
Die Sanger-Sequenzierung bestätigt das homozygote Vorkommen der krankheitsverursachenden Variante bei den drei betroffenen Schwestern (MR23-1, MR23-2 und MR23-3). Diese weisen auf beiden Allelen den Basenaustausch G>A auf (siehe Abbildung 6). Somit tragen sie die Variante c.390G>A homozygot.

Bei den nicht betroffenen Eltern (MR23-6 und MR23-7) handelt es sich hingegen um Träger der Variante, da sie nur auf einem der beiden Allele die Veränderung von G>A tragen. Die Eltern sind heterozygot für diese Variante, da sie auf einem Allel die Base G und auf dem anderen Allel die Base A besitzen. Ebenso sind die nicht betroffenen Geschwister MR23-4 und MR23-5 heterozygot für diese Variante und somit nur Träger dieser Erkrankung.

### 3.1.3 Segregationsanalyse

Mit dem Ergebnis der Sanger-Sequenzierung konnte eine Segregationsanalyse innerhalb der Familie durchgeführt werden.

Eine Übersicht der Segregation innerhalb der Familie liefert der Stammbaum in Abbildung 7.



**Abbildung 7.: Segregationsanalyse der Familie MR23 der Variante c.390G>A im Exon 4 im WDR62**

**Gen.** Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung wurden mit einem Plus und einem Minus Zeichen dargestellt. Bei den betroffenen Geschwistern MR23 1-3 (schwarz markiert) liegt die Variante homozygot vor, gezeigt mit +/+. Die nicht-betroffenen Geschwister MR23 4-5, sowie die Eltern MR23 6-7 (gezeigt in Weiß) sind heterozygot für die Variante, gezeigt mit -/+ und somit Träger der Variante. Quelle: Eigene Darstellung in CeGaT – Pedigree Chart Designer (<http://pedigree.cegat.de/>)

Der Stammbaum zusammen mit den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung zeigen, dass die Variante wie bei der ersten Diagnose vermutet autosomal rezessiv innerhalb der Familie segregiert.

Die Eltern sind beide Träger der Variante und haben je ein betroffenes Allel an ihre betroffenen Töchter MR23-1, MR23-2 und MR23-3 weitervererbt.

Die betroffenen Töchter sind homozygot für diese Variante und exprimierten somit den beschriebenen Phänotyp aus.

Die anderen beiden untersuchten Kinder MR23-4 und MR23-5 sind nur Träger der gefundenen Veränderung und somit heterozygot für diese Variante. Sie erhielten das betroffene Allel entweder maternal oder paternal. Sie können die Variante mit einer 50% Wahrscheinlichkeit an ihre Nachkommen weitervererben.

### 3.2. WDR62 Gen

Mutationen im *WDR62* Gen führen zu einer autosomal rezessiven, primären Mikrozephalie-2 (MCPH-2) (MIM 613583). Das *WDR62* codiert für das „WD repeat-containing protein 62“ und befindet sich am Chromosom 19q13.12. Das *WDR62* beinhaltet 1523 Aminosäuren (AS) mit 32 Exons und mehreren WD40-Repeats. Bislang sind 4 Isoformen, die aufgrund des alternativen Splicing entstehen (*WDR62 WD repeat domain 62 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*, no date; Nicholas *et al.*, 2010; Bhat *et al.*, 2011; Mahmood, Ahmad and Hassan, 2011).

Das *WDR62* Protein spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau der Spindel und bei der Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen in der Embryogenese. Das Gen wird von der frühen bis hin zur späten Neurogenese exprimiert. Lokalisiert ist das Protein während der Interphase überwiegend im Nukleus. Im Laufe der Mitose wandert es zu den Spindel Polen (Nicholas *et al.*, 2010; Bhat *et al.*, 2011; Mahmood, Ahmad and Hassan, 2011; Barbelanne and Tsang, 2014; Morris-Rosendahl and Kaindl, 2015; Nardello *et al.*, 2018).

Dem Protein werden ähnliche Funktionen wie dem *ASPM* Protein nachgesagt, welches die häufigste Ursache für die autosomal rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH) ist. Beim *ASPM* (Abnormal Spindle-like Microcephaly) Protein handelt es sich wie beim *WDR62* um ein Spindelapparat Protein.

50% der MCPH-Fälle gehen von Veränderungen im *ASPM* oder *WDR62* Gen aus, wobei *ASPM* zur autosomal rezessiven, primären Mikrozephalie-1 (MCPH-1) Form führt. Die Proteine spielen somit eine wichtige Rolle in der Hirnentwicklung (Barbelanne and Tsang, 2014; Nardello *et al.*, 2018).

Mikrozephalie ist eine seltene neurologische Entwicklungsstörung. Definiert wird sie durch eine signifikante Reduzierung des okzipitofrontalen Kopfumfanges (OFC = occipito-frontal circumference) um -2 SD (Standardabweichung). Die Reduzierung um die Standardabweichung steht im Vergleich zum Alter, Geschlecht und der Ethnie. Röntgenbilder des Gehirns zeigen diese Reduzierungen deutlich, wobei es hauptsächlich im Bereich des cerebralen Kortex auftritt (Schaaf and Zschocke, 2013, S. 339). Unterschieden wird bei der Mikrozephalie zwischen der primären und sekundären Form.

Die primäre Mikrozephalie kann bereits ab der 32. Schwangerschaftswoche (SSW) oder direkt nach der Geburt auftreten, weshalb diese Form eine genetische Assoziation nachgeschrieben wird, die unabhängig von Umwelteinflüssen entsteht. Neben genetischen Faktoren können aber exogene Einflüsse eine Rolle spielen. Darunter fallen Alkoholgenuß während der Schwangerschaft, eine maternale-Syphilis Infektion, unzureichendes Schwangerschaftsgewicht, sowie mangelhafte vorgeburtliche Sorgfalt.

Es wird vermutet, dass die Ursache der primären Form auf die reduzierte Produktion von Neuronen zurückzuführen ist, da diese bereits in der 21. SSW gebildet werden.

