

x
Masterarbeit

**Die Rolle des Fortschrittes der Humangenetik im
klinischen Alltag einer Neurologie und Psychiatrie des
Kindes- und Jugendalters**

Eine retrospektive Evaluierung Humangenetischer Befunde und dem Workflow in der diagnostischen Klärung von Entwicklungsstörungen und neuropsychiatrischen Krankheitsbildern

eingereicht von

Dr. Barbara Schmidt-Zeitler, BSc MSc

zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science
(MSc)
an der**

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
Institut für Humangenetik

unter der Anleitung von

Univ.- Prof. Mag. Dr. rer. nat. Dr. scient. med. Erwin Petek
Assoz. Prof. Priv. -Doz. Mag. Dr. rer. nat. Christian Windpassinger
Medizinische Universität Graz, Institut für Humangenetik

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.

Klagenfurt, August 2019

Barbara Schmidt-Zeitler eh

Vorwort

[...“Jeder Mensch ist ein einmaliger Mensch und tatsächlich, für sich gesehen, das größte Kunstwerk aller Zeiten, so habe ich immer gedacht und denken dürfen, dachte ich.“...]

(Bernhard Thomas, 2018)

Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die mich während meines Studiums unterstützt haben.

Meiner Familie, die große Geduld bewies, aber auch aktiv durch Korrekturlesen und ihren technischen Input, diese Arbeit entstehen ließ.

Im Weiteren möchte ich die „Kärntner Genetik Gruppe“ des ULG Jahrganges 2017-2019 erwähnen, mit deren Motivation ein rechtzeitiges Ende erzielbar war.

Dank gilt auch all jene Kollegen/innen, deren Expertise hilfreich war.

Zusammenfassung

Einleitung: In den letzten Jahren hat die Humangenetik einen enormen technischen Fortschritt zu verzeichnen. Damit hat sich die Humangenetik nicht nur in der Pränatal Diagnostik etabliert, sondern auch in der Routineabklärung unklarer Entwicklungsstörungen und neuropsychiatrischer Krankheitsbilder.

Für die Klassifikation genetisch bedingter, zumeist seltener Erkrankungen, stehen zahlreiche Untersuchungsverfahren zur Verfügung, die auf zytogenetischen, biochemischen oder molekulargenetischen Grundlagen basieren.

Die Kostenreduktion neuer Technologien, ihre Effizienz und hohe Aufklärungsrate bei seltenen Erkrankungen hat zu einer vermehrten Inanspruchnahme dieser innovativen Untersuchungsmethoden in der Aufdeckung bisher ungeklärter Entwicklungsstörungen geführt. Damit können unnötige Untersuchungen vermieden und therapeutische und medikamentöse Ansätze effizienter und individualisierter umgesetzt werden.

Dennoch kann aus der Fülle der generierten Rohdaten nicht immer ein kausaler Zusammenhang geschaffen werden. Verschiedene Bioinformatik Programme und Datenbanken helfen zwischen unbedeutenden Polymorphismen und seltenen Sequenzvarianten mit Proteinveränderungen, zu unterscheiden.

Fragestellung: In dieser Arbeit wird die Rolle der Humangenetik in der Entwicklungsabklärung zwischen 2013-2018 an der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters am LKH Klagenfurt retrospektiv betrachtet. Neben Indikation und klinischer Anwendung verschiedener humangenetischer Methoden werden ihre historische Entwicklung in der klinischen Diagnostik betrachtet. Erläutert werden dabei traditionelle Methoden vom Karyogramm über die Array-Technik bis hin zum NGS (Next Generation Sequencing), der genomweiten Suche nach einer genetischen Ursache sowie deren Vor- und Nachteile erläutert. Dabei wird auch der bisherige Workflow in der Entwicklungsabklärung des Vorschul- und Jugendalters an der Abteilung kritisch betrachtet.

Methode: Die Humangenetischen Methoden, ihre Ergebnisse, Klinik und Verdachtsdiagnosen werden mittels deskriptiver Statistik retrospektiv beleuchtet. Dabei handelt es sich um humangenetische Befunde von 49 Kindern, die zwischen 2013-2018 im Zuge der Entwicklungsabklärung an der Humangenetik Graz erstellt

wurden. Bei der untersuchten Patientengruppe handelt es sich um 29 Burschen und 20 Mädchen im Alter zwischen 6 Monaten und 21 Jahren mit unterschiedlichen entwicklungsneurologischen und neuropsychiatrischen Krankheitsbildern.

Diese explorative Studie erhielt ein Votum durch die Ethikkommission Kärnten (A25/19).

Ergebnisse: Während konkrete Verdachtsdiagnosen auch heute noch zielgerichtet durch konventionelle Zytogenetik wie dem Karyogramm oder einer FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) geklärt werden können, ermöglichen molekulargenetische Methoden wie die Array CGH Technik (vergleichende genomische Hybridisierung) bereits eine genomweite Suche nach submikroskopischen Veränderungen. Diese Mikrodeletions- oder Duplikationssyndrome gelten als häufigste Ursachen von unklaren Entwicklungsstörungen im Kindesalter.

In der retrospektiv erfolgten Analyse der humangenetischen Befunde von 49 Kindern und Jugendlichen kann dieser Workflow auch verdeutlicht werden. In 45 Prozent zeigen sich in dieser vorselektionierten Patientengruppe ein positives Ergebnis, das in 22 Fällen mittels Array Technik erhoben wurde. Es werden darin 16 Duplikationen und sechs Deletionen gefunden. Nur elf davon gelten als kausal und vier als möglich kausal verursachend. In drei Fällen war auch das konventionelle Karyogramm auffällig. Zur Bestätigung der submikroskopischen Veränderungen sowie in der Untersuchung weiterer verdächtiger Familienmitglieder wurden auch andere molekulargenetische Methoden wie die RT-PCR oder FISH herangezogen. In Einzelfällen erfolgte bereits eine Sequenzierung. Der zuletzt erfolgte Ansatz, über das höhere Auflösungsvermögen moderner humangenetischer Methoden auch bei neuropsychiatrischen Krankheitsbildern die zugrundeliegenden genetischen Ursachen zu erfassen, ist noch unbefriedigend geblieben.

Limitationen: Da die geringe Anzahl der evaluierten Befunde von einem vorselektioniertem Patientengut einer Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters stammen, können diese nicht auf die Allgemeinheit in vollem Maße übertragen werden. Ein wesentliches Element in der Entwicklungsdiagnostik und der Wahl der geeigneten Methode liegt in der präzisen Beschreibung des klinischen Erscheinungsbildes. Eine fundierte Terminologie ermöglicht einen systematischen

Vergleich von Phänotyp und Genotyp über computergestützte Analyse genomischer Varianten und klinischem Erscheinungsbild.

Zahlreiche Datenbanken wie OMIM oder Orphanet basieren auf einer allgemeinen Terminologie, der HPO (Human Phenotype Ontology) um darin gemeinsame Informationen über klinische Erscheinung und Geninformationen zu vereinen. Andere basieren auf bioinformatischen Algorithmen um aus der Vielzahl an Daten des WES (Whole exome sequencing) oder WGS (Whole genome sequencing) die pathogenen Veränderungen zu filtern.

Ausblick: Auf der Suche nach punktgenauen Veränderungen der Erbsubstanz der DNS (Desoxyribonukleinsäure) erlauben die Möglichkeiten durch die innovativen Techniken des NGS (Next Generation Sequencing) das Auslesen des gesamten menschlichen Genoms oder aller proteinkodierenden Abschnitte, des Exoms. Technische Weiterentwicklung und eine bessere Dateninterpretation geben zunehmend Hoffnung für die zukünftige Klärung komplexer, zumeist sehr heterogener und multifaktoriell bedingten neuropsychiatrischer Krankheitsbilder.

Abstract

Introduction: In recent years, human genetic testing has gained more importance through modern technology in the diagnostic field. Therefore, genetic methods have been established as an important part in prenatal routine diagnostic but also in diagnosing unknown mental retardation and recently neuropsychiatric disorders. Various techniques are currently available for the classification of rare genetic diseases relying on cytogenetic or molecular genetic methods.

The reduction of costs and time justifies the increasing use in the search for undiagnosed rare genetic conditions and developmental delays in childhood.

It helps to reduce unnecessary and invasive diagnostic examination, allows conclusions concerning etiology, offers the chance for individual treatment and/or influences medication.

Modern technology such as NGS leads to enormous genetic variants - often without causal effect. Differentiation between rare pathogen variants and common findings like polymorphisms depends on bioinformatics and prioritization of data.

Goal: The aim of this work is to provide the reader with a good overview of available genetic techniques with its pro and contra through a retrospective analysis of genetic tests during 2013-2018 at the department of neurology and youth psychiatry Klagenfurt. The general requirement of genetic tests for different indications as well as the historical development from the traditional cytogenetic methods, to molecular karyotyping and next generation sequencing, the possibility of genome wide screening, is critically viewed.

Method: Genetic results, clinical features and suspected cause are analyzed with descriptive statistics. The results of 49 children that were sent to "Humangenetik Graz" for molecular genetic testing, are scored. There are 29 boys and 20 girls at the age of 0.5 and 21 years with various neurodevelopmental and neuropsychiatric diseases.

The study is approved by the ethical commission "Ethikkommission Kärnten" (A25/19).

Results: Diagnosing known suspected mutations or confirming these can mainly be accomplished by traditional cytogenetic methods like karyogram or FISH (fluorescence in situ hybridization), whereas novel molecular genetic techniques allow genome wide screening of submicroscopic variations. Microdeletions- and

duplications are very often associated with unknown mental retardation. This retrospective analysis of 49 results of children and teenagers shows the workflow in clinical diagnostics. In this study, 45 Percent out of this selective group with neurodevelopmental delays mainly in speech and communication show a positive result, 22 of the findings are done by array CGH. It contains 16 duplications and 6 deletions, only eleven of them with a pathogenic consequence. Three chromosomal mutations could be detected by conventional karyotyping. Additional confirmation of submicroscopic variations is done by molecular RT-PCR (Real time polymerase chain reaction) or FISH and requires testing family members as well.

In recent time genome sequencing was used more often. High resolution of modern technology allows testing for neuropsychiatric disease as well, but results were rather unsatisfactory.

Limitations: The small number of results of a selected clinical group at the department of neurology and youth psychiatry does not allow a general statement. An important factor of developmental diagnostics depends upon reliable methods and precise definition and description of symptoms. It therefore needs an exact terminology for phenotype and genotype profiles and software assisted analysis.

Some programs such as OMIM (Online Mendelian Inheritance in Men), or Orphanet (database of rare diseases) use HPO terminology (Human phenotype ontology), a common terminology, with the aim to integrate information about similarities of symptoms or novel genes for clinical applications. Others are based on bioinformatic algorithms aiming at prioritizing multiple variants found with the modern methods of WES (whole exome sequencing) or WGS (whole genome sequencing).

Conclusion: Genome wide screening of single nucleotide variations of DNA (deoxyribonucleic acid) is available through modern techniques such as NGS (Next generation Sequencing) which accomplish sequencing the complete human genome or the protein coding region of the exome alone. The recent developments in human genetics and new software programs for bioinformatic analysis let us hope for the detection of underlying reasons for heterogenous as well as complex neuropsychiatric diseases in the future.

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Vorwort.....	ii
Danksagung	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract.....	vii
Inhaltsverzeichnis	ix
Glossar und Abkürzungen	xi
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xiii
1 Einleitung.....	14
1.1 Epidemiologie und Relevanz.....	16
1.2 Persönlicher Zugang zum Thema	17
1.2.1 Gliederung der Arbeit:.....	20
2 Theoretischer Hintergrund.....	21
2.1 Entwicklungsstörungen	21
2.2 Intellektuelle Beeinträchtigungen:.....	23
2.3 Seltene Krankheitsbilder mit Beeinträchtigung der Entwicklung	25
2.3.1 Down Syndrom.....	25
2.3.2 Phylketonurie PKU	25
2.4 Neuropsychiatrische Krankheitsbilder mit Beeinträchtigung der kognitiven und sozialen Entwicklung.....	26
2.4.1 Autismus Spektrum Störung (ASS).....	27
2.4.2 Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS).....	27
3 Humangenetische Methoden	28
3.1 Historische Entwicklung der Genetik.....	29
3.2 Konventionelle zytogenetische Untersuchungen.....	32
3.2.1 Karyogramm.....	33
3.2.2 FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung)	35
3.3 Molekulargenetische Methoden	37
3.3.1 Array-CGH (Vergleichende genomische Hybridisierung).....	37
3.3.2 Sanger Sequenzierung	40
3.4 Next Generation Sequencing (NGS)	42
3.4.1 WES - Whole Exome Sequencing.....	45
3.4.2 Panel-Untersuchung.....	46
3.4.3 Technologische Ausblicke.....	46

3.4.4	Strategien in der Datenauswertung, bioinformatische und klinische Interpretation	49
4	Genetische Datenbanken und Informationsquellen.....	51
4.1	OMIM.....	52
4.2	Orphanet	52
4.3	NCBI.....	53
4.4	USCS Browser.....	54
4.5	HPO (Human Phenotype Ontology).....	55
5	Ethische und rechtliche Grundlagen.....	56
5.1	Das österreichische Gentechnikgesetz (GTG).....	57
5.2	Die Datenschutzgrundverordnung.....	58
5.2.1	Einwilligung und Beratung.....	59
5.3	Entwicklungsabklärung im klinischen Alltag.....	60
6	Forschungsfrage.....	63
7	Methodik.....	65
7.1	Datenmaterial:	65
7.2	Inklusions- und Exklusionskriterien:.....	66
8	Auswertung.....	66
8.1	Soziodemographische Daten	66
9	Ergebnisse.....	70
9.1	Ergebnisse bezogen auf die klinische Symptomatik:	70
9.2	Ergebnisse bezogen auf Symptomatik und Genetik	71
9.2.1	Zusammenfassende Befunde von Klinik und Genetik	72
9.3	Ergebnisse bezogen auf Somatische Symptome und EEG.....	72
9.4	Ergebnisse bezogen auf die verwendeten humangenetischen Methoden und klinische Symptomatik:	73
9.4.1	Zusammenfassende Ergebnisse der humangenetischen Methoden:	74
9.4.2	Ergebnisse bezogen auf die Entwicklung in der Humangenetik:	75
9.5	Ergebnisse bezogen auf Kausalität und klinisches Erscheinungsbild	76
9.6	Zusammenfassung der Ergebnisse:	79
10	Diskussion	82
10.1	Limitationen.....	83
10.2	Abteilungsspezifischer Algorithmus	85
10.3	Ausblick für die Zukunft	86
11	Literatur	88

Glossar und Abkürzungen

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizitstörung
Array-CGH	Vergleichende genomische Hybridisierung
ASS	Autismus Spektrum Störung
DSM-5	Diagnostisches und Statistischen Manual psychischer Störungen
DNA/ DNS	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
EWR	Entwicklungsrückstand
EEG	Elektroenzephalogramm
HPO	Human Phenotype Ontology
ICD-10	Internationale Statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IQ	Intelligenz Quotient
NGS	Next Generation Sequencing
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
PCR	Polymerase Kettenreaktion (chain reaction)
WES	Whole exome sequencing
WGS	Whole genome sequencing

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Karyogramm Trisomie 21

Abbildung 2: Karyogramm 1

Abbildung 3: Fluoreszenz in situ Hybridisierung- Sonde

Abbildung 4: FISH Bild

Abbildung 5: Array Technik

Abbildung 6: Sanger Sequenzierung

Abbildung 7: Next Generation Sequencing

Abbildung 8: Alternatives Splicing

Abbildung 9: Altersverteilung bezogen auf den Untersuchungszeitpunkt

Abbildung 10: Verhaltensauffälligkeiten

Abbildung 11: Detektionsrate von Array und Karyogramm

Abbildung 12: Häufigkeit der angeforderten humangenetischen Untersuchungen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht submikroskopischer Veränderungen, Kausalität und Heredität

1 Einleitung

Die Humangenetik und der Teilbereich "Medizinischen Genetik", beschäftigen sich mit den genetischen Variationen der Menschen und den Auswirkungen spezifischer Faktoren in der Krankheitsentstehung und erhöhen damit das Verständnis für seltene Erkrankungen (Aksu et al., 2011). Dazu zählt das Erkennen von monogenen, mitochondrialen oder multifaktoriell-genetisch bedingten Erkrankungen und deren zugrundeliegende Veranlagung, ihr Vererbungsmuster sowie die Abgrenzung zu externen Ursachen.

Für die Klassifikation zahlreicher nicht diagnostizierter Ursachen von entwicklungsneurologischen und neuropsychiatrischen Krankheitsbildern stehen der Humangenetik zahlreiche Untersuchungsverfahren zur Verfügung. Diese basieren auf klinischen, zytogenetischen, biochemischen oder molekulargenetischen Grundlagen. In den letzten Jahren hat die Humangenetik einen enormen technischen Fortschritt zu verzeichnen (Schaaf und Zschocke, 2018; Metzker 2010). Die Vielzahl neuer Technologien ermöglichen es, rasch kausale Zusammenhänge genetisch bedingter Erkrankungen zu erfassen. Die Effizienz und eine hohe Aufklärungsrate seltener Erkrankungen hat zu einer vermehrten Inanspruchnahme dieser innovativen Untersuchungsmethoden in der Klärung von Entwicklungsstörungen geführt.

Waren es früher vorwiegend monogene Erkrankungen, die mit traditionellen Methoden geklärt werden konnten, so ermöglichen die Techniken des NGS das Auslesen des gesamten menschlichen Genoms oder der proteinkodierenden Abschnitte, des Exons. Effizienz und kürzere Laufzeiten der neuen Sequenziergeräte aus der zweiten und dritten Generation ermöglichen so in kurzer Zeit mehrere Gene desselben/derselben Patienten/in oder einzelne Gene mehrerer Patienten/innen parallel zu sequenzieren (Kuß, 2014).