Die sekundäre Mikrozephalie hingegen tritt erst nach der Geburt auf. Als Ursache wird hier die fehlerhafte Netzbildung und Aktivität von dendritischen Zellen vermutet, da diese erst nach der Geburt stattfinden (Woods, 2004; Mahmood, Ahmad and Hassan, 2011; Schaaf and Zschocke, 2013).

Die Prävalenz der autosomal rezessiven primären Mikrozephalie variiert stark je nach Population und der verwendeten Standardabweichung zur Angabe des verringerten Kopfumfanges. Dieser schwankt zwischen -3 SD und -2 SD (Kaindl *et al.*, 2010; Mahmood, Ahmad and Hassan, 2011; Nardello *et al.*, 2018).

Die globale Prävalenz liegt bei 1,3 bis 150 pro 100 000 Neugeburten, wobei sie in Arabischen und Asiatischen Regionen, in denen Konsanguinität vermehrt vorkommt, weitaus höher liegt (Kaindl *et al.*, 2010; Mahmood, Ahmad and Hassan, 2011).

Das wiederholte Auftreten einer primären Mikrozephalie in einer Familie liegt bei 1:6. Bei verwandten Eltern steigt das Risiko auf 1:4 (Roberts *et al.*, 1999).

Bislang sind 18 genetische Loci bekannt die zu verschiedenen Formen von MCPH führen können. Die Formen (MCPH 1 – 18) wurden nach der zeitlichen Abfolge in denen sie entdeckt wurden gekennzeichnet. Die häufigsten Varianten sind biallelische Mutationen im *ASPM*, die 68% der MCPH-Fälle ausmachen. Direkt gefolgt von Varianten im *WDR62* mit 14,1% und MCPH1 mit 8% (Mahmood, Ahmad and Hassan, 2011; Naveed *et al.*, 2018).

Bislang konnten im Bezug zur MCPH-2 Form über 20 Gene identifiziert werden, die meisten Gene werden im zentralen Nervensystem exprimiert (Roberts *et al.*, 1999; Orphanet: *Autosomal recessive primary microcephaly*, 2013).

Veränderungen im *WDR62* können, wie zuvor erwähnt, zu einer autosomalen rezessiven primären Mikrozephalie MCPH-2 führen, wobei der klinische Phänotyp je nach Veränderung im Gen stark variiert. MCPH-2 charakterisiert sich durch einen reduzierten Kopfumfang von -4 bis zu -7 SD, mit einer niedrigen und schiefen Stirn (Bastaki *et al.*, 2016; Nardello *et al.*, 2018). Die Veränderungen im *WDR62* führen in erster Linie zu einer Mikrozephalie und einer intellektuellen Beeinträchtigung.

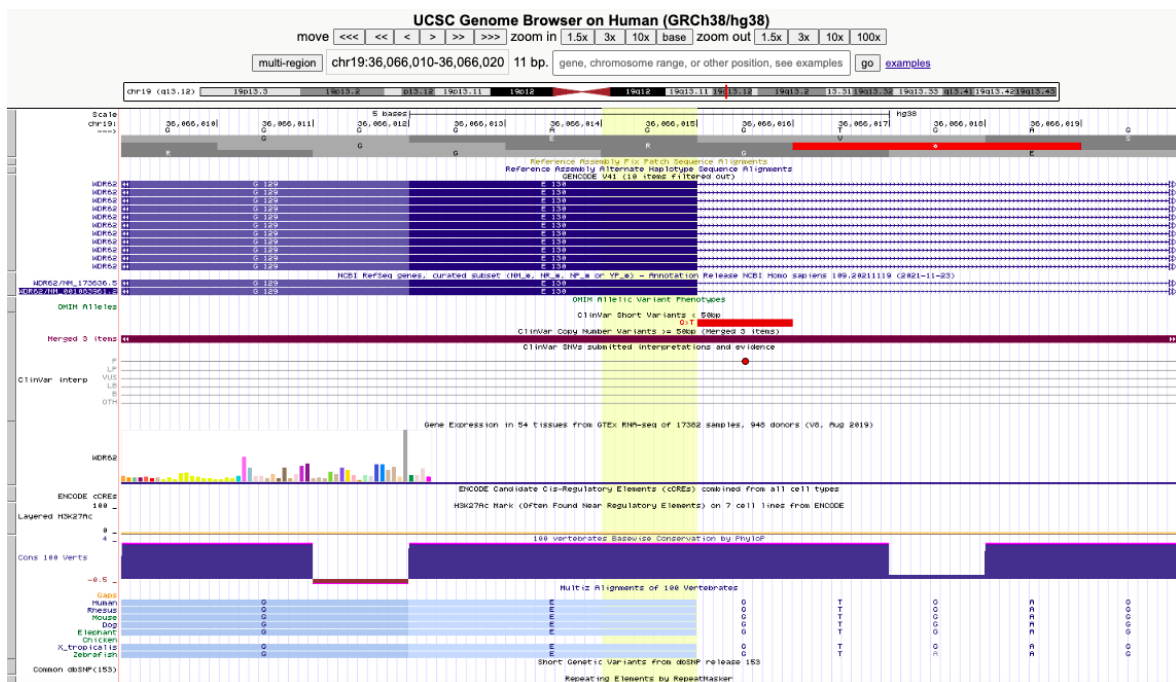
Veränderung im *WDR62* Gen können neben der Mikrozephalie auch zu kortikalen Fehlbildungen führen. Die kortikalen Fehlbildungen, wie Pachygyrie, Polymikrogyrie, Schizozephalie, Kleinhirn Hypoplasie treten nicht bei allen Patienten auf (Bilgüvar *et al.*, 2010; Bhat *et al.*, 2011; Morris-Rosendahl and Kaindl, 2015).

Durch die einfache Zugänglichkeit zu NGS-Technologien werden ständig neue Studien durchgeführt, wodurch sich das Gen-Panel und Phänotyp Spektrum erweitert.