Damit können eine rasche Diagnostik gewährleistet werden und therapeutische und medikamentöse Ansätze effizienter umgesetzt werden. Der Einzug in die Routinediagnostik ist damit nicht mehr aufzuhalten.

Dennoch kann aus der Fülle der generierten Rohdaten nicht immer ein kausaler Zusammenhang geschaffen werden. Verschiedene Bioinformatik Programme helfen

zwischen unbedeutenden Polymorphismen und seltenen Sequenzvarianten mit Proteinveränderungen, zu unterschieden (Neveling und Hoischen, 2014).

Varianten machen die Vielfalt eines Individuums aus und können populationsspezifisch gehäuft an verschiedenen Stellen des Genoms auftreten.

Treten sie selten in Erscheinung und betreffen weniger als ein Prozent der Bevölkerung, gelten Mutationen als krankheitsrelevant.

Verdächtig gelten ebenso Regionen mit hoch konservierten Genen, die damit Einfluss auf das untersuchte Merkmal zeigen (Goldstein et al., 2013; Tomiuk und Loeschke, 2017).

Aus Sicht der Evolution beruht die Verschiedenheit der Arten auf dem Wechselspiel zwischen der Weitergabe des Erbgutes an die Nachkommen und Erhalt der Vorzüge der Eltern sowie den Fehlern in der Replikation der Nukleotidabfolge der DNS. Jene neuen Eigenschaften, die für den Organismus von Vorteil sind, bleiben durch Selektion erhalten und gelten als hoch konserviert (Alberts et al., 2012).

Seltene Varianten gelten somit als pathogene Sequenzveränderungen der Erbinformation (DNS), wenn sie zu Proteinveränderungen führen und so für phänotypische Veränderungen verantwortlich sind. Daher ist es von Bedeutung, diese Mutationen mit bioinformatischer Filterung und Priorisierungsansätzen zu finden und kausal zuordnen zu können (Kortüm et al., 2014; Goldstein et al., 2013).

Daraus resultiert die Erkenntnis, dass typische neurologische oder psychiatrische Störungsbilder heterogener Natur sind und auf komplexe ätiologische Ursachen zurückgeführt werden müssen. Genaue Kenntnis über spezifische Genveränderung erlaubt, ein besseres Verständnis für die molekulare Pathogenese und Pathophysiologie dieser Krankheiten zu bekommen. Für die „personalisierte Medizin“ bedeutet dies individuellere Therapieansätze, weniger Nebenwirkung und genetische Prädispositionen zu beachten (Gasser und Maier, 2017).

Damit hat sich die Humangenetik nicht nur in der Pränatal-Diagnostik etabliert, sondern auch in der Routineabklärung unklarer Entwicklungsstörungen und neuropsychiatrischer Krankheitsbilder.

Bisher waren es vor allem schwerwiegenderen Entwicklungsstörungen und unklare Retardierungssyndrome, die mittels konventioneller Methoden diagnostisch geklärt werden konnten. Zugrundeliegende Stoffwechselstörung oder andere seltene

Erkrankungen konnten damit von Umweltfaktoren und externen Risikofaktoren abgegrenzt werden (Straßburg, Dacheneder und Kreß, 2002).

Durch das geringe Auflösungsvermögen der bisherigen Techniken war die Aufklärungsrate gering. Auch konnten nur spezifische Veränderungen erfasst werden, da konventionelle Methoden zielgerichtet nur eine Region nach der anderen untersuchen können und dies mit sehr viel Zeitaufwand verbunden ist (Hochstenbach et al., 2009). Zahlenmäßige Veränderungen der Chromosomen oder größere strukturelle Verluste (Chromosomenstücke) oder Umbauten können so gut erkannt werden. Der Basenaustausch einzelner Nukleotide oder der Verlust bzw. die Verdopplung mehrerer Nukleotide ist jedoch der Sequenzierung vorbehalten. Damit können auch jene Mutationen erfasst werden, die in einem Gen liegen oder die regulatorischen DNS-Sequenzen betreffen und über unterschiedliche Genexpression zu Proteininstabilität führen (Alberts et al., 2012).

Die neuen Technologien ermöglichen damit auch ein Erfassen polygener Ursachen neuropsychiatrischer Krankheitsbilder, wie Autismus Spektrum Störungen (ASS), Tic-Störungen oder der Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und versuchen, ihre multifaktorielle Genese zu klären (Petek et al., 2001).

1.1 Epidemiologie und Relevanz

Humangenetische Untersuchungen sind für Entwicklungsabklärung in der Neuropädiatrie ebenso wenig wegzudenken wie aktuell in der Klärung neuropsychiatrischer Störungsbilder auf einer Jugendpsychiatrie.

Das Bemühen, Kindern mit Entwicklungsstörungen, kognitiven Beeinträchtigungen oder neuropsychiatrischen Krankheitsbildern entsprechende Hilfe zukommen zu lassen, hat zu unterschiedlichen Therapieansätzen geführt. Um diese effektiv umsetzen zu können, ist es notwendig die kausale Ursache zu kennen, lange Diagnosewege zu vermeiden und neue Therapiemöglichkeiten in Betracht zu ziehen. In der weiteren Beratung der Eltern gilt es bei familiärer Häufung einen möglichen Erbgang zu bedenken, um damit die Prognose und das Wiederholungsrisiko abschätzen zu können. Eine neue Mutation (*de novo*) kann Eltern durchaus entlasten, wenngleich auch keine Besserung damit zu erwarten ist. Mit der entsprechenden Diagnose ist nicht nur die Schuldfrage ausgeräumt – es können Förderungen

beantragt werden, entsprechende Einrichtungen und Behelfe durchgesetzt werden, oder teure Therapien beantragt werden.

Ätiologisch gelten Umweltfaktoren, Stress oder Infektionen während der Schwangerschaft und um die Geburt als Auslöser. Aber auch familiäres Auftreten und eine mögliche Vererbung werden bei der Entstehung von Entwicklungsstörungen und mentaler Beeinträchtigung diskutiert (Steinhausen, 2001).

Neben etablierten Vorsorgeprogrammen, wie dem Neugeborenen Screening können im Rahmen der umfassenden neuropädiatrischen Diagnostik bisher nicht erfasste Stoffwechselerkrankungen ausgeschlossen, aber auch seltene vererbare Erkrankungen in Betracht gezogen werden (Sperl und Karall, 2014). Die humangenetischen Methoden helfen so in der Früherkennung und Sicherung der Verdachtsdiagnose und vermeiden damit unnötige und aufwendige Untersuchungen, da bereits aus einer venösen Blutabnahme genügend DNS generiert werden kann, um daraus das gewünschte Ergebnis zu erzielen.

Eltern sowie Betroffene werden durch Diagnose und Prognose entlastet oder können über den Krankheitsverlauf besser aufgeklärt werden.

Gesundheitspolitisch ist ein allgemeiner Nutzen zu sehen. Moderne Untersuchungstechniken in der Humangenetik ermöglichen eine effizientere Diagnostik. Der technische Fortschritt und die Entstehung diverser Datenbanken ermöglicht zusätzlich, auf verschiedenen Ebenen Informationen über den klinischen Verlauf, aktuelle Forschungsergebnisse und neue therapeutische Anregungen zu erhalten.

Im Zusammenhang mit schweren Verläufen einzelner Störungsbilder, treten phänotypisch ähnliche, komorbide Symptome und neuropsychiatrische Erkrankungsbilder nebeneinander auf, sodass gemeinsame ursächliche Faktoren in der Entstehung diskutiert werden. Mit dem technischen Fortschritt fließen diese Fragestellungen nun öfters in den Untersuchungsalgorithmus mit ein.

1.2 *Persönlicher Zugang zum Thema*

In meiner langjährigen Tätigkeit an der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters habe ich zahlreiche Patienten/innen, Eltern und das

Helfersystem mit verschiedensten neurologischen und neuro-psychiatrischen Krankheitsbildern begleitet. Die Entwicklungsstörungen mit ihren sehr unterschiedlichen Ausprägungen von mildem Verlauf bis hin zu schweren Beeinträchtigungen im Alltagsleben stellen dabei eine große Herausforderung dar.

Von einer neuropädiatrischen Untersuchung erwartet das Umfeld eine rasche Klärung der zugrundeliegenden Ursache, eine prognostische Abschätzung des Krankheitsverlaufes und das Einleiten entsprechender Fördermaßnahmen.

Neben der klinisch-neuropädiatrischen Untersuchung, der laborchemischen Untersuchungen sowie der radiologischen Klärung struktureller Veränderungen, ist das Wissen um Erbgänge notwendig, um die Frage eines Wiederholungsrisikos beantworten zu können. In der Humangenetik ist nicht nur der/die betroffene Patient/in wichtig, das Interesse liegt auch bei der Familie und gehäuftem Auftreten von Symptomen mit unterschiedlicher Ausprägung (Schaaf und Zschocke, 2018).

Auf der Suche nach zugrundeliegenden Ursachen stehen eine **Vielzahl von humangenetischen Methoden** zur Verfügung. Mit der rasanten technologischen Entwicklung sind einzelne Vorteile dieser fast nicht mehr überblickbar. Der Umgang mit der Datenfülle wird zwar durch zahlreiche bioinformatische Programme geregelt, ihre Bedienung basiert jedoch auf dem Wissen um eine gemeinsame Terminologie und Qualitätskriterien. Für zusätzliche Informationen stehen diverse Suchprogramme, Datenbanken und bioinformatische Quellen zur Verfügung, deren Auswahl von klinischen Anfragen bis hin zu Primeranreicherung den zuweisenden Arzt/in zuweilen überfordern kann.

Die Verwendung der verschiedenen humangenetischen Methoden, der rasche technische Fortschritt bei den Untersuchungstechniken und ihre **bioinformatische Interpretation**, hat daher mein Interesse für dieses Thema geweckt.

Daraus resultiert die kritische Betrachtungsweise dieser Arbeit über eine Inanspruchnahme verschiedenster humangenetischer Methoden in Hinblick auf die klinische Fragestellung und ihre Ergebnisse sowie den technischen Errungenschaften in den letzten Jahren auf diesem Gebiet.

In dieser Arbeit wird der **Workflow vom Symptom zu Diagnose** kritisch betrachtet und die Vor- und Nachteile einzelner Methoden dabei erörtert.

Mit der Etablierung neuer Hochdurchsatzverfahren ist es nun möglich, viele Gene parallel zu untersuchen, womit es auch gelingt, selteneren und polygenen Ursachen nachzugehen.

Die hohe Prävalenz von **Entwicklungsstörungen im Vorschulalter** und die Bedeutung früher Interventionen für die weitere Entwicklung, erklärt auch die hohe Inanspruchnahme einer entsprechenden neuropädiatrischen Abklärung an der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters.

Vorangehende Screening - Untersuchungen im Rahmen der Mutter-Kind-Pass - Untersuchungen führen zu entsprechenden Zuweisungen oder über Anregung des Kindergartens oder der Schulbehörde.

Schwere Entwicklungsbeeinträchtigungen mit einer Hypotonie, neurologischen oder motorischen Defiziten, sowie progrediente Retardierungssyndrome werden bereits früh im Säuglingsalter erkannt und über die Pädiatrie erfasst und behandelt. Angeborene Stoffwechselstörungen werden über das Neugeborenen - Screening anhand auffälliger Stoffwechselformen einer Diagnose zugeführt.

Ein **späterer Erkrankungsbeginn** (late onset) oder auch juvenile Formen können jedoch zu verzögertem Auftreten und anfangs sehr unspezifischen Symptomen führen, welche unter anderem die sprachliche oder die kognitive Entwicklung betreffen. Somit zeigen sich mildere Verlaufsformen zumeist erst im Vorschulalter oder die Probleme treten erst in Zusammenhang mit dem Schuleintritt und einhergehenden Lernstörungen in Erscheinung. Nicht immer steht dabei die Entwicklungsverzögerung im Vordergrund – häufig sind die emotionalen Veränderungen und aggressiven Verhaltensweisen mit drohender Suspendierung aus dem Schulalltag, der Grund der Erstvorstellung an der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters.

Das **gemeinsame Auftreten von neurologischen Symptomen, psychiatrischen Auffälligkeiten** und Leistungsproblemen erschwert eine klare Vorgangsweise. Erst eine fundierte Anamnese, das Einholen der Informationen über Schwangerschaft- und Geburtsverlauf sowie der Familiengeschichte ermöglichen einen gezielten Verdacht. Die zeitliche Zuordnung der ersten Symptome, eine Verhaltensbeobachtung und die Kenntnis von Normvarianten erleichtern den Ausschluss von einander sehr ähnlich verlaufenden Krankheitsbildern. Das typische Manifestationsalter, spezifische

Symptomenkonstellationen sowie ihre topische Zuordnung bei neurologischen Ausfällen erlauben es, verschiedene Schlussfolgerungen zu ziehen und so externe Ursachen, prä- und perinatale Noxen als Ursachen einzugrenzen (Michaelis und Niemann, 1995).

Bei den ungeklärten Entwicklungsstörungen und familiär gehäuftem Auftreten sollte die Möglichkeit eines spezifischen Erbganges bedacht werden, aber auch bei unauffälligem Stammbaum ist eine neu aufgetretene Mutation nicht ausgeschlossen. Mit dem Einzug der neuen technischen Hochdurchsatzverfahren können auch mildere Verlaufsformen von Entwicklungsstörungen und neuropsychiatrische Krankheitsbilder durch molekulargenetische Methoden rascher und effizienter einer Ursache zugeführt werden.

1.2.1 Gliederung der Arbeit:

Diese Arbeit gliedert sich daher in den Theorieteil, der verschiedene humangenetische Methoden kritisch betrachtet. Der historische Verlauf der Humangenetik wird erwähnt und die rasante Entwicklung neuer Technologien und ihre bioinformatische Verarbeitung fließen ein. Die Errungenschaften der modernen Wissenschaften bietet jedoch nicht nur Vorteile. Neben zahlreichen pathogenen Varianten werden im Rahmen der genomweiten Screening Verfahren auch unbedeutende Veränderungen gefunden, die mit der aktuellen Krankheit gar nichts zu tun haben, oder erst im weiteren Verlauf eine Rolle spielen. Der Umgang mit sensiblen Daten über diverse Datenbanken oder bei der auswärtigen Erhebung in verschiedenen Speziallaboratorien birgt daher große Gefahren im Umgang mit diesen heiklen personenbezogenen Ergebnissen und mögliche Auswirkung auf die weitere Entwicklung. Daher wird vor allem bei der Diagnostik Minderjähriger auf das Gentechnikgesetz und die Datenschutzgrundverordnung hingewiesen.

Ein weiteres Kapitel wird einzelnen, seltenen Erkrankungen gewidmet, die als Ursache zahlreicher Entwicklungsstörungen gelten und ihre Überlappung mit neuropsychiatrischen Krankheitsbildern aufgezeigt (Petek et al., 2001; Sullivan und Geschwind, 2019).

Zugrundeliegende Mechanismen werden erörtert und es wird dabei auf entwicklungsbedingte und strukturelle Besonderheiten des Zentralnervensystems und seiner Netzwerke eingegangen. Mit den Ergebnissen aus dem Methodenteil wird dann

nochmals auf verschiedene molekulargenetische Methoden und ihre Verwendung eingegangen und anhand von einzelnen Beispielen und klinischen Verläufen erläutert. In der Diskussion und im Ausblick werden Methoden und Workflow kritisch betrachtet und auf die Möglichkeiten der Diagnostik von neuropädiatrischen und neuropsychiatrischen Krankheitsbildern hingewiesen.

2 Theoretischer Hintergrund

Im folgenden Kapitel werden allgemeine Definitionen und Hintergründe von Entwicklungsstörungen sowie neuropsychiatrischen Krankheitsbildern erläutert und die technologische Entwicklung der Humangenetik aufgerollt.

2.1 Entwicklungsstörungen

Die Beurteilung des Entwicklungsstandes ist ein wesentlicher Bestandteil einer neuropädiatrischen Untersuchung, die das Wissen um Normvarianten voraussetzt, und vor allem im Kindesalter deren Variabilität beachten sollte (Aksu et al., 2011; Speer und Gahr, 2018).

Unter der modernen Definition wird Entwicklung als jede Veränderung bezeichnet, deren morphologische, neurobiologische und genetische Basis durch die Umweltbedingungen und die Lebensspanne individuell mitgestaltet werden. Verschiedene Lebensbedingungen, Erfahrungen und Ziele der Menschen führen zu adaptiven Prozessen und erklären so die intraindividuelle Plastizität. Darauf beruht der therapeutische Ansatz der Entwicklungsförderung und Behandlung durch verschiedenste funktionelle Angebote oder pädagogische Interventionen.

Eine **Entwicklungsverzögerung** wird als Abweichung des Entwicklungsstandes von einer definierten Altersnorm bezeichnet, wobei die Möglichkeit besteht, diesen Entwicklungsrückstand durch entsprechende Förderung aufholen zu können.

Als **Entwicklungsstörung** gelten bleibende Beeinträchtigungen verschiedener Funktionsbereiche wie der Motorik, der Sprache, der Kognition und des Verhaltens und deren Abweichungen von definierten Normen.

Eine Förderung der Entwicklungsstörungen sollte daher möglichst früh ansetzen. Risikokinder, wie Frühgeborenen sollten möglichst präventiv oder über

Früherkennungsprogramme erfasst werden und nach systemischen Gesichtspunkten unter Einbeziehung von Angehörigen und Familie unterstützt werden (Akse et al., 2011). Die Art der Entwicklungsauffälligkeit führt hierbei zu unterschiedlichen Versorgungsbedürfnissen (Griebler und Nowotny, 2015).

Motorische, perzeptive, sprachliche und sozial-emotionale Entwicklungsauffälligkeiten treten häufig gemeinsam auf und sind durch primäre oder sekundärer Verhaltensänderungen schwer von kinder- und jugendpsychiatrischen Störungsbildern zu trennen.

Davon werden die Lernstörungen und Störungen schulischer Fertigkeiten als **umschriebenen Entwicklungsstörungen** abgegrenzt, die den motorischen und sprachlichen Bereich betreffen und auf schulischer Ebene berücksichtigt und gefördert werden (Alse et al., 2011).

In den Bereich der Verhaltens- und emotionalen Störungen mit Beginn in der Kindheit fallen die Hyperkinetische Störung mit einerseits sehr komplexem Erscheinungsbild oder komorbidem Auftreten anderer Krankheitsbilder mit ähnlichen Symptomen. Viele neuropsychiatrische Störungsbilder erfüllen daher die Kriterien der einen oder anderen Erkrankung. Psychiatrische Auffälligkeiten werden vorwiegend deskriptiv beschrieben oder über klinische Beobachtungen definiert und enthalten wenig objektive Kriterien (Sullivan und Geschwind, 2019).

Im Gegensatz dazu führen **tiefgreifende Entwicklungsstörungen** zu erheblichen Defiziten. Die Beeinträchtigung eines Kindes kann isoliert in verschiedenen Funktionsbereichen auftreten oder gemeinsam als **globale** Entwicklungsstörung in Erscheinung treten. Sind sie mit einer Intelligenzminderung vergesellschaftet spricht man von **intellektueller Behinderung** mit erheblichen Einschränkungen in der Leistungsfähigkeit und damit erschwerter Bewältigung des täglichen Lebens und der späteren Beschulung und Berufsintegration. Daraus resultiert nicht selten eine sekundäre Verhaltensstörung oder Interaktionsstörung durch die unangemessene Erwartungshaltung der Eltern in Bezug auf Fördermöglichkeiten (Akse et al., 2011).

Frühe Interventionen bei Entwicklungsstörungen mit schwereren Verläufen ist eine wesentliche Voraussetzung in der Arbeit mit Eltern Kindern und dem Umfeld. Leider können nur wenige Retardierungssyndrome, die mit einer Prävalenz von 2-3%

auftreten (Gijsberg et al., 2009), einer zugrundeliegenden Erkrankung zugeordnet werden.

2.2 Intellektuelle Beeinträchtigungen:

Im **DSM-5** wird unter intellektueller Entwicklungsstörung eine Einschränkung mentaler Fähigkeiten definiert, die in der frühen Kindheit entsteht und die adaptiven Fähigkeiten in sozialen und alltagspraktischen Bereichen umfasst. Die Prävalenz liegt bei einem Prozent (Falkai und Wittchen, 2015).

Im **ICD-10** wird die Intelligenzminderung als unvollständige Entwicklung geistiger Fähigkeiten verstanden, die mit einer Beeinträchtigung jener Fertigkeiten einhergeht, die zum Intelligenzniveau beitragen wie Sprache, Kognition und motorische Fähigkeiten. Zusätzlich kann eine Intelligenzminderung mit /ohne Verhaltensstörungen kodiert werden (Dilling et al., 2005). Beiden Klassifikationssystemen gemeinsam ist die Einteilung in eine leichte Beeinträchtigung mit einem Intelligenzquotienten bis 70, darunter wird eine mittlere intellektuelle Beeinträchtigung definiert, gefolgt von einer schweren und extremen intellektuellen Behinderung.

Zu einer **leichten intellektuellen Beeinträchtigung** zählt ein verzögerter Spracherwerb, der jedoch eine Konversation erreicht, die für die täglichen Anforderungen ausreicht.

Die Reifungsprozesse des Zentralnervensystems und der Einfluss der Umweltfaktoren auf die kindliche Entwicklung wird kontrovers diskutiert und führt auch zu unterschiedlichen Konzepten in der Betreuung dieser. Die Phasen der Hirnentwicklung durch Migration, Differenzierung und Pruning – damit einhergehenden Zeitfenstern mit vulnerablen Bereichen – erklären einerseits die Plastizität, aber auch die Sensibilität gegenüber neurotoxischen Faktoren und psychosozialen Umweltbedingungen. Genetische Prädisposition stehen epigenetischen, modulierenden Faktoren und adaptiven Fähigkeiten gegenüber. Forschungen fokussieren hierbei jene Gene, die an der Hirnreifung beteiligt sind oder die auf Transmitterebene fungieren. So wirken sich emotionale Wärme und elterliche Fürsorge positiv auf die Vernetzung der emotional regulierenden Hirnregionen aus, während Missbrauch und Vernachlässigung durch das psychosoziale Umfeld auch zu strukturellen Veränderungen führen können (Braus, 2014; Locke 1997).

Daraus leiten sich auch die möglichen Überlappungen zwischen neurologischen und psychiatrischen Symptomen einzelner Störungsbilder ab. Die funktionelle Konnektivität verschiedener Areale, ihrer Schnittstellen, Transmittersystemen und ihr Einfluss auf die höheren corticalen Funktionen erklären jedoch nicht allein die Defizite der Exekutivfunktionen und damit die schlechtere Schulperformance (Sullivan und Geschwind, 2019; Braus, 2014)

Gemeinsames Vorkommen verschiedener Symptome erschweren die Diagnose. Dabei können die primäre Symptomatik einer Lernstörung von den sekundären psychiatrischen Verhaltensweisen mit aggressiver oder verweigernder Haltung schwer abgegrenzt werden. Sprachstörungen können aus einer Hörbeeinträchtigung des peripheren Sinnesorgans resultieren, mit einer schweren Intelligenzminderung einhergehen oder bei Epilepsiesyndromen einen progredienten Verlauf zeigen und so die Prognose erheblich verschlechtern. Je komplexer das Erscheinungsbild, desto aufwendiger sind die notwendigen Untersuchungen, um eine entsprechende Verdachtsdiagnose zu erhärten und therapeutische Strategien rechtfertigen zu können.

Hereditäres Vorkommen bedeutet, man kennt eine ursächliche Mutation oder man beobachtet eine familiäre Vererbung (Hoefele, 2017). Für einige dieser Erkrankungen sind daraus bereits konkrete Therapieansätze gefunden worden. Andere profitieren durch das Wissen über die Stoffwechselwege von diätetischen Maßnahmen und somit können Komplikationen und Beeinträchtigungen verhindert oder hinausgezögert werden.

Das bessere Verständnis genetisch bedingter Erkrankungen der letzten Jahre hat einigen seltene Erkrankungen, den „orphan diseases“ wieder mehr Interesse zukommen lassen. Viele treten bereits im Kindesalter auf, einige manifestieren sich erst im Jugend- oder Erwachsenenalter. Nur vier Prozent der monogenen Erkrankungen werden nach dem 40. Lebensjahr manifest und etwa 70 Prozent der körperlichen und geistigen Behinderungen beruhen auf genetischen Ursachen (Speer und Gahr, 2018).

Einige seltene Erkrankungen werden im nächsten Kapitel daher genauer beschrieben.

2.3 Seltene Krankheitsbilder mit Beeinträchtigung der Entwicklung

2.3.1 Down Syndrom

Eine der bekanntesten seltenen Erkrankungen ist das **Down Syndrom**. Die Trisomie 21 zeigt neben einer Intelligenzminderung phänotypische Auffälligkeiten, die bereits in den ersten Lebenswochen oder schon pränatal über eine Fruchtwasseruntersuchung durch eine entsprechende genetische Untersuchung bestätigt werden können.

Das Ergebnis kann daher durch autosomale numerische Veränderung mit dem dreifach (triploid) anstatt physiologisch zweifach (diploid) vorhandenen Chromosom 21 in Erscheinung treten. Zu 95 Prozent kommt es als freie Trisomie vor und betrifft dabei alle Zelllinien. Bei einem Mosaik werden diese Veränderungen nur in wenigen Zellen gefunden und damit weisen diese Kinder einen mildereren Verlauf auf.

Eine der wenigen vererbaren Möglichkeiten besteht bei der Translokationstrisomie (14;21) oder (21;21). In zwei Prozent der Fälle tritt diese Robertson'sche Translokation akrozentrischer kleiner Chromosomen auf und bedeutet damit auch ein erhöhtes Risiko für die Nachkommen. Ihr Nachweis gelingt oftmals nicht allein durch das konventionelle Karyogramm. Neben lokusspezifischen FISH-Sonden kann auch die Array-Technik in der Detektion hilfreich sein.

Die häufigste Ursache numerischer Chromosomenstörungen wird mit der Fehlverteilung in der Meiose erklärt, gefolgt von einer postzygotischen „non - disjunction“. Als weitere überlebensfähige autosomale Trisomien gelten das Edwards-Syndrom und das Patau-Syndrom, sowie gonosomale Chromosomenaberrationen. Diese werden daher in der Pränataldiagnostik (13,18,21, X, Y) berücksichtigt (Murken et al, 2017; Speer und Gahr,2018).

2.3.2 Phylketonurie PKU

In der Gruppe der kongenitalen Stoffwechselerkrankungen gilt die Phenylketonurie (PKU) als eine der häufigsten autosomal rezessiven Erkrankungen des Neugeborenenalters. Angeborenen Stoffwechselerkrankungen führen über fehlende Enzyme, ihre Kofaktoren oder Transportproteine zu Störungen der Biosynthese oder dem Abbau von Stoffwechselprodukten. Symptome entstehen durch Ablagerung dieser toxischen Metaboliten in verschiedenen Organsystemen oder dem Mangel an essentiellen Produkten (Sperl und Krall, 2014; Karall und Scholl-Bürgi, 2017).

Bei der Phenylketonurie führt eine Punktmutation am Chromosom 12 (12q 22-24) kommt es zu einer Veränderung des Gens, das für das Enzym PAH (Phenylalaninhydroxylase) kodiert. Daraus resultiert ein gestörter Abbau und eine erhöhte Ansammlung von Phenylalanin im Körper, was unbehandelt zu schwerer geistiger Behinderung durch eine gestörte Hirnentwicklung führt. Daraus resultieren die neurologischen Auffälligkeiten wie ein ataktisches Gangbild oder die Entwicklung einer Epilepsie. Bei den zusätzlichen Verhaltensauffälligkeiten wie Aggressivität, Erregungszuständen und Selbstverstümmelungen spielen die Stoffwechselinteraktion mit der körpereigenen Neurotransmitterbildung von Serotonin und Dopamin eine Rolle. Rechtzeitiges Erkennen im Neugeborenenalter und eine lebenslange eiweißarme Diät kann dies verhindern (v. Dahl und Strohmeyer, 2006).

2.4 Neuropsychiatrische Krankheitsbilder mit Beeinträchtigung der kognitiven und sozialen Entwicklung

Neben seltenen genetischen Erkrankungen und der syndromalen Suche, nach unklaren Behinderungen fließen auch **neuropsychiatrische Störungen**, bei der Suche nach zugrundeliegenden Ursachen und Wahl der Kandidaten-Gene und Methoden mit ein.

Diese können gemeinsam mit einer Intellektuellen Beeinträchtigung vorkommen und benötigen bei Kindern mit ADHS durch ihre Lernstörungen und Defizite in den exekutiven Funktionen eine geförderte Schul- und Berufsintegration im Vergleich zur Peergruppe. Hingegen benötigen Sprachentwicklungsstörungen und Defizite in der Kommunikation einer Autismus Spektrum Störung auch Unterstützung in der Beziehungsgestaltung durch gezieltes Sozialtraining.

Daher werden diese im **DSM-5**, dem Diagnostischen und Statistischen Manual psychischer Störungen, zu den Störungen der neuronalen und mentalen Entwicklung zusammengefasst. Unter diese auch intellektuelle Beeinträchtigungen, die Kommunikationsstörungen und Lernstörungen sowie die Entwicklungsstörungen der Motorik fallen (Falkai und Wittchen, 2015).

Auch im **ICD 10**, der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme werden autistische Auffälligkeiten ebenfalls zu den Entwicklungsstörungen gezählt, während die Aufmerksamkeitsstörung (ADHS)

hingegen zu den Verhaltens- und emotionalen Störungen mit Beginn in der Kindheit und Jugend zählt (Dilling et al., 2005).

2.4.1 Autismus Spektrum Störung (ASS)

Nach den Kriterien des DSM-5 weist damit die Autismus-Spektrum-Störung eine mangelhafte soziale Kommunikation und Interaktion mit Beeinträchtigung der Sprachentwicklung in sehr variablem Ausmaß auf. In der Beziehungsgestaltung fehlt diesen Kindern und Jugendlichen die soziale Empathiefähigkeit auch auf nonverbaler Ebene, außerdem zeigen sie Defizite in der Beziehungsgestaltung und Aufrechterhaltung dieser. Zusätzlich zeigen die Betroffenen unterschiedliche Ausprägungen von Verhaltensstereotypen, die sich im Laufe der Entwicklung in Abhängigkeit von den intellektuellen Fähigkeiten und des erreichbaren Sprachniveaus verändern. Schwer beeinträchtigte Kinder werden nach dem ICD 10 daher unter tiefgreifender Entwicklungsstörung zusammengefasst und in einen frühkindlichen Autismus (F84.0), einen atypischen Autismus (F84.1) und das Asperger-Syndrom (F84.5) unterteilt.

Da die Kernsymptome in Alter und Zeitpunkt des Auftretens variieren und eine sehr große individuelle Schwankungsbreite zeigen, äußern sie sich im Falle eines „high functioning autism“ oftmals erst mit Verhaltensauffälligkeiten, Beziehungsproblemen oder Lernstörungen im Schulalltag.

2.4.2 Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS)

Nach Falkai und Wittchen (2015) gilt ADHS im DSM-5 als Entwicklungsstörung, die durch Unaufmerksamkeit, desorganisiertes Verhalten und Impulsivität definiert ist.

Einige Symptome sind bezogen auf Alter und Entwicklungsstand übermäßig ausgeprägt und gehen auch mit anderen externalisierenden Störungsbildern einher, wie das oppositionelle Trotzverhalten.

Einzelne Ausprägungen wie die erhebliche Unaufmerksamkeit und mangelnde Daueraufmerksamkeit halten bis in das Erwachsenenalter an und bedeuten Einbußen der schulischen Leistungen trotz durchschnittlicher Intelligenz und Beeinträchtigung im beruflichem Funktionsniveau.

Im ICD-10 treten Hyperkinetische Störungen sehr früh auf und zeigen sich schon im Vorschulalter mit einer mangelnden Ausdauer bei Beschäftigungen, die hohe Konzentration und kognitive Fähigkeiten erwarten. Jüngere Kinder zeigen wechselndes Spielverhalten und unkontrollierbare, überschießende Aktivität. Neben der Ruhelosigkeit werden hohe Ablenkbarkeit beobachtet, motorische Phänomene wie „Zappeln und Wackeln“, sowie das Missachten sozialer Regeln werden als problematisch erlebt (Dilling et al., 2005).

Um die komplexen Ursachen verschiedener neuropsychiatrischer Störungen zu finden, sind verschiedene Modelle entstanden, die über GWAS (genom-wide association study), genomweite nach SNP oder CNV forschen. Während diese Assoziationsstudien nach häufigen und gemeinsamen Veränderungen suchen, wurden zuletzt auch Strategien nach Neumutationen entwickelt. In ihrem Review Artikel schreiben Sullivan und Geschwind (2019) auch seltenen und kleinen Varianten eine große biologische Bedeutung zu, wie zuletzt ihr Einfluss auf die antipsychotische Medikation.

Die gezielte Suche nach spezifischen Veränderungen einzelner Krankheitsbilder wird einerseits über das Vorkommen vieler gemeinsamer Gene in zwei oder mehr Krankheitsbildern erschwert.

Andererseits ist auch die Objektivität nur bedingt gegeben, da psychiatrische Störungen vorwiegend über deskriptive Eigenschaften definiert. Außerdem ist ein genetisches Risiko von Einflüssen aus Erziehung und Umwelt nur schwer abgrenzbar.

Im folgenden Kapitel werden die Möglichkeiten humangenetischer Methoden beschrieben, mit denen man nach den zugrundeliegenden genetischen Veränderungen aber auch nach gemeinsamen funktionalen Regelkreisen sucht, um damit die überlappenden phänotypischen Erscheinungsbilder besser verstehen zu können.

3 Humangenetische Methoden

Unter **diagnostisch genetische Untersuchungen** fallen jene Methoden, die zur Abklärung einer bestehenden klinischer Symptomatik dienen.

Als **prädiktive Diagnostik** gilt die Untersuchung klinisch gesunder Patienten/innen auf hereditäre Erkrankungen (Hoefele, 2017; Henn 2005) während die Möglichkeit, Erkrankungen bereits vorgeburtlich im Rahmen der **Pränataldiagnostik** auszuschließen, ethisch kontrovers diskutiert wird und nur bei einem Risiko für ein definiertes genetisches Leiden sinnvoll erscheint und einer Indikation bedarf (Murken et al., 2017).

Die enorme Entwicklung in der Humangenetik hat in den letzten Jahren eine Vielzahl von neuen Techniken hervorgebracht und damit neue Möglichkeiten in der Aufdeckung von unklaren Retardierungssyndromen und deren zugrundeliegende Pathomechanismen eröffnet. Einige dieser Hochdurchsatzverfahren (NGS) in der DNS-Analyse zählen für spezifische Fragestellungen bereits zur Routine. Mit der Sequenzierung des gesamten Exoms können sehr effizient alle proteinkodierenden Abschnitte dargestellt werden und ein Großteil der vielversprechenden kausalen Genveränderungen aufgezeigt werden (Zech et al., 2019).

Um die Errungenschaften der Humangenetik verstehen zu können, sind die Meilensteine der Genetik eine wesentliche Grundlage.

3.1 Historische Entwicklung der Genetik

Ihre Anfänge reichen weit in die Vergangenheit auf die Mendel'schen Erbgelien zurück. Der Augustinermönch Gregor Mendel hat 1865 mit der Kreuzung der Erbsen im Klostersgarten den Grundstein der Vererbung definiert. Rezessive oder dominante Merkmale bilden die Grundlage für die Weitergabe seltener monogener Erkrankungen, den „orphan diseases“. Zu diesen zählen unter anderem die angeborenen Stoffwechselerkrankungen, deren Enzymdefekte in fast einem Prozent der Fälle mit Entwicklungsstörungen oder mentaler Behinderung einhergehen und in Einzelfällen durch entsprechende Diät oder Enzymersatztherapie behandelbar sind.