### 3.2.1 *WDR62* c.390G>A

In dieser Arbeit konnte die Variante c.390G>A in Exon 4 im *WDR62* Gen bei drei Schwestern MR23-1, MR23-2 und MR23-3 mit einer vermuteten milden Mikrozephalie und milder intellektueller Beeinträchtigung festgestellt werden. Mittels Literaturrecherche über das *WDR62* Gen und dem damit verbundenen Phänotyp, kann man davon ausgehen, dass die Variante c.390G>A für den klinischen Phänotyp verantwortlich ist. Wie oben erwähnt kann die klinische Manifestation je nach verursachendem Gen und Art der Veränderung sehr variieren. Bei Veränderungen im *WDR62* wird neben der autosomalen rezessiven, primären Mikrozephalie auch eine intellektuelle Beeinträchtigung erwartet, zusätzliche können auch kortikalen Fehlbildungen auftreten.

Bei der gefundenen Variante c.390G>A kommt es zu einem Austausch der Base Guanin zu einem Adenin, wodurch aber keine Veränderung in der Aminosäure (p.Glu130Glu) entsteht. Daher handelt es sich hier um eine synonyme Mutation. Der Austausch findet am letzten Nukleotid von Exon 4 statt (siehe Abbildung 8), wodurch ein Effekt im Splicing erwartet wird. Es wird somit ein trunkiertes Protein vermutet, bei dem auch die WD40-Repeats verloren gehen können. Da es sich um ein konserviertes Gen handelt, werden schwerwiegende Konsequenzen in der Proteinfunktion erwartet.



**Abbildung 8. UCSC Genom Browser Abschnitt vom WDR62 Gen an der Position c.390G>A.** Der Abschnitt zeigt das Genom zwischen den Positionen Chr19:36,066,010 – 16,066,020. Quelle: UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>)

Die Auswirkungen der Variante auf die Proteinfunktion konnten im Zuge dieser Arbeit weder in vitro noch in vivo bestätigt werden. Mit Hilfe spezieller Vorhersageprogramme ist es möglich Vermutungen über dessen Auswirkungen zu machen. Dazu wird die Transkript Nummer ENST00000401500, der Gen-Name WDR62 und die Veränderung c.390G>A eingegeben.

Mittels Mutation-Taster (Verfügbar unter <https://www.mutationtaster.org/>) wurde die erste Vorhersage analysiert. Das Vorhersageprogramm gibt an, dass es sich bei dieser Veränderung im Gen um eine krankheitsverursachende Variante

handelt. Aufgrund von Splicing Effekten können Proteineigenschaften betroffen sein. Es wird vermutet, dass die WD40-Repeats verloren gehen können, aber die Länge des Proteins sei unverändert.

Mit dem Vorhersageprogramm VarSeak (Verfügbar unter <https://varseak.bio/>) kann der Splice-Effekt bestimmt werden. VarSeak berechnet den Splicing-Effekt mittels der Transkript-Nummer, Gen Name und der Variante. Es konnte ein Splice-Effekt der Klasse 4 festgestellt werden (siehe Abbildung 9). Die Variante c.390G>A ist bereits in anderen Datenbanken bekannt und mit der rs-Nummer rs749472433 verlinkt. In der GenomAD Datenbank wird eine Allelfrequenz von 0,0000198978 angegeben.

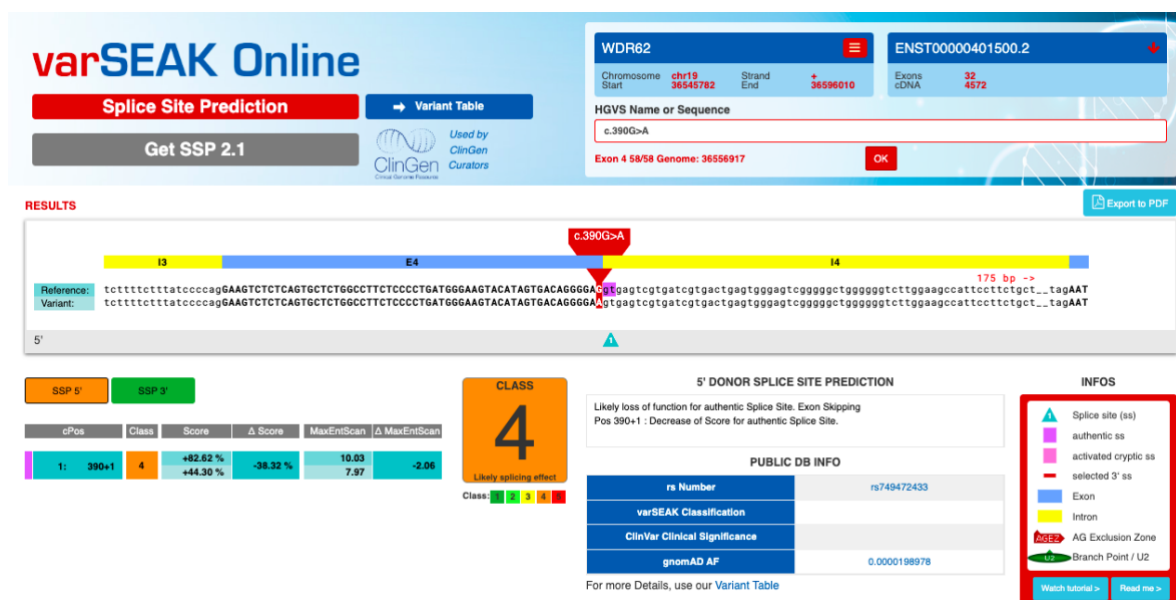


Abbildung 9.: VarSeak Online Splice Site Prediction der Variante c.390G>A im Exon 4 im WDR62 Gen.  
Quelle: VarSeak online (<https://varseak.bio/>)

Die Klassifizierungen werden wie folgt bezeichnet:

- Klasse 1: Kein Splicing Effekt
- Klasse 2: Wahrscheinlich kein Splicing Effekt
- Klasse 3: Unbekannter Splicing Effekt
- Klasse 4: Wahrscheinlich ein Splicing Effekt
- Klasse 5: Splicing Effekt

(Read Me varSEAK Online - Splice Site Prediction, 2022)

Die Vorhersagebeschreibung in Abbildung 9 gibt an, dass es zu einem möglichen Funktionsverlust kommt, auch bekannt als „Loss of Function“ (LOF).

Eine LOF Mutation führt dazu, dass das Protein seine Funktion verliert oder nicht vollständig synthetisiert wird und somit nur ein trunkiertes Protein vorliegt (Murken *et al.*, 2017, S. 82).

Weiters wird vermutet, dass ein Exon an der Position c.390+1 übersprungen wird und somit der Score der Splice-Site verringert wird. Ein Splice-Score von +38,32% wurde ermittelt.

Aufgrund dieser Vermutung wurde mittels VarSeak auch die Position c.390+1 genauer analysiert (siehe Abbildung 10).

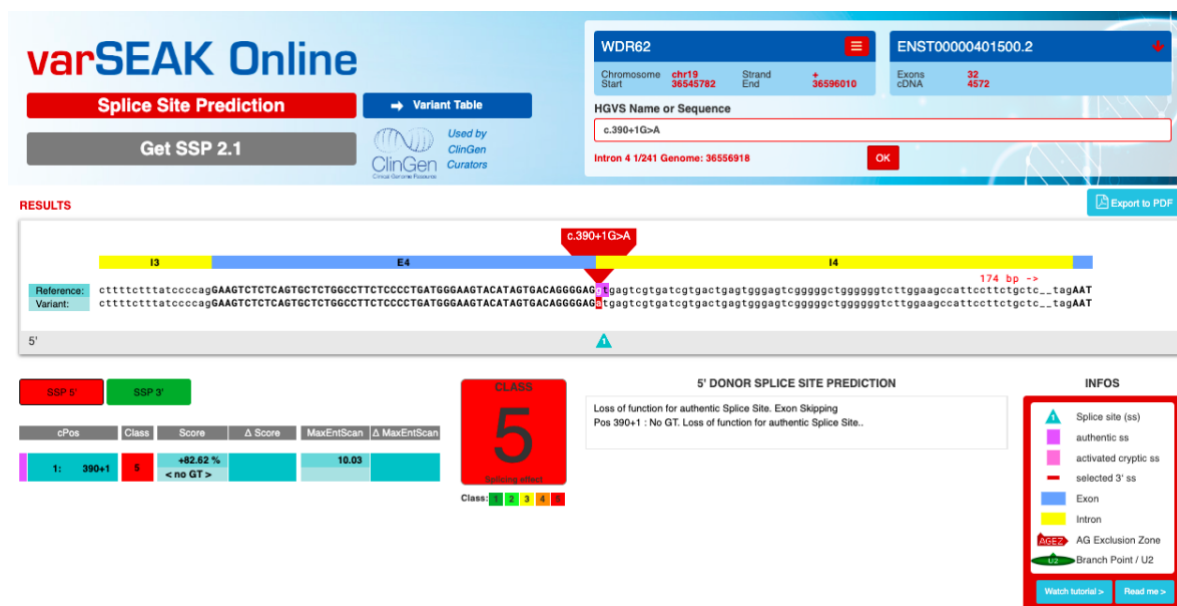


Abbildung 10.: VarSeak Online Splice Site Prediction der Variante c.390G>A im Exon 4 im WDR62 Gen.

Quelle: VarSeak online (<https://varseak.bio/>)

An der Position c.390+1 wird ein Splice-Effekt der Klasse 5 ermittelt, somit wird ein Splice Effekt erwartet. In dieser Vorhersagebeschreibung sind die Vermutung über den Funktionsverlust (LOF) und dem Exon Verlust eine klare Erwartung und keine Annahme, wie bei der Position c.390. Der Splice-Score wird hier sogar mit +82,62% ermittelt.

Die Verwendung der Vorhersageprogramme und die Bestimmung mittels Sanger-Sequenzierung über die Variante c.390G>A in Exon 4 im *WDR62* bestätigt den kausalen Zusammenhang des Phänotyps der betroffenen Schwestern.

Die Vorhersageprogramme zeigen, dass die Veränderung zu einem Splice-Effekt und somit ein trunkiertes Protein entsteht, welches nicht voll funktionstüchtig ist. Diese Veränderung erklären die Entstehung einer Mikrozephalie sowie die intellektuelle Beeinträchtigung, die in der untersuchten Familie gehäuft aufgetreten ist.

## 4. Diskussion

Veränderungen im *WDR62* (WD-repeat domain 62) sind nach dem *ASPM* (abnormal spindle-like microcephaly associated protein) die zweithäufigste Ursache für die Ausprägung einer autosomal rezessiven, primären Mikrozephalie (MCPH).

Eine Variante des *WDR62* Gen führt zur MCPH-2 Form, die neben einer Mikrozephalie auch eine intellektuelle Beeinträchtigung beinhaltet, sowie zu weiteren kortikalen Fehlbildungen führen kann. MCPH-2 wird bei Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt.

Die klinische Symptomatik ist von der Art der Veränderung im Gen abhängig, dem Ausmaß der damit verbundenen Proteinfunktionsstörung, sowie der Penetranz im Patienten.

Zum aktuellen Untersuchungszeitpunkt und den erhaltenen Informationen des Kollegen aus Pakistan weisen die drei betroffenen Schwestern MR23-1, MR23-2 und MR23-3 in diesem Fall Beides auf. Eine milde intellektuelle Beeinträchtigung und eine milde Mikrozephalie. Konkrete Angaben über eine Intelligenzdiagnostik bzw. Perzentilenkurven (Kopfumfang, Größe und Gewicht der Mädchen bezogen auf das Alter) lagen nicht vor.