Bei Neugeborenen aus konsanguiner Ehe oder einem Stammbaum, der auf spezifischen ethnischen Hintergrund hinweist, treten autosomal-rezessive Erkrankungen deutlich häufiger in Erscheinung (Moog, Hoffmann und Zschocke, 2009; v. Dahl, Wendel und Strohmeier, 2006; Sperl und Krall, 2014). Mit der Erweiterung des Neugeborenen Screening durch die Tandem-Massenspektrometrie 2002 werden

eine Reihe seltener, zumeist behandelbarer Stoffwechselerkrankungen der Aminosäuren, organischen Säuren und Fettsäuren bereits im Neugeborenenalter erfasst (v. Dahl et al., 2006; Sperl und Krall, 2014).

Jahrzehnte früher bekam Charles Darwin 1859 mehr Interesse für sein Werk aus der Evolutionstheorie über die Entstehung der Arten. 1909, viele Jahre später erkannte der Arzt Archibald Garrod die Zusammenhänge von familiären Erkrankungen und der Weitergabe von Merkmalen an die nachkommende Generation.

Zu den Erkenntnissen der Vererbung einzelner Merkmale kam erst 1953 durch Francis Crick und James Watson die Entdeckung der Doppelhelix-Struktur der DNS hinzu, jenem Riesenmolekül in dem die Erbinformation gespeichert war.

Ende des 19. Jahrhunderts beschrieb Walter Flemming die Bedeutung des Zellkernes für die Vererbung. Durch Färbung konnte er die Verdopplung und Teilung der Chromosomen darstellen.

1956 korrigierte der amerikanische Wissenschaftler J. Tijo die Zahl der menschlichen Chromosomen auf 46.

Ein enormer Durchbruch gelang 1961 Nirenberg durch die Erkenntnis, dass je drei Basen der DNS für eine Aminosäure kodieren und ihre Aneinanderreihung den Code für die Proteinsynthese ergibt.

Darauf basiert auch die Sequenzanalyse von Friedrich Sanger 1977. Die Entdeckung der Basenabfolge der DNS gilt als Grundlage für die Analyse von Genstrukturen, ihrer Expression und molekularen Veränderungen und dient als Grundstein für weitere technologischen Entwicklungen.

Dennoch gilt die Sanger Sequenzierung weiterhin als wichtige Errungenschaft für die Untersuchung bekannter Genveränderungen.

Um die weiteren rasanten Entwicklungen gewährleisten zu können hat die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) wesentlich beigetragen, die es ermöglicht aus einer geringen Ausgangsmenge DNS in kurzer Zeit eine vielfache Menge an Erbmaterial zur weiteren Analyse bereit zu stellen. Diese von Mullis 1983 verbesserte Methode der Molekularbiologie stellt heute weiterhin eine wesentliche Möglichkeit der quantitativen Bestimmung dar.

Bereits 1990 startete, das HUGO (**Human Genom Projekt**) mit der Entschlüsselung des gesamten menschlichen Erbgutes, das **2003** vollendet wurde. Aus diesem

Forschungsprojekt resultiert das Wissen, dass nur ein geringer Anteil des menschlichen Genoms für die Proteinkodierung verantwortlich ist, das Exom.

98 Prozent des Erbgutes, somit der überwiegende Anteil, bestehen aus repetitiven Sequenzen und Regulatoren, den Intron-Bereichen. Seither hat sich die Humangenetik rasant weiterentwickelt und bietet zahlreiche Möglichkeiten in der klinischen Diagnostik mit immer höheren Durchsatzraten und damit rascheren und kostengünstigeren Analysen.

Ein Anwendungsbereich dieser modernen NGS Techniken liegt in der Suche nach seltenen Erkrankungen, deren hereditäre Ursache auf einzelne Gene zurückzuführen ist, die den Mendel'schen Erbgeln folgen und dominant oder rezessiv vererbt werden. Obwohl diese **seltene Erkrankungen** nur in geringer Prävalenz von 5/10.000 auftreten, betreffen sie jedoch ein nicht so geringes Patientenkollektiv, das von einer personalisierten Therapie durchaus profitieren kann.

Dabei handelt es sich vorwiegend um neurologische Erkrankungen mit sehr unspezifischen Symptomen.

Selbst Spezialisten gelingt es schwer, konkrete Ursachen dafür zu nennen. Für ihre ätiologische Klärung ist eine umfassende Analyse mehrerer in Frage kommender Gene notwendig und ein WES (whole exome sequencing) der proteincodierenden Abschnitte des Genoms ist trotz Kosten durchaus klinisch indiziert.

Damit gelingt es auch sehr allgemeinen Symptome wie Bewegungsstörungen, Epilepsien oder Entwicklungsdefizite einer neurologischen Krankheitsentität zuzuordnen, obwohl zahlreiche Mutationen oft zu identischen Krankheitsbildern führen.

Die durchschnittliche Detektionsrate bei WES liegt etwa bei 30 Prozent, in Abhängigkeit vom Untersuchungsdesign und sinkt mit Ausweitung der Indikationen und Zahl der potenziellen Mutationen (Zech et al., 2019).

Daraus leiten sich auch mögliche Überlappungen zu neuropsychiatrischen Erscheinungsbildern ab, wobei mit einer umfassenden WES Untersuchung alle potenziellen molekularen Varianten erfasst werden können. Trotz sinkender Kosten muss die **Indikationsstellung im Einzelfall** geprüft werden und eine positive Familienanamnese, ein früher Erkrankungsbeginn oder schwere komplexe Manifestationen bestehen.

Welche Untersuchungen sollen aber in welcher Reihenfolge erfolgen, auf welche kann bereits verzichtet werden und wann soll dabei ein „Whole Exom“ (alle kodierenden

Abschnitte) trotz hoher Kosten überlegt werden. Denn damit können auch jene Varianten detektiert werden, die in der Literatur bereits mit einem entsprechenden Krankheitsbild assoziiert sind oder neue, unklassifizierte Varianten entdeckt werden. Bei konkreter Fragestellung und klinischer Eingrenzung der Verdachtsdiagnose werden mit den modernen Hochdurchsatzverfahren die häufigsten Kandidatengene über eine Paneluntersuchung durchgeführt. In enger Kooperation zwischen Klinikern und der Humangenetik gelingt es, diese Schritte kosteneffizient zu erarbeiten. In Einzelfällen, bei familiär gehäuften Auftreten oder sehr aufwendiger Beratung durch eine Vielzahl an möglichen verursachenden Genen, kann auch eine direkte Überweisung an die Humangenetik Sinn machen.

Im Folgenden Kapitel werden jene Untersuchungsmethoden vorgestellt und kritisch betrachtet, die eine wichtige Rolle im klinischen Setting und der Abklärung häufiger neuropädiatrischer - und jugendpsychiatrischer Krankheitsbilder spielen.

3.2 Konventionelle zytogenetische Untersuchungen

Die klassische Zytogenetik nimmt ihren Ursprung mit der Bestimmung der Chromosomenzahl durch die schwedischen Wissenschaftler, Tijo und Levan im Jahr 1956. Die ersten chromosomalen Veränderungen konnten lichtmikroskopisch erkannt werden, seither hat sich deren Auflösungsvermögen deutlich erhöht. Zytogenetisch lassen sich damit die Struktur und Zahl der Chromosomen erkennen, sowie zugehörige Vererbungsmechanismen (Zschoke und Schaaf, 2018).

Aus Lymphozyten im Blut oder Fibroblasten der Haut kann die Zellteilung mittels Kultur angeregt werden und in der Mitose in der Metaphase arretiert werden. Mit verschiedenen Färbetechniken kann das Bandenmuster einzelnen Chromosomen zugeordnet werden. Die paarweise Anordnung sowie ihre Aufteilung entsprechend ihrer Größe und Lage des Zentromers wird mittlerweile durch eine Software unterstützt durchgeführt. Die morphologische Beschreibung der Chromosomen erfolgt in Anlehnung an die Denver Klassifikation (Roche Lexikon Medizin, 2003).

Somit gilt die zytogenetische Karyotypisierung als historisch älteste Methode in der Diagnostik von Entwicklungsstörungen und war so lange Zeit auch effektiv und

zielführend, da mikroskopisch sichtbare Veränderungen des Erbmateriales zumeist sehr komplexe syndromale Erkrankungen hervorrufen.

Zahlreiche Erkrankungen, die mit Entwicklungsverzögerungen vergesellschaftet sind, werden damit jedoch nur unzureichend erfasst. Idiopathische Epilepsien hingegen zeigen wesentlich seltener chromosomale Veränderungen oder nur in 8-9 Prozent Kopienzahlveränderungen, generalisierte Epilepsien sogar in weniger als nur zwei Prozent. Daher spielen zytogenetische Methoden in der Analyse von unklaren Entwicklungsstörungen eine eher untergeordnete Rolle (Henley und Lemke, 2015).

3.2.1 Karyogramm

Als Karyogramm werden so die 22 Autosomen Paare und das Gonosomen Paar, der Chromosomenbestand einer einzelnen Zelle, dargestellt. Zahlenmäßige Veränderungen sowie größere strukturelle Umbauten lassen sich damit in 3 Prozent der Fälle mikroskopisch gut erkennen. Strukturelle Veränderungen mit balancierten Aberrationen, chromosomale Veränderungen mit Zugewinn oder Verlust von Chromosomenmaterial können in ca. 0,5 Prozent bis zu einer Auflösung von 5-10 Mb (Megabasen) dargestellt werden (Henley und Lemke, 2015).

In der Pränatal-Diagnostik können damit die häufigsten numerischen Aberrationen wie Trisomien (13,18,21, X, Y) ausgeschlossen werden und auch Mosaik (Vorkommen in nicht allen Zell-Linien) erkannt werden.

Nur wenige dieser Veränderungen sind überlebensfähig. Die bekannteste zahlenmäßige Veränderung des normalen Chromosomensatzes von 46 Chromosomen, ist die Trisomie 21. Mit dreifachem Vorkommen des Chromosoms 21 gilt das **Down Syndrom** als bekannteste Ursache schwerer Entwicklungsstörungen.

Folgende Abbildung zeigt das Karyogramm eines Down Syndrom (47, XY), während Abbildung 2 dies in Form einer Translokationstrisomie (46, XY) t (21;21) darstellt.

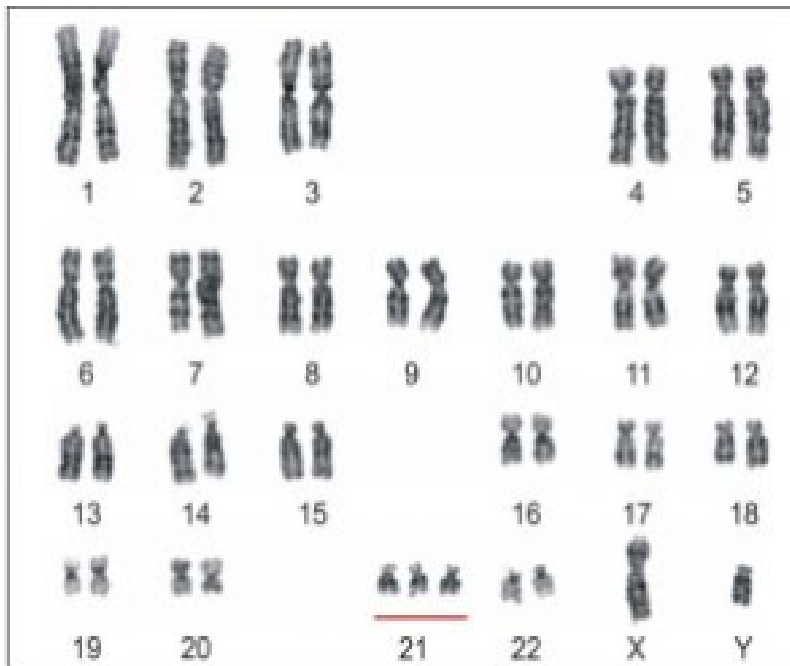


Abbildung 1: **Karyogramm** eines männlichen Patienten mit **Trisomie 21** (nach Dundar M, Uzak AS, Erdogan M, Akbarova Y. Prediction, prevention and personalisation of medication for the prenatal period: Genetic prenatal tests for both rare and common diseases EPMA J.2011 Jun 2(2):181-195)

Numerische Veränderungen können als Polyploidie den ganzen Chromosomensatz betreffen oder bei Aneuploidie einzelne Chromosome betreffen – sowohl Autosomen als auch Geschlechtschromosomen (Murken et al., 2017).

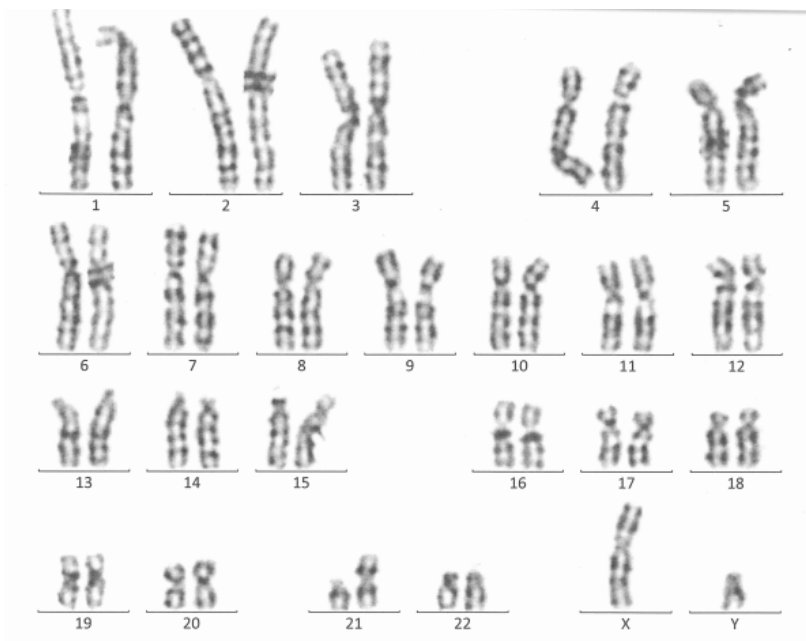


Abb. 2: **Trisomie 21 „Karyogramm 1“** aus dem ULG Lehrgang „Medizinische Genetik“ der Humangenetik Graz 2017-2019.

3.2.2 FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung)

Eine etwas höhere Auflösung und der Darstellung von Chromosomensegmenten gelingt bereits mit der FISH Untersuchung, die damit bereits zu den molekulargenetischen Methoden überleitet (Murken et al., 2017; Zschoke und Schaaf, 2018). Diese Methode ist nicht allein an die Metaphase gebunden und kann damit sehr rasch bereits an Interphasenkernen innerhalb von 48 Stunden ohne vorherige Kultivierung erfolgen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können spezifische Fish-Sonden nachgewiesen werden. Da sich die DNS im einzelsträngigen Zustand an komplementäre FISH-Sonden (fluoreszenzmarkierte spezifische Chromosomenabschnitte) anlagert, können die Fluoreszenzsignale direkt oder mittels Antikörper sichtbar gemacht werden und somit erkannt werden. Diese Sonden werden kommerziell auf bestimmte Bereiche der Chromosomen oder Genorte zugeschnitten oder einem ganzen Chromosom farbig zugeordnet. Damit kann schnell und ohne Kultur eine genomweite Darstellung mit höherer Auflösung erfolgen und strukturelle oder numerische Veränderungen dargestellt werden. Ihre Aufklärungsrate ist jedoch auf vordefinierte Sondenbereiche und chromosomale Abschnitte beschränkt und wird aktuell zur Bestätigung vorangehender Ergebnisse und Bruchpunktlokalisationen verwendet.

Veränderungen, die außerhalb des Sondenbereiches liegen, werden so nicht detektiert. Anzahl und Qualität der gewonnenen Zellen sind für das Ergebnis maßgebend, ebenso eine konkrete Verdachtsdiagnose für die Eingrenzung des Sondenbereiches.

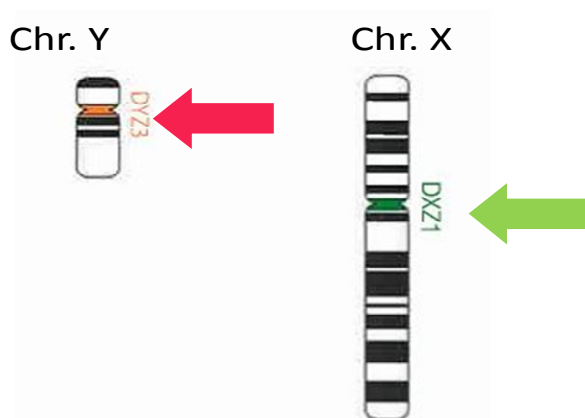


Abb.3: **FISH-Bild 2** zugehörige **FISH-Sonde**, mit freundlicher Genehmigung von Monika Artl D&F Institut für Humangenetik, Medizinische Universität Graz.

Bei den Sonden unterscheidet man chromosomenspezifische Zentromer-Sonden zum Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen aus der Interphase oder chromosomenspezifische Sonden (WCP - Whole Chromosom Paint) zur Erfassung von Translokationen oder Insertionen, sowie lokusspezifische Sonden für die Darstellung von bestimmten Chromosomensegmenten im Metaphasekern (Deletionen, Duplikationen oder Translokationen). Unterschiedliche Sonden und verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe werden beim M-FISH (Multicolor FISH) verwendet, aber auch die Banden können über diese Methode detaillierter dargestellt werden.

Ein Beispiel hierfür zeigen folgende Abbildungen einer FISH-Sonde und dem zugehörigen FISH-Bild mit numerischer Aberration der Geschlechtschromosomen 47, XYY), dem Klinefelter-Syndrom.