Mittels der Sequenzierung des gesamten proteincodierenden Bereiches (WES) und nachfolgender Sanger-Sequenzierung konnte die Variante c.390G>A im *WDR62* Gen in Exon 4 bei allen drei Betroffenen in homozygoter Form als kausale Variante festgestellt werden.

Diese Variante wurde bereits 2016 erstmals von Bastaki *et al.* beschrieben. In seiner Publikation beschreibt er einen Fall mit zwei Geschwistern aus Sudan, die aus einer konsanguinen Partnerschaft stammen. Klinische Informationen und Stammbaumdaten wiesen auch in dieser Publikation auf eine autosomal rezessive Mikrozephalie hin. Beide Geschwister wiesen ähnliche klinische Auffälligkeiten auf. Beim Jungen konnte bereits im Ultraschall eine Mikrozephalie festgestellt werden und nach der Geburt ergaben die Messungen des Kopfumfanges einen Wert von - 4 SD. Im MRT des Schädels konnte auch eine milde unvollständige

Pachygyrie (Lissenzephalie) festgestellt werden. Bei dem Mädchen zeigten sich zusätzlich zur Mikrozephalie und einer unvollständigen Pachygyrie eine Entwicklungsverzögerung. Eine weitere betroffene Schwester mit Mikrozephalie geht aus dem Stammbaum hervor, sie starb jedoch sehr früh an Leberversagen. Die Eltern und zwei weitere Geschwister sind phänotypisch unauffällig. Mittels WES konnte die Variante c.390G>A im Exon 4 des *WDR62* Gens homozygot bei den betroffenen Geschwistern ermittelt werden.

Bei der Veränderung handelt es sich um eine synonyme Mutation, die das letzte Nukleotid des Exon 4 betrifft. Es kommt bei der Variante zum Austausch von einem Guanin zu einem Adenin, wobei die Aminosäure unverändert bleibt (p.Glu130Glu). Bastaki *et al.* nutzte verschiedene Vorhersageprogramme, um die Auswirkung der Veränderung festzustellen. Mittels SplicePort stellte er fest, dass die 5´splice-Seite von Exon 4 beeinträchtigt wird. Es wird vermutet, dass es zu einer vorzeitigen Termination der Translation kommt, wodurch ein trunkiertes Protein entsteht. Das trunkierte Protein verliert womöglich alle WD40-Repeats, wodurch es einen vollständigen Funktionsverlust erleidet (Bastaki *et al.*, 2016). Sowohl in der Publikation von Bastaki *et al.*, als auch in der aktuellen genetischen Untersuchung konnte mit WES und anschließender Sanger-Sequenzierung die kausale Variante festgestellt werden.

Aufgrund der Erkenntnisse dieser Publikation, sowie zahlreicher anderer Veränderungen an diesem Gen über die Literaturrecherchen, kann das Ergebnis der gefunden Mutation im Chromosom 19 auch in dieser Arbeit besser verstanden werden.

Die Identifizierung neuer Varianten ist für die Erweiterungen des Phänotyp Spektrums wichtig, sowie der damit verbundenen Diagnose und Therapieetablierung.

Mittels Literaturrecherche in der HGMD-Datenbank (Verfügbar unter: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) konnte festgestellt werden, dass bereits 89 Varianten im *WDR62* Gen bekannt sind. Unter diesen 89 Varianten sind 49 Missense/ Nonsense Mutationen vorzufinden. In den meisten Varianten konnte eine autosomal rezessive, primäre Mikrozephalie festgestellt werden, sowie das zusätzliche Auftreten einer intellektuellen Beeinträchtigung. Darunter konnte auch

die Variante c.390G>A in Exon 4 gefunden werden, die aufgrund des Fundes von Bastaki *et al.* hinterlegt ist. Die Variante c.390G>A kann in der dbSNP Datenbank (Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) mit folgender rs-Nummer gefunden werden: rs749472433 (*rs749472433 RefSNP Report - dbSNP - NCBI, 2021*). In der ClinVar Datenbank (Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) hingegen ist kein Eintrag zu exakt dieser Variante bekannt.

Im *WDR62* Gen sind aber vielerlei Einträge über andere Varianten zu finden, die alle zu einer autosomal rezessiven primären Mikrozephalie-2 mit unterschiedlichem Schweregrad einer intellektuellen Beeinträchtigung und verschiedenen kortikalen Fehlbildungen führen kann.

Das *WDR62* Gen besteht aus 1523 Aminosäuren mit 32 Exons und beinhaltet mehrere WD40-Repeats. Das *WDR62* Protein ist für den Aufbau der Spindel und bei der Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen in der Embryogenese wichtig. Veränderung in diesem Gen führen zu einer Hirnentwicklungsstörung (Schaaf and Zschocke, 2013; Morris-Rosendahl and Kaindl, 2015).

In dem Fall MR23 war die verwendete Methodik einer WES die geeignete Vorgehensweise. Trotz unzureichender klinischer Angaben und der fehlenden Zusatzinformation über eine milde Mikrozephalie führte die anschließende Variantenfilterung im GoldenHelix Programm zur krankheitsverursachenden Variante.

Die Variantenfilterung erfolgte im ersten Schritt nach der Grundfilterung, die neben Qualitätsmerkmalen nach seltenen und pathogenen Varianten sucht. In den weiteren Filterungsschritten wurden die vorhandenen klinischen Informationen miteinbezogen.

In der ersten Untersuchung der Familie MR23 wurde eine nicht-syndromale intellektuelle Beeinträchtigung (NSID) bei allen drei Schwestern vermutet, sowie ein autosomal rezessiver Erbgang, aufgrund der vorliegenden Konsanguinität. Aufgrund dieser Informationen wurde nach homozygot vorkommenden Varianten gefiltert, sowie dem HPO Term HP:0001249, der für die intellektuelle Beeinträchtigung steht.

Die gefundene kausale Variante c.390G>A im *WDR62* Gen verursacht zusätzlich zu einer intellektuellen Beeinträchtigung auch eine autosomal rezessive primäre Mikrozephalie-2. Da die MCPH-2 (MIM 604317) in der OMIM-Datenbank mit einer Entwicklungsstörung, als auch kortikalen Veränderungen einhergeht, konnte trotz der Filterung nur nach dem HPO Term HP:0001249, neben dem vermuteten Phänotyp einer intellektuellen Beeinträchtigung auch eine Mikrozephalie festgestellt werden.

Nach einer weiteren Untersuchung der Familie MR23, die von von Dr. Muzammil Ahmad Khan von der Gomal University durchgeführt wurde, konnte auch eine milde Mikrozephalie beschrieben werden. Diese Informationen wurden erst nach der bereits durchgeführten Variantenfilterung übermittelt und bestätigte somit den Fund der kausalen Variante.

Mit diesem Indiz wurde dann die Sanger-Sequenzierung durchgeführt und bestätigt das homozygote Vorliegen der Variante bei den betroffenen Schwestern.

In vielen anderen Fällen kann die Methodik jedoch an ihre Grenzen stoßen, daher bleiben viele seltene Mendelische Erkrankungen immer noch unentdeckt. Schwierigkeiten in der genetischen Diagnostik treten auf, wenn es sich um unbekannte Gene handelt, eine unvollständige Penetranz vorliegt und es sich um kleine Familien handelt, mit einer sporadisch auftretenden Erkrankung oder de-novo Varianten (Bamshad *et al.*, 2011).

Daher rückt in der Forschung die Konsanguinität für die klinische Genetik mehr in den Fokus. Nachkommen aus Verwandtschaftsehen weisen ein erhöhtes genetisches Risiko auf, da sie sich 1/8 aller Gene teilen. Bei konsanguinen Ehen zwischen Cousinen/Cousins ersten Grades liegt das Risiko von Geburtsproblemen 2-3% höher als in der Normalbevölkerung (Bennett *et al.*, 2002; Hamamy, 2012). Die Expression von autosomal rezessiven (AR) Erkrankungen steigt bei diesen Familien an und so treten genetische Veränderungen hier deutlich weniger sporadisch auf.

Dies kann man auch darauf zurückführen, dass in Regionen mit hoher Konsanguinität meist große Familien weit häufiger sind und somit auch mehrere Personen einer Familie betroffen sind. Dadurch bleiben autosomal rezessive

Erkrankungen weniger häufig unentdeckt (Musante and Ropers, 2014; Bener and Mohammad, 2017).

Vor allem die Exom-Sequenzierung war ein großer Schritt für die Forschung hinsichtlich der Identifizierung neuer Gene, die für seltene Mendelsche Erkrankungen verantwortlich sind. Mit der Etablierung von NGS-Technologien wurde die Entdeckung neuer Gene und Varianten rasant beschleunigt (Bamshad, Nickerson and Chong, 2019; Vinkšiel *et al.*, 2021).

Für die Identifizierung krankheitsverursachender Gene wurde vor der Entwicklung der NGS-Technologie andere Methoden, darunter die Sanger-Sequenzierung verwendet. Heute löst WES die Sanger-Sequenzierung ab und ist seither die häufigste verwendete Methode.

WES findet seine Verwendung, da die meisten Erkrankungen im protein-codierenden Bereich aufzufinden sind und es im Vergleich zur Sequenzierung des gesamten Genoms (WGS) praktikabler und kostengünstiger ist. Zwar machen die Exons nur 1% des gesamten Genoms aus, 85% der krankheitsverursachenden Gene liegen in diesem Bereich und Splice-Seiten können ebenfalls untersucht werden (Boycott *et al.*, 2013; Rabbani, Tekin and Mahdieh, 2014)

WES ermöglichte das parallele Sequenzierung vieler Gene, wodurch es möglich ist schnell neue Erkrankungen und Gene zu finden.

Dennoch stößt auch hier WES an seine Grenzen, da unser Wissen über den gesamten protein-codierende Bereich nicht vollständig ist und es sich nur auf einen kleinen Bereich des Genoms beschränkt (Rabbani, Tekin and Mahdieh, 2014).

Bei den meisten klinischen Fragestellung so auch in dieser Arbeit, wird die WES-Methode der Sanger-Sequenzierung vorgezogen. Ein wesentlichen Vorteile liegt darin, dass die Sanger-Sequenzierung weit aus aufwändiger ist, sie benötigt länger und weitaus mehr Schritte für die Suche nach Kandidatengenen. Mit der Methode nach Sanger kann nur ein kleiner Bereich des Genoms sequenziert werden, daher ist nach konkreter klinischer Vermutung eine Eingrenzung mittels genetischer Kartierung notwendig.

Diese Kartierung erfolgte anhand von Kopplungsanalysen, Homozygotie Regionen, Karyotypisierung, CNVs (copy number variation) und SNP-abhängige Analysen.

Bei der Kopplungsanalyse versucht man phänotypische Merkmale mit Genen zu koppeln, dadurch wird die Suche nach der veränderten Genen am Chromosom vereinfacht (Arnemann, 2019). Die Ermittlung von Homozygotie Regionen findet vor allem Nutzen bei vorliegender Konsanguinität, da in diesen Fällen die kausale Variante mit hoher Wahrscheinlichkeit in diesen Regionen liegt (Seelow *et al.*, 2009).

Wenn die krankheitsverursachenden Gene nicht auf einen kleinen Bereich des Genoms eingegrenzt werden können, übersteigt es die Möglichkeiten der Sanger-Sequenzierung, wodurch diese sehr aufwändig und kostenintensiv wird.

Je mehr Personen einer Familie betroffen sind, desto einfacher wird es den Bereich im Genom mit den klinischen Informationen über eine Variantenfilterung einzugrenzen.

Mit WES ist es daher auch möglich Untersuchungen durchzuführen, wenn genetisches Material von nur einer Person der Familie zur Verfügung steht und kein krankheitsverursachendes Gen oder Region vermutet wird.