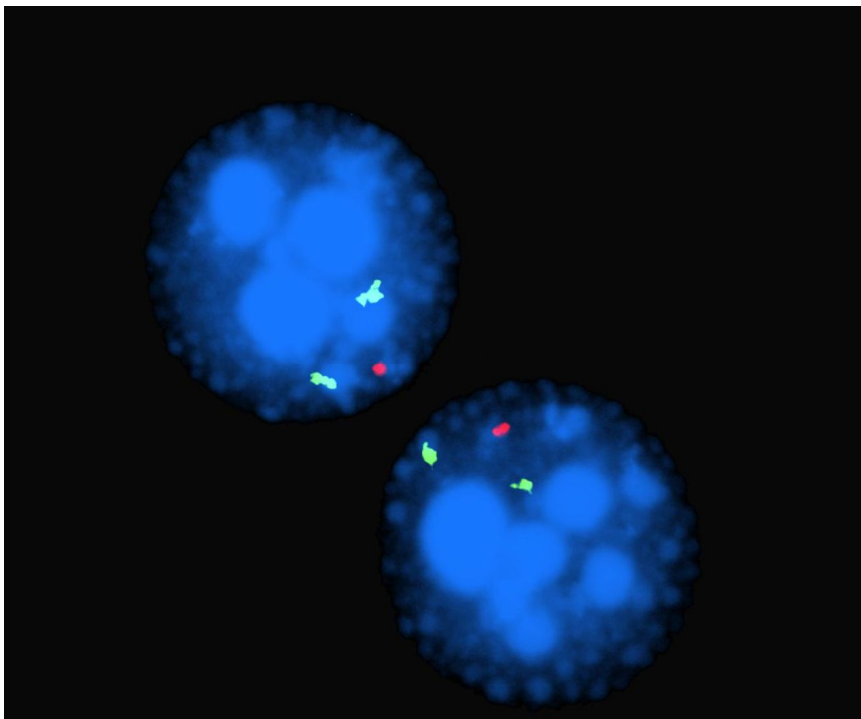


Abb. 4: **FISH-Bild 2**, mit freundlicher Genehmigung von Monika Artl D&F Institut für Humangenetik, Medizinische Universität Graz.

Das **Klinefelter-Syndrom** 47 XXY, ist durch ein überzähliges X-Chromosom beim männlichen Karyotyp definiert und kommt mit einer Inzidenz von 1:1000 bei männlichen Neugeborenen vor (Murken et al., 2017).

Klinisch weisen die Patienten eine Intelligenzminderung auf, eine Genitalhypoplasie und grobe Gesichtszüge. Im Kleinkindalter überwiegt der Entwicklungsrückstand, sehr

früh zeigt sich ein Hochwuchs. In der Adoleszenz kommt es zu einer Stammfettsucht und die hormonellen Veränderungen, welche mangelnde Libido und Potenz, sowie eine Azoospermie erklären. Problematisch sind die einhergehenden psychiatrischen Verhaltensauffälligkeiten mit Neigung zu Aggression (Speer und Gahr, 2018).

3.3 Molekulargenetische Methoden

Ihr Ziel ist das Finden krankheitsverursachender Sequenzveränderungen der DNS, von Kopienzahlvarianten (CNV – copy number variations) bis hin zu Punktveränderungen, den sogenannten SNP (Single nucleotide polymorphism).

Eine wesentliche Errungenschaft für die Entwicklungsdiagnostik ist damit der Array Technik (vergleichende genomische Hybridisierung) gelungen, die je nach Plattform und kommerziell erwerbbar Chip auf einem sehr hohen Auflösungsvermögen beruht (Hochstenbach et al., 2009).

Ihr Vorteil gegenüber konventionellen Methoden liegt in der genomweiten Suche nach pathogenen Varianten und dem Wegfall der langen Kultivierungszeit und deren zahlreichen Artefakten.

Die Array-Technik bietet bereits die Möglichkeit das gesamte Genom auf gängige Veränderungen, den **Mikrodeletions- und Duplikationssyndromen** im submikroskopischen Bereich zu untersuchen - diese gelten als häufigste Ursachen unklarer schwererer Entwicklungsstörungen. In 15-25 Prozent lässt sich damit eine kausale Ursache finden. Einzelne CNV werden jedoch als Variabilität gesehen, deren Einfluss auf bestimmte Erkrankungen noch unklar bleibt (Murken et al., 2017).

3.3.1 Array-CGH (Vergleichende genomische Hybridisierung)

Kinder mit mentalen Retardierungssyndromen, Entwicklungsverzögerungen, Dysmorphiestigmata oder aus dem Bereich der Autismus Spektrum Erkrankungen können nur schwer einem bekannten Störungsbild zugeordnet werden. Zugrundeliegende strukturelle chromosomale Aberrationen werden je nach Größe von einer konventionellen Methode oder durch Analyse der Subtelomerbereiche bis zu 5 Mb gut erfasst.

Submikroskopische Veränderungen (<5 Mb) mit dem Fehlen definierter Chromosomenabschnitte von wenigen Megabasen, werden durch die geringe Auflösung konventioneller Chromosomendiagnostik nicht erfasst. Um daher Gendosisveränderungen des gesamten menschlichen Genoms zu erfassen hat sich die Array Technik etabliert. Ihre Anwendung in der Diagnostik von mentaler Retardierung, unklaren Entwicklungsstörungen mit oder ohne Fehlbildungen hat in den letzten Jahren neue Mikrodeletions- und Duplikationssyndrome definiert und zuletzt auch Störungen aus dem autistischen Formenkreis über Kopienzahlveränderungen erfasst. Damit hat die Array CGH die Zytogenetik weitgehend verdrängt, wenngleich balancierte Veränderungen damit nicht erfasst werden. Ihr routinemäßiger Einsatz bei submikroskopischen Imbalancen vieler kindlicher Retardierungssyndrome aber auch von neuropsychiatrischen Krankheitsbildern zeigt mittlerweile eine Aufklärungsrate von 10-15 Prozent, in Abhängigkeit von der verwendeten Plattform und dem Auflösungsvermögen (O`Byrne et al, 2016). Dennoch können nicht alle gefundenen Symptome, die durch sehr unterschiedliche Verluste oder Zugewinne von chromosomalem Material verursacht werden, einem spezifischen Syndrom zugeordnet werden.

Man unterscheidet die CGH oder **vergleichenden Hybridisierung**, bei der einzelsträngige DNS- Proben von Patienten/innen und Kontrollproben unterschiedlicher Färbung miteinander verglichen werden von der Kombination mit der Array Technik (Array CGH) und der **SNP-Array Diagnostik**, die nach Einzelnukleotid Polymorphismen (SNP) sucht. Über die Verwendung von zwei Sonden werden beide Allelen abgedeckt und so können auch homozygote von heterozygoten Veränderungen abgegrenzt werden (Hoeflerle, 2017).

Mit dieser Microarray-Technologie kann eine Auflösung des menschlichen Genoms bis zu 10 Kb(Kilobasen) erzielt werden.

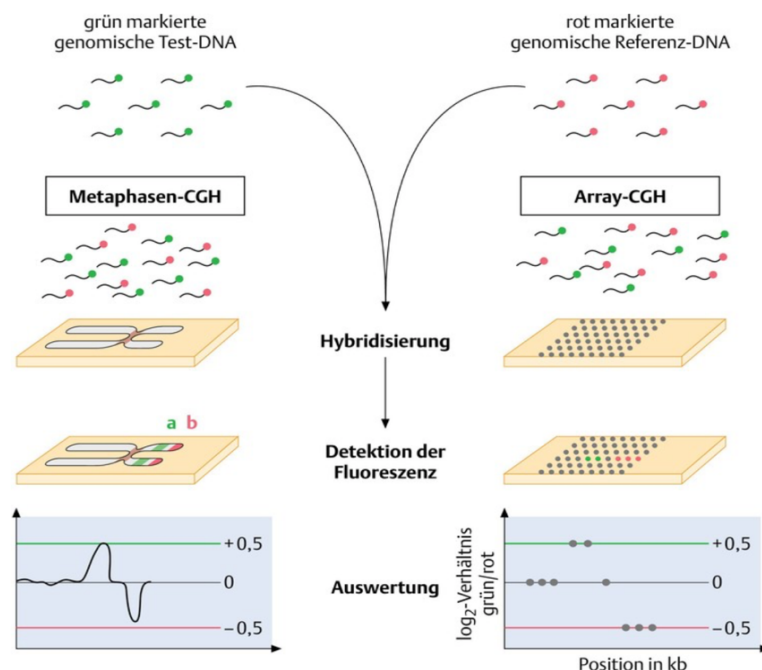
Bei der **Array-CGH Technik** erfolgt die Hybridisierung der amplifizierten DNS Fragmente an einem Mikroarray. Dabei werden kurze Oligonukleotid-Sonden auf einem Glasobjektträger aufgebracht, die entweder das ganze Genom repräsentieren oder für gezielte Genregionen eingesetzt werden. Daran können die DNA-Probe und die Referenz-DNA kompetitiv hybridisieren.

Genomische Regionen die überrepräsentiert sind werden als Zugewinn der Kopienzahl interpretiert und Regionen, die farbärmer dargestellt werden als Verlust (Deletion). Die Auswertung der an Oligonukleotide gebundenen Fragmente und ihre Fluoreszenzintensität, lässt sich im Fluoreszenzmikroskop über ihre Signalstärke quantifizieren und mittels Softwareunterstützung grafisch und mathematisch darstellen (Murken et al, 2017).

Damit lassen sich kleinere Veränderungen von weniger als 100 Kb gleichzeitig identifizieren ohne vorherige Vermutung einer bestimmten Veränderung oder einer bestimmten Region.

Man bezeichnet diese Methode auch als **molekulare Karyotypisierung**, die mit hoher Auflösung und je nach Anbieter, bereits sehr kleine Kopienzahlveränderungen erkennt, nicht aber balancierte Umstrukturierungen, wie Translokationen oder Inversionen. Ohne Notwendigkeit einer Zellkultur kann diese relativ zeitsparend erfolgen. (Heyne und Lemke, 2015).

Das Prinzip der vergleichenden Hybridisierung (CGH) wird in folgender Abbildung dargestellt.



→ Region a ist in der Test-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA überrepräsentiert, Region b dagegen ist unterrepräsentiert.

Abb.5: **Array Technik** Vergleichende Genomische Hybridisierung von Referenz DNA und Probe auf Microarray aus dem Taschenlehrbuch der Humangenetik von Murken et al., 2017, S162.

An der **Humangenetik Graz** erfolgen die Untersuchungen mittels Array Technik über einen kommerziell erhältlichen DNA-Chip mit ca. 60.000 Oligonukleotiden, der das Genom mit einer Auflösung von 124,5 Kb abdeckt, wie aus zahlreichen Befunden herauszulesen ist.

Bei der Interpretation der gefundenen Kopienzahlveränderungen werden verschiedene Datenbanken genutzt, die je nach Größe ihrer Veränderung, Lokalisation oder ihrer Genbeteiligung eingeordnet werden. Mit der Erhebung des Stammbaums und zusätzlichen Untersuchung der Eltern kann eine Neumutation von einer vererbten Veränderung abgegrenzt werden.

Treten CNV jedoch häufig in der Bevölkerung auf und zeigen keine phänotypischen Auswirkungen, werden sie als Polymorphismus bezeichnet.

Array Studien zeigen, dass Kopienzahlveränderungen häufig (1-3 Varianten) in bestimmten Regionen des menschlichen Genoms zu finden sind und keine Auswirkungen oder Zusammenhang mit einem Phänotyp zeigen.

Daher werden diese Normvarianten für die **Variabilität des Einzelnen** gehalten, wenn diese nicht mit ähnlichen Veränderungen bei anderen Personen und Einträgen in verschiedenen Datenbanken in Verbindung gebracht werden kann.

Die **Grundlage für moderne Technologien** bildet jedoch die Sequenzierung, um damit punktgenau die Veränderungen einzelner Gene und damit ihre Expression und Auswirkung auf die Proteinbildung besser verstehen zu können.

In der Molekulargenetik gilt die klassische Sanger Sequenzierung weiterhin als Goldstandard und da moderne Technologien auf einzelnen ihrer Analyseschritte aufbauen, wird sie zum besseren Verständnis näher erläutert.

3.3.2 Sanger Sequenzierung

Die Einzelgensequenzierung wurde 1977 von Friedrich Sanger entwickelt und wird noch heute zur Bestätigung bekannter Veränderungen herangezogen.

Da sie lediglich in einem kleinen, vordefinierten Bereich durchgeführt werden kann, ist ihre Detektionsrate limitiert, die Methode zeitmäßig sehr aufwendig und bekannten Veränderungen und familiären Erbkrankheiten vorbehalten.

Die DNS Abschnitte der zu untersuchenden Reaktion werden denaturiert, damit sich die beiden Doppelstränge auftrennen, danach werden Sequenzierprimer an die Zielsequenz gelegt und so die Synthese in Gang gesetzt. Für diesen enzymatischen Vorgang der Didesoxymethode, die auch Kettenabbruchmethode genannt wird, werden neben den normalen Nukleotiden **Adenin, Guanin Cytosin und Thymin** auch Didesoxy-Nucleotid-Triphosphaten (**ddNTP's**) dem Reaktionsgemisch beigefügt. Bei der Herstellung der Zielsequenz, einem neuen DNS Strang, der zwischen dem Primern mehrfach amplifiziert wird, kommt es durch die mangelnde Bindungsfähigkeit der Didesoxy-Nucleotide zu Kettenabbrüchen. Die entstehenden DNS Produkte zeigen unterschiedliche Fragmentlängen und können mittels Kapillarelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Markierung der einzelnen ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoff können diese von einer Kamera detektiert werden und in einem Elektropherogramm wiedergegeben werden. Damit können die einzelnen Basen am Ende der Fragmente zugeordnet werden und ergeben so die Basenfolge und Sequenz des angereicherten DNS-Moleküls, wie die folgende Abbildung zeigt.

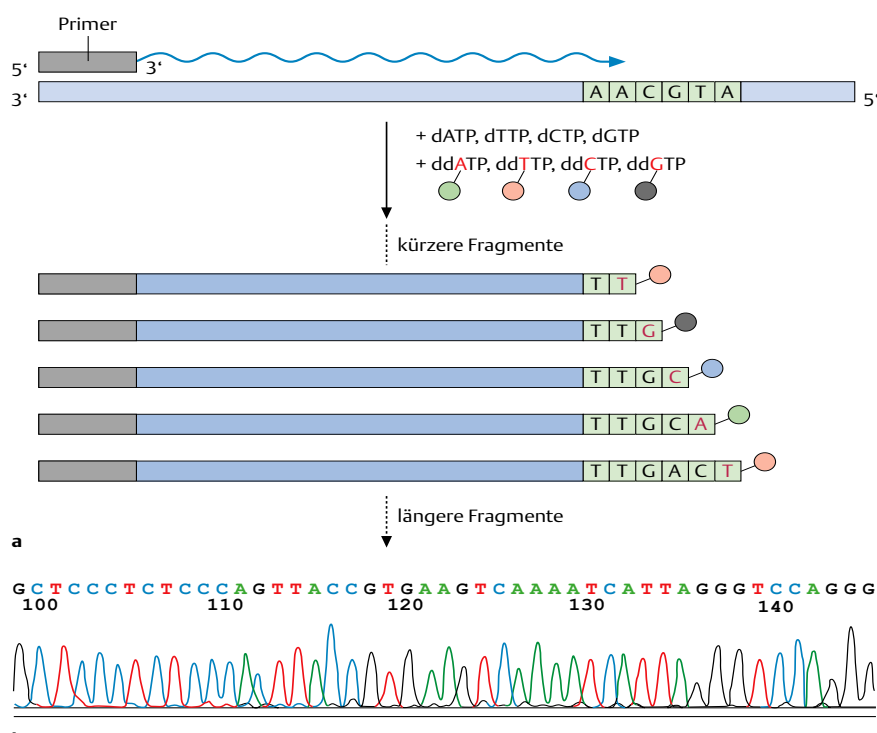


Abb. 6: **DNA-Sequenzierung** nach **Sanger** (Taschenbuch der Humangenetik von Murken et al., 2017. S107) Die Reihenfolge der vier fluoreszenzmarkierten dNTPs in der Elektrophorese-Kapillare erlaubt die Bestimmung der DNS-Sequenz.

Dieser Sequenziervorgang ist durch die Kapazität der 96 Kapillaren mit je 300-1000 Bp (Basenpaare) eingeschränkt. Die resultierende Sequenz ist durch den technischen Aufwand und das geringe Auflösungsvermögen limitiert. Die Aussagekraft ist nur für eine angereicherte Zielsequenz gegeben, da jedes DNA-Fragment eine eigene PCR benötigt und einzelne Gene nacheinander und nicht parallel sequenziert werden können. Diese Methodik bleibt somit für klare Phänotyp-Genotyp-Korrelationen vorbehalten, jedoch mit hoher Qualität (Henley und Lemke, 2015; Neveling und Hoischen, 2014; Hoferle, 2017; Murke et al., 2017).

Bei der diagnostischen Suche nach ungeklärten Veränderungen oder Neumutationen bevorzugt man jedoch eine genomweite Suche. Daher werden möglichst lange Reads, Nukleotidsequenzabschnitte der DNS, bevorzugt. Indikationsspezifisch werden daher Geräteplattformen benötigt, die diesen Anforderungen gerecht werden.

Variable Phänotypen, Überlappungen und sehr heterogene Krankheitsbilder fordern raschere und effizientere Umsetzung und paralleles Sequenzieren mehrerer Gene in einem Analyseschritt. Um diesen Herausforderungen zu entsprechen wurden neue Technologien mit hoher Effizienz, größeren Readlängen und kürzerer Sequenzierdauer entwickelt, die zuletzt auch das ganze menschliche Genom entschlüsseln können (Neveling und Hoischen, 2014; Weißmann und Gilissen, 2014).