NGS gilt somit als schnellere und effizientere Methode in der DNA-Analyse und identifiziert kostengünstiger krankheitsverursachenden Varianten.

Die Sanger-Sequenzierung wird jedoch in vielen Fällen weiterhin für die anschließende Bestätigung der vermuteten Variante herangezogen. In diesem Fall ist es von Vorteil nur den Bereich, um die vermutete Variante erneut zu sequenzieren.

Die Sanger-Sequenzierung wird auch für die Segregationsanalyse innerhalb der Familie verwendet, wodurch der Erbgang bestätigt werden. Diese Analyse kann erkrankte Mitglieder als auch Träger der Familie identifiziert.

Mit der Entwicklung der NGS-Technologie und der Bioinformatik sind bereits große Erfolge in der genetischen Diagnostik geschaffen worden, dennoch wird ständig an den Weiterentwicklungen neuer Methoden oder Identifizierungs-Ansätzen gearbeitet.

In nähere Zukunft kann WES von WGS (Whole genome Sequencing) abgelöst werden. WGS konnte bereits für erfolgreiche Gen-Identifizierungen in nicht-codierenden Bereichen eingesetzt werden. WGS kann ein breiteres Spektrum an Varianten identifizieren. WES ist dagegen technisch limitiert, um strukturelle Varianten, Kopienzahlvarianten, Insertionen und Deletionen (Indels), sowie

Einzelnukleotid-Varianten zu analysieren. Doch bislang ist der Zugang zu WGS stark limitiert und wird großen Instituten mit großer Kapazität vorbehalten, somit ist es ausschließlich der Forschung offen.

Daher ist es in Zukunft notwendig die Sequenzierungen allen zugänglich zu machen, um so die klinische Diagnostik zu verbessern und mehr Studien zu ermöglichen (Bamshad, Nickerson and Chong, 2019; Vinkšiel *et al.*, 2021).

In dieser Arbeit konnte eine Erklärung für die phänotypischen Auffälligkeiten der Familie MR23 und deren betroffenen Kinder festgestellt werden. Mit der Diagnose kann die Familie hinsichtlich einer ID und MCPH-2 aufgeklärt werden, sowie über die unterschiedliche Ausprägung der Symptome innerhalb der Familie, deren Risiken und Behandlungsmöglichkeiten.

Dennoch bietet die vorliegende Arbeit Potenzial für weitere Anschlussuntersuchungen über die genauen Auswirkungen der Variante und der Proteinfunktion des *WDR62* Gen.

In dieser Arbeit reichten jedoch Zeit und Mittel nicht aus für weitere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen, um damit die erwartete Proteindysfunktion verifizieren zu können.

Sowohl für die betroffenen Schwestern als auch für die heterozygoten Träger der Variante besteht ein erhöhtes Risiko die Variante an ihre Nachkommen weiterzuvererben. Im Falle eines Kinderwunsches sollte die Familie daher erneut beraten werden.

## 5. Literatur

- (1) American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th edn, American Psychiatric Association. 5th edn. Washington, DC; London, England. Available at:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0126574103004578>.
- (2) Arnemann, J. (2019) 'Kopplungsanalyse', *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1386–1386. doi: 10.1007/978-3-662-48986-4\_3516.
- (3) Bamshad, M. J. *et al.* (2011) 'Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery.', *Nature reviews. Genetics*. Nature Publishing Group, 12(11), pp. 745–55. doi: 10.1038/nrg3031.
- (4) Bamshad, M. J., Nickerson, D. A. and Chong, J. X. (2019) 'Mendelian Gene Discovery: Fast and Furious with No End in Sight.', *American journal of human genetics*. American Society of Human Genetics, 105(3), pp. 448–455. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.07.011.
- (5) Barbelanne, M. and Tsang, W. Y. (2014) 'Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly.', *BioMed research international*. Hindawi Publishing Corporation, 2014, p. 547986. doi: 10.1155/2014/547986.
- (6) Bastaki, F. *et al.* (2016) 'Novel splice-site mutation in WDR62 revealed by whole-exome sequencing in a Sudanese family with primary microcephaly.', *Congenital anomalies*, 56(3), pp. 135–7. doi: 10.1111/cga.12144.
- (7) Bener, A. and Mohammad, R. R. (2017) 'Global distribution of consanguinity and their impact on complex diseases: Genetic disorders from an endogamous population', *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. Ain Shams University, 18(4), pp. 315–320. doi: 10.1016/j.ejmhg.2017.01.002.
- (8) Bennett, R. L. *et al.* (2002) 'Genetic Counseling and Screening of Consanguineous Couples and Their Offspring: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors', *Journal of Genetic Counseling*, 11(2), pp. 97–119. doi: 10.1023/A:1014593404915.
- (9) Bhat, V. *et al.* (2011) 'Mutations in WDR62, encoding a centrosomal and

- nuclear protein, in Indian primary microcephaly families with cortical malformations.', *Clinical genetics*, 80(6), pp. 532–40. doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01686.x.
- (10) Bilgüvar, K. *et al.* (2010) 'Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations.', *Nature*. Nature Publishing Group, 467(7312), pp. 207–10. doi: 10.1038/nature09327.
- (11) Bittles, A. (2001) 'Consanguinity and its relevance to clinical genetics.', *Clinical genetics*, 60(2), pp. 89–98. doi: 10.1034/j.1399-0004.2001.600201.x.
- (12) Boat, T. F. and Wu, J. T. (2015) *Mental Disorders and Disabilities Among Low-Income Children, Mental Disorders and Disabilities Among Low-Income Children*. Washington, D.C.: National Academies Press. doi: 10.17226/21780.
- (13) Boycott, K. M. *et al.* (2013) 'Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: Discovery to translation', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 14(10), pp. 681–691. doi: 10.1038/nrg3555.
- (14) *Consang.net* (no date). Available at: <https://www.consang.net/> (Accessed: 21 June 2022).
- (15) Gilissen, C. *et al.* (2012) 'Disease gene identification strategies for exome sequencing.', *European journal of human genetics : EJHG*. Nature Publishing Group, 20(5), pp. 490–7. doi: 10.1038/ejhg.2011.258.
- (16) Hamamy, H. (2012) 'Consanguineous marriages', *Journal of Community Genetics*, 3(3), pp. 185–192. doi: 10.1007/s12687-011-0072-y.
- (17) Iqbal, Z. and van Bokhoven, H. (2014) 'Identifying Genes Responsible for Intellectual Disability in Consanguineous Families', *Human Heredity*, 77(1–4), pp. 150–160. doi: 10.1159/000360539.
- (18) Jabeen, N. and Malik, S. (2014) 'Consanguinity and its sociodemographic differentials in Bhimber District, Azad Jammu and Kashmir, Pakistan.', *Journal of health, population, and nutrition*, 32(2), pp. 301–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25076667>.
- (19) Kaindl, A. M. *et al.* (2010) 'Many roads lead to primary autosomal recessive microcephaly', *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd, 90(3), pp. 363–383. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.11.002.