3.4 Next Generation Sequencing (NGS)

NGS steht für eine große Anzahl an Hochdurchsatzverfahren, denen es gerätetechnisch möglich ist, bereits das gesamte menschliche Genom oder mehrere Exons, parallel in einem einzigen Reaktionsschritt zu sequenzieren (Weißmann und Gilissen, 2014; Neveling und Hoischen, 2014). Einzelne Plattformen zeigen geringfügige Unterschiede in der Datenproduktion, der Readlänge und dem Durchsatz, sowie in der Weiterentwicklung und Anpassung an das Benutzerprofil. Daran orientiert sich auch ihre Inanspruchnahme (Metzker, 2010).

Wie bereits im vorangehenden Kapitel erwähnt gilt die Sanger Sequenzierung als Grundlage für die neueren Technologien und damit erfolgen einige Schritte in ähnlicher Abfolge. Für die meisten Sequenziergeräte sind die „Library-Preparation“ eine Voraussetzung, gefolgt von der Amplifikation, um genügend DNA Fragmente zu

erhalten, sowie zuletzt die eigentliche Sequenzierung (Neveling und Hoischen, 2014; Metzker, 2010).

Die DNS, die aus einer EDTA-Blutprobe extrahiert wird, muss im ersten Schritt auf die Sequenzierung vorbereitet werden. Die gewählte Fragmentlänge ist abhängig von der gewählten Sequenziermaschine und deren Lesekapazität. Dabei unterscheidet man Single-end Reads von Paired-end Reads, durch deren beidseitiges Ablesen der Sequenz die Qualität und die Zuordnung zum Referenzgenom erhöht wird.

Diese Bindung der DNS Abschnitte an Adaptoren und Primersequenzen wird als **Library-Präparation** bezeichnet (Neveling und Hoischen, 2014).

Da für die eigentliche Sequenzierung ausreichend identes DNS Material benötigt wird erfolgt im zweiten Schritt eine **Amplifizierung** über Bridge- oder Emulsions-PCR. Zuletzt erfolgt die eigentliche **Sequenzierung** in Abhängigkeit vom Gerätetyp. Die Pyrosequenzierung, bei der ein Einbau der 4 Nukleotide zur Freisetzung eines Pyrophosphates führt und proportional dazu ein Lichtsignal gemessen werden kann, gehört zur FA Roche, einem der ersten Geräte, die 2006 auf den Markt kamen. Bei den SOLID Maschinen erfolgt die Sequenzierung durch Litigation und beim Marktführer, der Firma Illumina durch „sequencing by synthesis“. Dieser grundlegende Ablauf in drei wesentlichen Schritten wird durch folgende Abbildung nochmals veranschaulicht.

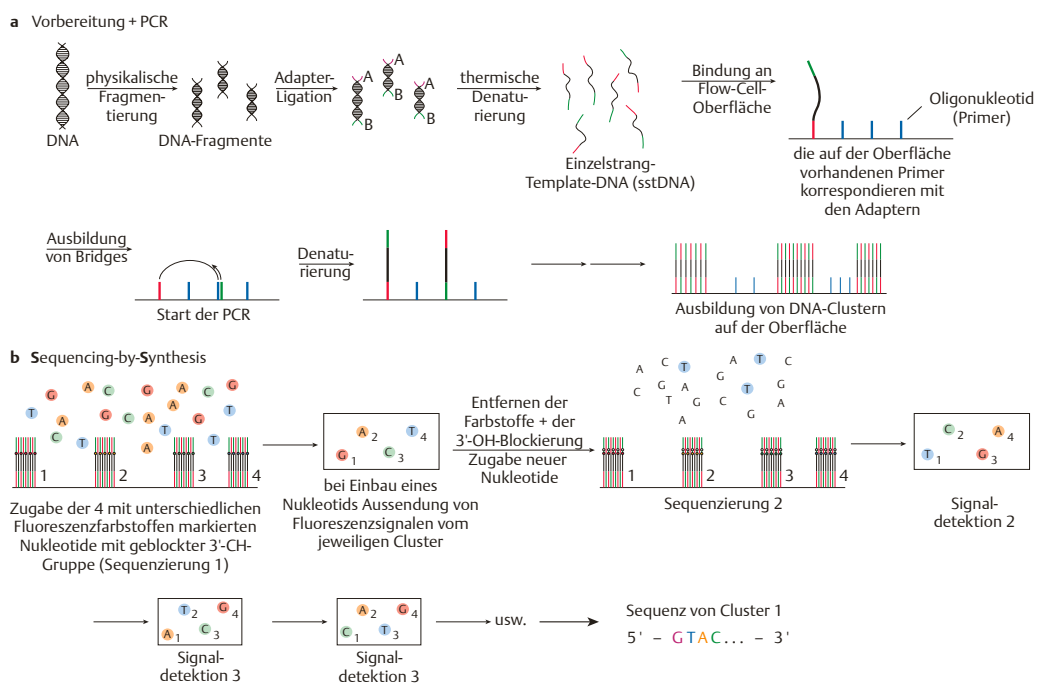


Abb.7: **NGS -Technologien:** 1. Library-Präparation, 2. Amplifikation und 3. die eigentliche Sequenzierung einer Illumina Plattform (Taschenbuch der Humangenetik von Murke et al., 2017. S113.)

Alternative Verfahren einer Sequenzierung bei Wanderung durch Naoporen gehört bereits zu den Techniken der neuen und 3. Generation (Neveling und Hoischen, 2014).

Mit immer längeren Reads und höheren Durchsatzraten entstehen durch das parallele Sequenzieren eine enorme Flut an Rohdaten, die gelesen und interpretiert werden müssen.

Die Zuordnung dieser **Reads** (Einzelsequenzen) zum Referenzgenom, das über das Humane Genome Projekt entstanden ist, wird als „read mapping“ bezeichnet und erfolgt mittels Computerprogramme. Abweichungen werden als „variant calling“ bezeichnet und um ihre Auswirkungen auf der Proteinebene verstehen zu können, erfolgt die die Priorisierung und Zuordnung über die Expertise der Bioinformatik. Die Interpretation und die Wahrscheinlichkeit, mit der die gefundenen Varianten auch als pathogen erachtet werden, kann über „variant annotation“ und bereits standardisierte Einträge mit Genbeschreibung in den Datenbanken erfolgen.

Die Qualität, Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse ist abhängig von der Fragestellung, der Wahl der verwendeten Geräte und ihrer Abdeckung, der „coverage“. Diese ergibt sich aus der Sequenziertiefe und hängt mit der Readlänge zusammen. Darunter versteht man, wie häufig eine bestimmte Sequenz im Vergleich dem Referenzgenom in einem Analyseschritt zugeordnet werden kann (Weißmann und Gilissen, 2014). Ist diese ausreichend tief, dann ist jedes der beiden Allele mindestens einmal sequenziert worden.

Der Durchsatz vieler Geräteplattformen hingegen ergibt sich aus der Anzahl und der Länge der Reads und wird in Mb angegeben.

Um in der Abklärung ungeklärter Entwicklungsstörungen aber auch andere somatischen Erkrankungen und pathogene Veränderungen zu detektieren, werden verschiedene **Anreicherungen** angewandt. Damit werden jene Bereiche des Genoms ausgewählt, die in Abhängigkeit von der Fragestellung untersucht werden. Damit können verschiedene Regionen des Genoms erfasst werden bis hin zu Sequenzveränderungen einzelner Gene in Form von Punktmutationen (Heyne und Lemke, 2015).

3.4.1 WES - Whole Exome Sequencing

Im klinischen Bereich hat sich daher neben der zielgerichteten Suche und Anreicherung von bestimmten DNS Regionen, das WES (Whole Exom Sequenzierung) etabliert. Mit diesem können alle proteinkodierenden Abschnitte des Genoms untersucht werden, jene 1-2 Prozent mit weit über 20.000 Gene oder mehr als 220.000 Exons (Zach et al., 2019; Neveling und Hoischen, 2014).

Die restlichen 98 Prozent des Genoms fallen auf repetitive - oder regulatorische Sequenzen, den Intron-Bereichen.

Eine Weiterentwicklung mit erheblichem informativem Zugewinn bietet das WGS (Whole Genome Sequencing), mit einer unüberschaubaren Datenmenge durch eine Vielzahl an UV's (unknown variants). Ihre Interpretation stellt damit die Humangenetik vor eine große Herausforderung, die mittels aufwendigen Filterungs- und Priorisierungsansätzen entsprechend der Fragestellung in pathogene und möglich pathogene Veränderungen eingeteilt werden, mit Hilfe von Vorinformationen bekannter Varianten aus diversen Datenbanken (Heyne und Lemke, 2015).

Im Gegensatz dazu können bekannte Genveränderungen bei familiärer Häufung effektiv durch eine zielgerichtete Sequenziermethode, die auch „targeted resequencing“ genannt wird und durch eine geringere Read-Leselänge von 50 Bp (Basenpaaren) erfolgen. Die Anreicherung der gesuchten Zielsequenz kann einerseits wie bei der Sanger Methode mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen oder über Hybridisierungsbasierte Methoden (Neveling und Hoischen, 2014).

Bei heterogenen Erkrankungen mit Veränderungen in mehreren Genen gelten Gen-Panel Untersuchungen zielführend.

Während sich Panel Untersuchungen auf wenige Gene beschränken und damit die Abdeckung (30 Reads/Base) der Zielgene wesentlich höher liegt, werden mit einem WES mehr als 20.000 Gene und damit in etwa 200.000 Exons erfasst, aus dem proteinkodierenden Bereich. Mit dem ungerichteten Fokus einer WES entstehen somit wesentlich mehr unbekannte Zusatzbefunde unklarer Kausalität und machen aufwendige bioinformatische Verarbeitung notwendig.

Eine gezielte humangenetische Beratung und Aufklärung für Betroffene und der daraus resultierende erschwerte Datenschutz durch die Vielzahl an Varianten unklarer

Signifikanz ist bezogen auf die Grunderkrankung nicht mehr möglich (Heyne und Lemke, 2015).

3.4.2 Panel-Untersuchung

Durch die Möglichkeit der parallelen Hochdurchsatzsequenzierung, können mehrere Gene, die mit einer Krankheit assoziiert werden, simultan untersucht werden.

Durch die begrenzte Anzahl relevanter Gene, werden unerklärbare Zufallsbefunde vermieden und eine hohe Abdeckung in Abhängigkeit von der Readlänge und Qualität in der Untersuchung erzielt.

Differentialdiagnostisch fließen alle krankheitsspezifischen Gene in einen einzigen Untersuchungsgang ein, erfasst werden dabei nur CNV von kleinen Insertionen bis zu 50 Nucleotiden (Indels). Während bei der Einzelgenanalyse nur verdächtige Gene ausgeschlossen werden, können mit einem Genpanel aus einer großen Zahl von verdächtigen Ursachen die bekanntesten Genveränderungen für einzelne Fragestellungen erfasst werden (Kuß, 2014).

Diese Form der Nutzung moderner Technologien bietet einen enormen Informationszugewinn, da bisher nicht untersuchte Gene aus herkömmlichen Analysen ebenso erfasst werden können, jedoch unerklärbare Varianten und Polymorphismen dadurch weitgehend vermieden werden (Henley und Lemke, 2015).

3.4.3 Technologische Ausblicke

Mit der Kenntnis diagnostischer Grenzen und der höheren Wahrscheinlichkeit für unbedeutende Zusatzbefunde erlauben die Erweiterungen der NGS Technologien ungeahnte Möglichkeiten über die Sequenzierung aller proteinkodierender Abschnitte (WES) bis hin zur Analyse des gesamten menschlichen Genoms (WGS) und damit auch das Auslesen der Intronbereiche – jener regulatorischen, sowie repetitiven Sequenzen. Über die moderne Entwicklung der Humangenetik und weitere revolutionäre Ideen gelingt es zuletzt auch Methylierungsmuster und Histonmodifikationen darzustellen – jene **epigenetischen Veränderungen**, die derzeit stark beforscht werden. Damit können zusätzliche Erklärungen gefunden werden, die bei hereditärer Disposition zu unterschiedlichen phänotypischen

Verlaufsformen einzelner Erkrankungen führen und umweltbedingte Einflüsse besser verstanden werden.

Unter den neueren Sequenzieretechnologien fasst Kuß (2014) auch jene Möglichkeiten zusammen, die funktionelle Auswirkungen auf das Genom untersuchen. Dazu zählen die **RNA-Sequenzierung** (RNA-Seq), welche das gesamte Transkriptom erfasst und über das Genexpressionsmuster das klinische Erscheinungsbild verstehen lässt, da einzelne Isoformen das Aktivitätsniveau von Proteinen verändert.

Diese verschiedene Spleißvarianten und Fusionstranskripte (siehe dazu Abbildung 8) müssen daher in der Datenanalyse berücksichtigt werden.

Diese entstehen nach der Transkription, wenn aus der primären mRNA die Introns, die nicht kodierenden Abschnitte durch „Splicing“ entfernt werden. In der resultierenden reifen mRNA (messenger RNA) können bei diesem Vorgang die Exons durch **alternatives Splicing** und verschiedene Aneinanderreihung der Exons unterschiedliche Genprodukte (Transkripte) entstehen lassen wie nachfolgende Abbildung erklärt.

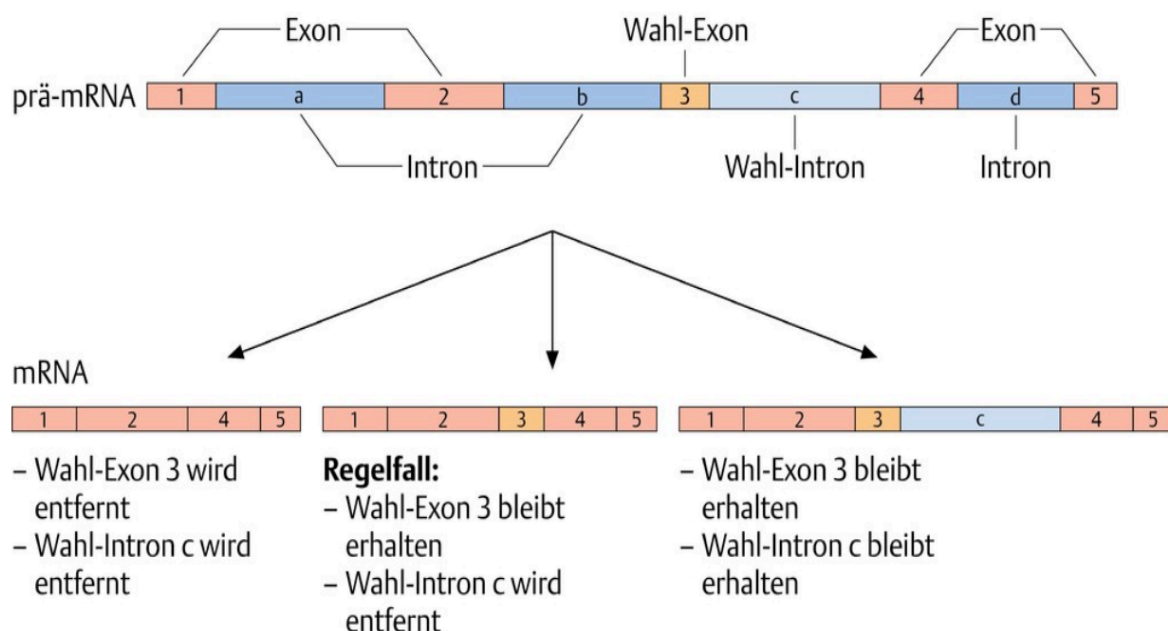


Abb.8: Alternatives Splicing aus Taschenlehrbuch der Humangenetik, Murken et al., 2017, S25.

Über die RNA-Sequenzierung können auch jene kleinen, nicht kodierenden Nukleotidsequenzen, „micro RNA-Moleküle (miRNA), bestimmt werden, die in der

Feinregulation an Bindungsstellen der mRNA die Translation in Proteine beeinflussen können.

Mittels **Ribosomenprofiling** ist es möglich Transkriptionsstartpunkte oder die Syntheserate von Proteinen bestimmen zu können, um bisher unbekannte proteinkodierende Sequenzen zu erkennen oder mRNA-Moleküle zu detektieren, deren Sequenzen nicht in Proteine übersetzt werden.

Im Weiteren ermöglicht die **Chromatinimmunpräzipitation** (ChIP-Seq) die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren für verschiedene Zielgene und mittels **MeDIP-Seq** (methylated DNA immunoprecipitation) ist das Methylierungsmuster und damit der Einfluss epigenetischer Mechanismen fassbar. CpG Regionen, Regionen die reich an den Cytosin- und Guaninbasen sind, findet man vorwiegend in Promotorbereichen und damit ist ihr Einfluss auf die Genregulation verständlich. Ihre Anhäufungen werden oft an jenen Genorten gefunden, deren Mutationen mit neurologischen Störungen oder geistiger Behinderung in Zusammenhang stehen.

Mit der **HIC-Technik**, erklärt Kuß (2014), kann die strukturelle und räumliche Anordnung der Chromosomen und die Interaktion ihrer regulierenden Gene auf entfernte Abschnitte oder sogar andere Chromosomen im Interphasekern erklärt werden. Über den Einfluss dieser „long range regulators“ auf die Genexpression wird die Entstehung von Fehlbildungen der Extremitäten angenommen.

Seltene genetische Erkrankungen können zumeist nur in 50 Prozent auf eine kausale Ursache zurückgeführt werden (Gilissen et al., 2012). Sie treten häufig bereits im Kindesalter auf, zeigen einen systemischen und chronischen Verlauf und führen zu erheblicher Einschränkung der Lebensqualität. Zahlreiche Entwicklungsstörungen fallen darunter. Kennt man deren zugrundeliegenden Pathomechanismus, eröffnet dies Ansätze für Therapien oder Forschungsprojekte.

Die NGS-Analyse gilt dabei als sehr komplexe Methode, die neben der Sequenzierung nachfolgend die Zuordnung zum Referenzgenom notwendig macht. Aus den resultierenden Abweichungen von der **Referenzsequenz** gilt es nun, jene als „pathogen“ eingestuft Varianten zu filtern, die als mögliche Ursachen des gesuchten phänotypischen Erscheinungsbildes gelten.