- (20) Kaufman, L., Ayub, M. and Vincent, J. B. (2010) 'The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review', *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 2(4), pp. 182–209. doi: 10.1007/s11689-010-9055-2.
- (21) Kübelbeck, A. (2008) *Autosomal-rezessiver Erbgang*. Available at: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5c/Autorecessive\\_01.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5c/Autorecessive_01.png) (Accessed: 21 June 2022).
- (22) Mahmood, S., Ahmad, W. and Hassan, M. J. (2011) 'Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): Clinical manifestations, genetic heterogeneity and mutation continuum', *Orphanet Journal of Rare Diseases*. BioMed Central Ltd, 6(1), p. 39. doi: 10.1186/1750-1172-6-39.
- (23) Majewski, J. *et al.* (2011) 'What can exome sequencing do for you?', *Journal of medical genetics*. *J Med Genet*, 48(9), pp. 580–589. doi: 10.1136/JMEDGENET-2011-100223.
- (24) Morris-Rosendahl, D. J. and Kaindl, A. M. (2015) 'What next-generation sequencing (NGS) technology has enabled us to learn about primary autosomal recessive microcephaly (MCPH).', *Molecular and cellular probes*. Elsevier Ltd, 29(5), pp. 271–81. doi: 10.1016/j.mcp.2015.05.015.
- (25) Murken, J. *et al.* (2017) *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 9th edn, *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 9th edn. München: Thieme. doi: 10.1055/b-005-143305.
- (26) Musante, L. and Ropers, H. H. (2014) 'Genetics of recessive cognitive disorders', *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, 30(1), pp. 32–39. doi: 10.1016/j.tig.2013.09.008.
- (27) Nardello, R. *et al.* (2018) 'A novel mutation of WDR62 gene associated with severe phenotype including infantile spasm, microcephaly, and intellectual disability.', *Brain & development*. The Japanese Society of Child Neurology, 40(1), pp. 58–64. doi: 10.1016/j.braindev.2017.07.003.
- (28) Naveed, M. *et al.* (2018) 'Comprehensive review on the molecular genetics of autosomal recessive primary microcephaly (MCPH).', *Genetics research*, 100, p. e7. doi: 10.1017/S0016672318000046.
- (29) Nicholas, A. K. *et al.* (2010) 'WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly.', *Nature genetics*. Nature Publishing Group, 42(11), pp. 1010–4. doi: 10.1038/ng.682.

- (30) Orphanet: Autosomal recessive primary microcephaly (2013) *orpha.net*. Available at: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=DE&data\\_id=732&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=microcephaly&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Disease\(s\)/group of diseases=Autosomal-recessive-primary-microcephaly--True-microcephaly-&ti](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=DE&data_id=732&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=microcephaly&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group of diseases=Autosomal-recessive-primary-microcephaly--True-microcephaly-&ti) (Accessed: 26 July 2022).
- (31) Rabbani, B., Tekin, M. and Mahdieh, N. (2014) 'The promise of whole-exome sequencing in medical genetics', *Journal of Human Genetics*, 59(1), pp. 5–15. doi: 10.1038/jhg.2013.114.
- (32) *Read Me varSEAK Online - Splice Site Prediction (2022) JSI medical systems GmbH*. Available at: <https://varseak.bio/pdf/SSP-Documentation.pdf> (Accessed: 4 August 2022).
- (33) Roberts, E. *et al.* (1999) 'The second locus for autosomal recessive primary microcephaly (MCPH2) maps to chromosome 19q13.1–13.2', *European Journal of Human Genetics*, 7(7), pp. 815–820. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200385.
- (34) *rs749472433 RefSNP Report - dbSNP - NCBI (2021) dbSNP Short Genetic Variations*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs749472433> (Accessed: 6 August 2022).
- (35) Schaaf, C. P. and Zschocke, J. (2013) *Basiswissen Humangenetik*. 2nd edn. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). doi: 10.1007/978-3-642-28907-1.
- (36) Seelow, D. *et al.* (2009) 'HomozygosityMapper--an interactive approach to homozygosity mapping', *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server), pp. W593–W599. doi: 10.1093/nar/gkp369.
- (37) Vinkšelj, M. *et al.* (2021) 'Improving diagnostics of rare genetic diseases with NGS approaches', *Journal of Community Genetics*, 12(2), pp. 247–256. doi: 10.1007/s12687-020-00500-5.
- (38) Vissers, L. E. L. M., Gilissen, C. and Veltman, J. A. (2016) 'Genetic studies in intellectual disability and related disorders', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 17(1), pp. 9–18. doi: 10.1038/nrg3999.
- (39) *WDR62 WD repeat domain 62 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI (no date)*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/284403> (Accessed: 26 July 2022).

- (40) Woods, C. G. (2004) 'Human microcephaly', *Current Opinion in Neurobiology*, 14(1), pp. 112–117. doi: 10.1016/j.conb.2004.01.003.