3.4.4 Strategien in der Datenauswertung, bioinformatische und klinische Interpretation

Wie schon bei den Grundprinzipien der NGS Technologie erwähnt, werden bei den meisten Gerätetypen die Signale der Fluoreszenzmarker und damit die Primärdaten als Bilddaten abgespeichert. Mittels Computerprogramme (base caller) werden die Reads softwaregestützt in eine Nukleotidsequenz umgeschrieben. Aber wie gelangt man von der Menge an gefundenen Varianten zu jenen ein oder zwei pathogenen Mutationen, die auch kausal für das Störungsbild und tatsächlich für das phänotypische Erscheinungsbild verantwortlich sind. Während sich konventionelle Strategien auf die Identifizierung bestimmter Kandidatengene spezialisiert haben, zielen neue Technologien vorwiegend auf deren Interpretation ab. Zahlreiche Strategien auf der Suche nach der genetischen Ursache wurden entwickelt (Gilissen et al., 2012). Das menschliche Genom besteht aus 22 Autosomenpaare und 2 Geschlechtschromosomen und beinhaltet nahezu 2 x 3 Millionen Basenpaare, von denen nur in etwa 2 Prozent codierende Bereiche enthalten und für die Proteinfunktion verantwortlich sind.

Aus klinischen Sicht geht man bei vererbaren genetischen Erkrankungen daher primär davon aus, dass der gesuchte Effekt auf die Proteinfunktion erheblich ist und die Mutation in der Population selten in Erscheinung tritt. Bei nur wenig Betroffenen in der Population können damit häufige Varianten über ein Prozent mittels MAF (minor allele frequency) aus der Fülle der Daten herausgefiltert werden.

Bei einem WES geht man von 25.000-1.000.000 Varianten aus, daraus ergibt sich auch die geringe Aufklärungsrate von nur 11-15 Prozent. Die bioinformatische Forschung ist daher weiter bemüht die Aufklärungsrate durch verschiedenste Strategien zu erhöhen (Köhler und Robinson, 2017).

Liegt die Veränderung daher vorzugsweise in der proteinkodierenden Region des Genoms, dann hat sie einen unmittelbaren Effekt auf jenes Protein, für das ein verändertes Gen auch kodiert. Das reduziert die Menge an Varianten von 3 Millionen auf etwa 25.000 – je nach Anreicherung der proteinkodierenden Exonbereiche, die aus einer WES resultieren (Zech et al., 2019; Heyne und Lemke, 2015).

Als weiterer Filterungsschritt gilt es, nur qualitativ hochwertige Reads (Sequenzen) zu verwenden. Danach kann je nach Vererbungsmuster nach heterozygoten oder homozygoten Varianten gefiltert werden. Bei Ersteren tritt die Variante in 20 Prozent

in Erscheinung bei homozygotem Auftreten mit 80 Prozent (Heyne und Lemke, 2015). Mit einer weiteren bioinformatischen Methode können nun all jene Varianten entfernt werden, deren Basenaustausch (SNP) zu keiner Aminosäureveränderung führt und somit keinen Einfluss auf die Proteinfunktion hat, dies nennt man synonyme oder **stille Mutation**. Übrig bleiben zuletzt nur jene pathogenen Varianten, die durch ein Stopp Codon oder eine **missense-Mutation** über eine Leserasterverschiebung (frame-shift), eine Veränderung der Aminosäuresequenz zu einem verkürzten Protein mit veränderten Proteinfunktion führen.

Damit bleiben zuletzt nur wenige Varianten über, die über Datenbanken mit bereits bekannten Genveränderungen verglichen werden.

Den restlichen „privaten Varianten“ die in keiner Datenbank oder bei anderen phänotypisch ähnlichen Individuen gefunden werden, kommt nun besondere Aufmerksamkeit zu. Diese **seltene Varianten**, die in weniger als **ein Prozent** der Bevölkerung auftreten, stellen daher eine mögliche kausale Ursache dar oder zählen zu Polymorphismen und machen so die Variabilität der menschlichen Erscheinung aus.

Nach dieser ersten Selektion werden nach klinischen Aspekten nun weitere Strategien in der Priorisierung angewandt, um auf die zugrundeliegende Ursache zu kommen. Diese haben das Team um Gilissen (2012) wie folgt gut zusammengefasst.

Unter **Linkageanalysen** versteht man den Abgleich mit mehreren betroffenen Familienmitgliedern, um gemeinsame Auffälligkeiten oder einen Vergleich mit sehr weitschichtigen nicht betroffenen Verwandten zu ermöglichen und daraus die unbedeutenden Variationen zu filtern.

Das **Homozygotenscreening** hingegen erlaubt die Suche nach seltenen rezessiven Erkrankungen bei konsanguinen Paaren, bei dem große homozygote Regionen identifiziert werden können.

Sind keine familiären Auffälligkeiten aus dem Stammbaum erhebbare und Verwandte für die Testung greifbar, dann kann mit der **Double-hit Strategie** sowohl nach homozygoten als auch nach compound-heterozygoten Varianten gesucht werden. Nachkommen können von beiden Elternteilen zwei verschiedene (compound) rezessive

Merkmale erhalten, mit nur einem rezessiven Merkmal tritt die Erkrankung phänotypisch jedoch nicht in Erscheinung.

Mittels **Shotgunmethode** werden aus langen DNA Fragmenten zufällige bioinformatische Überlappung zu einem Konsens zugeordnet, welche bei heterozygoten Erkrankungen weniger effizient gelingen.

Bei Neumutationen hingegen, die zumeist als Ursache zahlreicher heterogener seltener Erkrankungen gelten und daher nur sporadisch in Erscheinung treten, hat sich die **TRIO Untersuchung** bewährt. Bei dieser werden die Neumutation der Betroffenen von den vererbten Eigenschaften deren Eltern abgegrenzt. Da im Exom durchschnittlich 0-3 Neumutationen gefunden werden, kann daraus die potentiell pathogene Variante leicht gefiltert werden, wenn die Untersuchung der Trios in einem gemeinsamen Untersuchungslauf erfolgt, um damit mögliche Artefakte ausschließen zu können.

Genomweite Assoziationsstudien (**GWAS**) erlauben es, aus zahlreichen nicht verwandten Patienten/innen jene Varianten zu filtern, die ähnliche phänotypische Erscheinungsbilder aufweisen und erlaubt diese zusätzlich mit bekannten Varianten in den Datenbanken abzugleichen.

4 Genetische Datenbanken und Informationsquellen

Für die Interpretation der Sequenzvarianten aus den Rohdaten stehen daher zur Einordnung nach klinischen Gesichtspunkten verschiedene Datenbanken zur Verfügung. Während erstere vor allem Einblick auf die Genotyp-Phänotyp-Konstellation geben stehen auch zahlreiche bioinformatische Informationen und Annotationen zur Verfügung. In diesem Kapitel werden daher einige dieser wertvollen Informationsquellen angeführt, die eine passive Entscheidungsunterstützung bieten. Bei über 8000 seltenen Erkrankungen stellt eine rasche Diagnosefindung eine methodische Herausforderung dar. Daher werden über verschiedenste Suchmaschinen strukturierte Listen von Symptomen und Differentialdiagnosen mit Querverweisen zu verschiedenen Quellen angeboten (Müller et al., 2018).

Im folgenden Kapitel werden einige der bekannten Datenbanken und Softwareprogramme beschrieben. Die meisten davon sind auch kostenfrei und online zugänglich, wie die Suchmaschine PubMed mit zahlreichen freien Quellen oder Google Scholar.

4.1 OMIM

Der Name steht für „Online Mendelian Inheritance in Man“ und wurde in den 1960er Jahren von Dr. V. A. Kusick gegründet und wird aktuell über die John-Hopkins-Universität weiter betreut und regelmäßig aktualisiert. Diese Datenbank bietet mit über 15.000 Genen wesentlichen Informationen über bekannte genetisch bedingte Erkrankungen und ist seit 1985 als online Portal frei zugänglich. Ihr Hauptaugenmerk liegt auf den genotypischen und phänotypischen Zusammenhängen und damit klinischen Merkmalen von seltenen Erkrankungen.

Mit dem letzten Update vom 13. Juli 2019 enthält sie 5402 Einzelgenerkrankungen und 992 Einträge zu komplexe Erkrankungsbildern. Ein Teil der genetischen Veränderungen betreffen auch somatische Krankheitsbilder, insbesondere Tumorerkrankungen.

Über diese Suchmaschine erhält man nach Eingabe einzelner Schlagworte Informationen über mögliche Genveränderungen, die genaue Position am Chromosom und in welchem Gewebe diese Veränderung eine Rolle spielt. Neben dem zugehörigen Erbgang können bei Bedarf auch genaue Informationen über die Genfunktion, den molekularen Pathomechanismus und der damit zu erwartenden Klinik abgerufen werden. Zuletzt wird auch auf entsprechende Publikationen hingewiesen.

Seit 1995 wird sie über NCBI (das National Center for Biotechnology Information) verwaltet und bietet übergreifend links zu verschiedenen anderen Websites.

4.2 Orphanet

Dieses Portal beruft sich auf die Europäische Definition seltener Erkrankungen und bietet über Schlagwörter oder über den Krankheitsnamen rasch die gewünschten Informationen an. Damit kann kostenfrei und für alle zugänglich das Wissen über seltene Erkrankungen abgerufen werden. Eingaben können über das Gen, den

Krankheitsnamen, ICD -10 Klassifikation oder über die zugehörige OMIM Nummer erfolgen. Die Nomenklatur erlaubt damit die Suche nach Subtypen von Krankheiten, Fehlbildungen, klinischen Syndromen oder Anomalien sowie einer klinischen Situation.

Da diese Plattform nicht nur Ärztinnen und Ärzten vorbehalten ist, sondern auch für Angehörige zugänglich ist, sind die Dienstleistungen breit etabliert und die gewünschten Informationen in alphabetischer Reihenfolge leicht auffindbar. Für Fachleute stehen zusätzlich entsprechende Leitlinien aus dem Bereich der Notfallmedizin und Anästhesie zur Verfügung, um damit die Versorgung der Patientinnen und Patienten zu erleichtern.

Die wissenschaftlichen Informationen beruhen auf Fachpublikationen. Da die meisten Erkrankungen jedoch sehr selten auftreten können die beschriebenen Verläufe nur den Einzelfall betreffen und die Behandlungsempfehlungen basieren nicht immer auf ausreichender Evidenz.

Auch die entsprechende Medikation bei seltenen Erkrankungen wird über „orphan drugs“ gesondert behandelt (Müller et al., 2018).

Hinweise auf medizinische Speziallabors und relevante Studienergebnisse werden über eine Enzyklopädie für Fachpersonal und Betroffene getrennt dargeboten. Zusätzlich bietet „OrphaNews“ Informationen über Netzwerke oder Selbsthilfegruppen mit relevanten Neuigkeiten, oder Wissenswertem über regionale Kongresse. Erwähnt werden im Weiteren auch Diskussionsforen oder politische Entscheidungen zu seltenen Erkrankungen sowie laufende Forschungsprojekte von denen Fachpersonal oder Betroffenen profitieren können. 1997 vom französischen Gesundheitsministerium gegründet bietet dieses Referenzportal ihre Informationen in Form einer Enzyklopädie für verschiedene Zielgruppen an und gilt als die umfangreichste Website in Europa (Müller et al., 2018).

4.3 NCBI

NCBI steht für „National Center for Biology Information“. Diese Datenbank wurde 1988 in Maryland gegründet. Ihre Aufgabe liegt in der Erarbeitung von Standards für Datenbanken, der Datenverarbeitung, ihrer Speicherung und dem Datenaustausch in der Molekulargenetik. Über die Entwicklung von Suchmaschinen und

Analysealgorithmen ermöglicht sie, die verfügbaren Daten der Forschung und der Medizin zugänglich zu machen.

Über diverse Webseiten stellt sie Informationen, die von Experten verschiedener Berufsgruppen stammen zur Verfügung und ist mit den bisher genannten klinischen Datenbanken verlinkt. Damit kann auf der Suche nach entsprechender Information rasch die entsprechende Theorie über Artikel aus PubMed abgerufen werden, die klinisch phänotypischen Variationen über Orphanet und OMIM gefunden werden, aber auch nach genspezifischen Hinweisen gesucht werden. Über verschiedenen Unterplattformen kann die Sequenzveränderung gesucht, Genpositionen eingegeben und visuell zugeordnet werden.

Über zahlreiche Tutorials können spezifische bioinformatische Fähigkeiten erlernt oder ganze Gentranskripte heruntergeladen werden, um damit zu arbeiten.

Eingaben sind über das Gen, das Protein, die Sequenzvariante oder über die Klinik möglich.

Damit kann die Suche einer spezifischen Fragestellung in den verschiedenen Datenportalen gleichzeitig erfolgen. So liefert ClinVar die Zusammenhänge zwischen einer genetischen Variation und der entsprechenden phänotypischen Erscheinung, MedGen bietet Informationen über klinische Studien und beschreibt die wesentlichen Krankheitsmerkmale, RefSeqGene liefert Hinweise über die genomische Sequenz und macht Angaben über Exons und Introns.

4.4 USCS Browser

In dieser Datenbank werden zahlreiche computertechnische Möglichkeiten (Tools) angeboten um genetische Daten hinsichtlich Protein- und Sequenzvarianten visualisieren zu können.

Über das Tool „BLAT“ kann eine Sequenz eingegeben werden und der entsprechenden Region im Genom zugeordnet werden. Mittels „Lift-over“ kann von einer älteren Referenzsequenz in die aktuelle gewechselt werden und die neuen Koordinaten werden problemlos angepasst. So können einzelne Varianten trotz Aktualisierungen zugeordnet werden und mit Publikationen aus früheren Jahren leicht verglichen werden. Es besteht zudem auch eine enge Vernetzung mit anderen Datenbanken, auf die direkt zugegriffen werden kann. Damit zählt dieser Browser zu den meist benutzten Datenbanken, da er neben dem humanen Genom auch

Querverweise zu anderen Organismen enthält und damit auch konservierte Regionen und evolutionäre Informationen zur Verfügung stellt.

4.5 HPO (*Human Phenotype Ontology*)

Um jedoch genetisch seltene Erkrankungen, wie es bei den unklaren Entwicklungsstörungen oder zahlreichen neuropsychiatrischen Störungsbildern der Fall ist, voneinander abzugrenzen, wird eine gemeinsame Begriffsebene benötigt.

Auf der Suche nach Informationen in diversen Datenbanken die neben klinischen Informationen (OMIM, Orphanet, ..) auch relevante Details über Gene oder die Proteininteraktion liefern (USCS, NCBI, ..), sowie zugrundeliegende Funktionsebenen erforschen, benötigt die Bioinformatik eine einheitliche Terminologie. Eine präzise Beschreibung phänotypischer Auffälligkeiten erlaubt es Klinikern, vor allem aber Computerprogrammen, Vergleiche zu ziehen, Erkrankungen zu charakterisieren und diese mit Genen zu assoziieren. Bekannte Veränderungen oder das Vorwissen darüber helfen daraus Wahrscheinlichkeiten und Prognosen zu berechnen (Doelken et al., 2010).

Die HPO (Human Phenotype Ontology) stellt diese Terminologie bereit indem sie Begriffe und semantische Beziehungen hierarchisch ordnet und wesentliche Kategorien wie Phänotyp und Vererbungsmodus darin abdeckt. Präzise Definitionen erlauben damit auch computergestützte Schlussfolgerungen, da synonyme Begriffe vermieden werden und eine Einordnung in ein phänotypisches Spektrum über Annotationen möglich ist.

Die Erweiterungen durch den **Phenomizer** erlauben seit 2014 auch Phänotyp-bezogene Analysen von genomischen Daten. Damit ist es möglich physiologische Abweichungen neben den morphologischen Merkmalen und Verhaltenseigenschaften gemeinsam zu betrachten. So wird neben variable Expressivität auch auf die Manifestation eines Defektes in verschiedenen Organsystemen eingegangen (Müller et al., 2018).

Eine wesentliche Aufgabe wird darin dem Kliniker zuteil, der aus der Anamnese, Untersuchung und der Bildgebung den Phänotyp seiner Patienten/innen beschreibt, aus der über eine Hypothese die Diagnose und damit die weiteren Behandlungsschritte resultieren.

Dennoch gelingt es auch mit modernen humangenetischen Methoden nur zu 50 Prozent aus den über 8.000 seltenen Erkrankungen die kausale Ursache zu finden und damit Betroffene entsprechend zu behandeln. Einen Grund hierfür sehen Köhler und Robinson (2017) in der unpräzisen Beschreibung der Symptome und dem mangelnden Wissen um alle assoziierten Phänotypen einer Erkrankung. Da die HPO von vielen Datenbanken genutzt wird ermöglicht ihre bioinformatische Verarbeitung eine Assoziation von Phänotyp und Genotyp. Über diese HPO Profile gelingt es auch aus CNV bei denen mehrere Gene betroffen sind, eine Identifikation krankheitsrelevanter genomischer Varianten über Grafiken (Phenogramm) zu erkennen.

Ein verantwortungsvoller Umgang mit den gentechnologischen Ergebnissen sowie ein wissenschaftliches und gesellschaftspolitisches Verständnis für die daraus resultierenden Chancen und Risiken in der Diagnostik von Erbkrankheiten führen zu vielen Diskussionen, hinken aber der Geschwindigkeit des Fortschrittes hinterher. Im folgenden Kapitel werden die wichtigsten Rahmenbedingungen und Gesetze hierfür erwähnt.

5 Ethische und rechtliche Grundlagen

Humangenetische Befunde sind sehr heikle Dokumente – sie unterliegen einerseits dem Gentechnikgesetz, andererseits gelten die Datenschutzgrundrechte in der der Verarbeitung dieser.

Da genetische Untersuchungen durch den technischen Fortschritt an Bedeutung gewonnen haben, sollte im Umgang mit diesen Untersuchungen die Wahrung der Persönlichkeitsrechte und die Grenzen bei der Weitergabe und damit der Zugriff vor Dritten im Vordergrund stehen. Auch einer genetischen Diskriminierung sollte Einhalt geboten werden und das Recht auf Nichtwissen eines heiklen Befundes trotz vorangehender Zustimmung dazu, möglich bleiben (Henn, 2005). Neben dem Schutz vor Benachteiligung soll vor allem auch die Würde des Menschen gewahrt bleiben, dies inkludiert ein Recht auf Selbstbestimmung (Hoferle, 2017).

Seit 1995 existiert daher in Österreich das Gentechnikgesetz (GTG, 1994).

5.1 Das österreichische Gentechnikgesetz (GTG)

Das Ziel dieses Gesetzes ist die Anwendung der Gentechnik zum Wohle der Menschheit und Festlegen des rechtlichen Rahmens für die Forschung.

Die Regelung von Genanalysen und Gentherapie am Menschen.

Das GTG beinhaltet den Schutz der Menschen und deren Nachkommen vor Eingriffen am Genom, den Auswirkungen von gentechnisch veränderten Organismen und deren Einfluss auf die Umwelt und das Ökosystem, um damit ein hohes Maß an Sicherheit zu gewährleisten.

Gentechnische Analysen umfassen Aussagen über Zahl, Struktur oder Sequenz von Chromosomen, Genen oder ihrer Produkte und deren Modifikation. Damit kann die Veränderung einer Krankheit zugeordnet oder der Überträgerstatus erfasst werden, sowie das Krankheitsrisiko oder der Therapieverlauf bestimmt werden (Duba, 2006).

Nach dem österreichischen Gentechnikgesetz § 65. (1) entsprechen die Befunde einer genetischen Analysen zu medizinischen Zwecken dem **Typ 2** und dienen der Feststellung einer bestehenden Erkrankung, welche auf einer Keimbahnmutation beruht. Unter **Typ 3** wird eine Veranlagung einer zukünftig ausbrechenden, genetisch bedingten Erkrankung festgestellt, bei der nach aktuellem Stand der Wissenschaften eine Prophylaxe oder eine Therapie existiert. Fallweise betreffen genetische Untersuchungen auch den **Typ 4**, die eine Veranlagung für eine Erkrankung testet, bei der zum aktuellen Stand der Wissenschaft noch keine Prophylaxe oder Therapie möglich ist.

Nur sehr selten betrifft die Fragestellung den **Typ 1**, eine Untersuchung mit dem Zweck der Feststellung einer bestehenden Erkrankung und der Anpassung des Therapieverlaufes.

Auf der Suche nach molekulargenetischen Ursachen seltener Erkrankungen werden bei der Sequenzierung durch moderne Hochdurchsatzverfahren eine enorme Menge an Rohdaten produziert. Bei der Identifizierung krankheitsspezifischer Marker oder pathogener Varianten sind daher biotechnologische Filterungs- und Priorisierungsverfahren notwendig, um seltene pathogene Mutationen von häufigen und unbedeutenden Varianten abgrenzen zu können – auch wenn diese die menschliche Vielfalt ausmachen.

Jeder Mensch trägt eine Vielzahl an Sequenzvarianten von denen zahlreiche auch populationsspezifisch auftreten können und als benigne Polymorphismen zu keiner phänotypischen Erscheinung führen. Die übrigen seltenen Sequenzveränderungen, die fallweise als möglich pathogen gelten, werden in verschiedene Datenbanken gespeichert, um zu einem späteren Zeitpunkt über Vergleiche von Phänotyp und Genotyp zu einer Erklärung führen können. Für viele Erkrankungen bleibt es dennoch unklar, ob die gefundenen Varianten dafür verantwortlich sind und in welcher Form diese einen funktionellen Einfluss nehmen. Somit führen die Komplexität der Untersuchungs- und Analyseergebnisse durch gesteigerten Probendurchsatz und immer rascheren Bearbeitungszeiten zur Anhäufung enormer, heikler Datenmengen (Kuß, 2014; Henn, 2014).

5.2 Die Datenschutzgrundverordnung

Nach der Datenschutzgrundverordnung § 71. (1) müssen die gewonnenen personenbezogenen Daten einer genetischen Analyse geheim gehalten werden. Sie sollten daher von anderen Datenarten gesondert aufbewahrt werden und durch einen gesonderten Zugriff geschützt sein.

Damit ist der Umgang mit den personenbezogenen Ergebnissen nur jenen Personen vorbehalten, die in der Einrichtung mit der Ermittlung, Verarbeitung oder Auswertung der Daten unmittelbar befasst sind, oder jenen, die zur Untersuchung angeregt haben. Eine kritische Stellung über genetische Tests beziehen Horton et al. (2019), die eine Grenzziehung zwischen klinischer Suche und Forschung problematisch sehen.

Eine ethische Gratwanderung bedeutet aus ihrer Perspektive auch die zusätzliche Testung von primär gesunden Familienmitgliedern zum Ausschluss hereditärer Erkrankungen. Dies umfasst eine Untersuchung einer Gruppe von Personen, die zuvor nicht als Patienten/innen definiert werden, deren Testung lediglich für Vergleiche oder Ausschlussverfahren in der Datenanalyse dient.

Der Freiheit der Forschung steht die Wahrung der Persönlichkeitsrechte gegenüber (Henn, 2005). Neben der Qualitätssicherung und den technischen Vorschriften gilt es in der Aufklärung des/der Patienten/in auf das Recht des Nichtwissens hinzuweisen, sowie die sachliche Information über die Verwendung von Proben und Befunden.

5.2.1 Einwilligung und Beratung

Jede diagnostische genetische Untersuchung sollte bei der Zustimmung zu einer genetischen Untersuchung des Patienten/Patientin oder deren Erziehungsberechtigten eine umfassende Aufklärung über das Ausmaß, das Wesen und die Bedeutung der Untersuchung enthalten (Duba 2006). Ebenso sollte die Einwilligung Informationen über die Methodik und der erwartenden Ergebnisse inkludieren und durch einen Facharzt/Fachärztin für Humangenetik oder Facharzt/Fachärztin in dem Indikationsgebiet und für den Ratsuchenden/die Ratsuchende verständlich erfolgen (Henn, 2014).

Die Einwilligung für unmündige Minderjährige erfolgt daher der auf diesem Wissen beruhenden Einwilligung durch Erziehungsberechtigte oder über eine Sachwalterschaft. Bei entsprechender Disposition oder möglichen Konsequenzen ist auf die Möglichkeit einer psychologischen Beratung oder Information durch Sozialarbeit und das Jugendamt hinzuweisen (Duba, 2006).

Henn (2005) führt dies noch weiter aus und erklärt, bei nicht einwilligungspflichtigen Personen dürfen genetische Untersuchungen nur erfolgen, wenn damit der Ausbruch einer genetisch bedingten Erkrankung vermieden werden kann oder damit ein Einfluss einer Arzneimittelbehandlung geklärt wird. Im Weiteren kann dies im Rahmen einer Abstammungsuntersuchung notwendig werden oder wenn in derselben Familie eine erneute Schwangerschaft geplant ist.

Um alle möglichen Konsequenzen ausführlich erörtern zu können, sollte immer eine humangenetische Beratung angeboten werden. Darin können Fragen nach dem Wiederholungsrisiko oder Präventionsmaßnahmen durch ein Genetisches Screening für behandelbare Erkrankungen beantwortet werden.

Eine kritische Position nimmt Henn (2005) ein, der eine genetische Untersuchung im Kindesalter nur dann gerechtfertigt sieht, wenn die Erkrankung im Kindesalter ausbrechen kann und eine entsprechende Intervention lebensrettend wäre. Das mögliche Wissen um eine familiäre Belastung und Ausbruch im späteren Alter, wie es bei den erblichen Tumorsyndromen der Fall ist, stellt jedoch keine medizinische Notwendigkeit dar und damit sollte gewartet werden, wenn die Eigenverantwortung mit der Volljährigkeit gegeben ist.

Ethisch schwierige Konstellationen ergeben sich im Falle positiver Ergebnisse oder unklarer Varianten vor allem für Minderjährige bei prädiktiven Untersuchungen oder sensiblen Fragestellungen in der pränatalen Diagnostik von Ungeborenen.

Ausreichende Studien oder Informationen über populationsspezifische Mutationsspektren sind für viele Gen-Panels noch nicht vorhanden, um klinisch eingesetzt zu werden. Dazu zählen das präkonzeptionelles Multigenescreening von Erbkrankheiten, die aus der Familiengeschichte bisher nicht hervorgehen und bei den bisher konventionellen Einzelgenuntersuchungen nicht zur Diskussion standen (Henn, 2014). Somit gibt es damit auch keine Befunde, die außerhalb der Indikation der gestellten Verdachtsdiagnose liegen und so auch nicht in der Aufklärung und Einwilligung enthalten sind.

Je breiter das Spektrum einer Genanalyse angesetzt wird, desto häufiger kommt es zu unerwarteten Ergebnissen, aber auch zu mehr Chancen in der diagnostischen Abklärung. Eine Aufklärung über alle Kandidatengene und möglichen Erbgänge einer solch breit angelegten Paneluntersuchung in nur einem genetischen Beratungsgespräch wird damit nahezu unmöglich.

Nicht alle Gene dieser Multiparametertests führen zu ähnlichen Symptomen, wengleich inhaltlich ähnliche Gruppen angeboten werden.

Ähnliche Schwierigkeiten ergeben sich mit Angeboten über das Internet in Form von „Direct-to Consumer“ Analysen, wo ohne fundierte genetische Beratung die bestellten Ergebnisse auf Mausclick abrufbar sind (Henn, 2014).

5.3 Entwicklungsabklärung im klinischen Alltag

In der Literaturrecherche über PubMed oder dem hauseigenen Literaturportal im LKH Klagenfurt, gibt es keine konkreten Leitlinien für die Herangehensweise der neuropädiatrischen Entwicklungsabklärung oder der Verwendung humangenetischer Untersuchungen. Über die Leitlinien der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften) der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (2011) wird auf einzelne molekulargenetische Krankheitsbilder und ihre genetische Abklärung eingegangen. Die humangenetische Beratung wird angesprochen, nicht aber eine grundlegende Empfehlung über ein allgemeines Vorgehen für die Abklärung von Entwicklungsstörungen oder unklare mentale Retardierungssyndrome (MR) angegeben. Kritisch angemerkt wird jedoch, dass die

Leitlinien seit mehr als 5 Jahren nicht aktualisiert wurden und derzeit überarbeitet werden.

O`Byrne und seine Mitarbeiter (2016), haben dieses Thema aufgegriffen und zum damaligen Zeitpunkt folgende Empfehlungen abgegeben, die zum Teil bereits im klinischen Alltag eingesetzt werden – so auch bei uns an der Abteilung.

Entwicklungsstörungen treten in der Bevölkerung in 1-3 Prozent (Choo et al., 2019) in Erscheinung und werden zumeist bereits im Neugeborenenalter durch neurologische Symptome oder begleitende Dysmorphien erfasst. An der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes und Jugendalters werden daher vorrangig jene Entwicklungsstörungen des Vorschul- und Schulalters angetroffen, die entweder als verzögerte Entwicklung in Form von Lernstörungen interpretiert werden oder Verläufe mit einem verspäteten zeitlichen Beginn zeigen wie bei einigen Epilepsieformen des Schul- und Jugendalters.

Das Erkrankungsspektrum betrifft daher die Sprech- und Sprachstörungen, sowie kognitive Einschränkungen und emotionale Störungen. Überlappungen zwischen neurologischen und psychiatrischen Symptomen und den damit verbundenen Problemen im Schul- und Berufsalltag, sowie eine Überforderung der Familie und dem Helfersystem resultieren zumeist daraus.

In Anlehnung an die Expertengruppe von O`Byrne et al. (2016) sind diese **Empfehlungen** durchaus zu übernehmen.

Schrittweise empfehlen diese eine umfassende **Anamnese** über den Schwangerschaftsverlauf, die Geburt und die Entwicklungsschritte des Patienten/in. Danach werden die Besonderheiten in der Familiengeschichte erhoben, wenn möglich über drei Generationen. Mit dieser **Stammbaumanalyse** kann ein möglicher Erbgang abgeleitet werden.

So weisen Symptome, die in jeder Generation auftreten auf einen dominanten Erbgang hin, während rezessive Eigenschaften oft eine Generation überspringen. Geschlechtsbezogenes, gehäuftes Auftreten findet man bei einem X-chromosomal-rezessiven Verlauf mit burschenbezogenem Auftreten, während die Töchter als Überträgerinnen gelten. Ebenso werden rezessive Erkrankungen, hier vor allem die Stoffwechselstörungen im Kindesalter bei Verwandtschaftsehen oder bestimmter

ethnischer Abstammung gehäuft gefunden (Schaaf und Zschocke, 2018; v. Dahl et al., 2006).

Nach Beginn einer Symptomatik muss man fragen, um dadurch Entwicklungsfortschritt oder Entwicklungsstopp voneinander abgrenzen zu können, wie es beim Rett-Syndrom oder einigen Epilepsieformen, dem West-Syndrom oder dem Landau-Kleffner-Syndrom der Fall ist.

Bei Migrationshintergrund sollte an metabolische Ursachen gedacht werden, da das Neugeborenencreening nicht in allen Entwicklungsländern etabliert ist (Dahl et al, 2006; O`Byrne et al, 2016; Sperl und Karall, 2014).

Danach erfolgt eine körperliche **neuropädiatrische Untersuchung**. Dabei geben Hautveränderungen bereits erste Hinweise auf Phakomatosen, hereditäre Dysplasien der Haut weisen auf eine Neurofibromatose hin, während vergrößerte innere Organe Zeichen einer angeborenen Stoffwechselstörung sein können, beispielsweise bei lysosomalen oder peroxysmalen Speicherkrankheiten.

Veränderte Wachstumsparameter oder hormonelle Auffälligkeiten leiten zu einer endokrinologischen Vorstellung über.

Im **zweiten Schritt** werden aus den erhobenen Auffälligkeiten die weiteren Untersuchungen geplant. Im Falle konkreter Hinweise aus der Anamnese oder der klinischen Untersuchung erfolgt eine darauf **zugeschnittene** weitere Diagnostik über ein Entwicklungslabor, eine strukturelle Abklärung oder alleinige genetische Untersuchung.

Ergibt sich aus den bisherigen Hinweisen keine konkrete Verdachtsdiagnose so erfolgt in erster Linie ein **genetisches Screening** mittels Array CGH, dem sogenannten „molekularen Karyotyping“ (Hochstenbach et al., 2009; Hoeflerle, 2017). Damit wird die bisherige chromosomale Bänderungstechnik des Karyogramms abgelöst unter deren Auflösungsvermögen die Mikrodeletionen und -duplikationen nicht erfasst werden. Punktmutationen (SNP) oder epigenetische Veränderungen bleiben jedoch dem NGS vorbehalten und sollten bei gezielten Fragen nach Prader Willi-, Wiedemann-Beckwith- oder Silver-Russell-Syndrom und ihren diesbezüglichen Auffälligkeiten trotz unauffälligem Array-CGH angeschlossen werden. Bei Burschen sollte immer noch an ein Fragile-X-Syndrom gedacht werden.

Eine Stoffwechselerkrankung sollte vorab bereits ausgeschlossen sein.

Da trotz Neugeborenenenscreening metabolische Störungen mit mildem Verlauf oder durch Zuzug aus anderen Ländern und damit nicht erfolgtem Screening auftreten können, sollte eine Harnuntersuchung auf Amino- und Organoazidopathien ergänzt werden und die Anionen-Lücke laborchemisch bestimmt werden. Ebenso wird die Bestimmung endokrinologischer Parameter und Funktionsparameter von Leber und Niere empfohlen und bei Hinweisen auf Organveränderungen eine sonografische oder radiologische Untersuchung angeschlossen.

Unabhängig von der Kostenfrage sind all diese Tests **praktikabel und minimal invasiv** zumutbar. Aufgrund des jungen Patientenkollektivs und der entwicklungsbedingten eingeschränkten Kommunikation jedoch zumeist nur stationär zu erzielen.

Da Entwicklungsstörungen und ihr unterschiedlicher Verlauf zu lebenslangen Einschränkungen und Behandlungskosten führen ist diese Vorgangsweise durchaus gerechtfertigt. Mit den Ergebnissen können Ursache, Wiederholungsrisiko, Prognose und Therapieoptionen besser erarbeitet werden und unnötige, langwierige Untersuchungen vermieden werden, sowie spezifische Unterstützungen beantragt und Spezialisten hinzugezogen werden.

In der folgenden statistischen retrospektiven Analyse meiner Arbeit ist eine ähnliche Vorgangsweise bei der Vorselektionierung des Patientenkollektivs erfolgt, bei denen eine humangenetische Untersuchung in Anspruch genommen wurde.

6 Forschungsfrage

In der Einleitung erfolgt eine ausführliche Darstellung verschiedenster humangenetischer Methoden und ihre Entwicklung von traditionellen Methoden bis hin zu modernsten Technologien.

Um Kindern mit Entwicklungsproblemen eine fundierte Klärung und damit eine optimale weitere Betreuung zukommen zu lassen, ist an der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters in spezifischen Fragestellungen auch eine genetische Untersuchung in die Wege geleitet worden. Assoziationen ihrer

Ergebnisse, der Indikation und der klinischen Symptomatik haben das Interesse für die Möglichkeiten der Humangenetik entstehen lassen.

Bezogen auf den aktuellen Forschungsstand und der Auseinandersetzung mit sehr verschiedene humangenetischen Methoden und ihrer Indikation bei der Klärung neuropädiatrischer und neuropsychiatrischer Krankheitsbilder, ist folgende Hypothese dazu entstanden.

Meine Hypothese ist: Die humangenetischen Befunde an der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters spiegeln die Entwicklung moderner Untersuchungstechniken durch eine Änderung im Schwerpunkt der Fragestellung von neuropädiatrischen zu neuropsychiatrischen Krankheitsbildern wider.

Die Anfragen ändern sich von monogenen Krankheiten zu komplexeren heterogenen, multifaktoriellen Störungsbildern.

Bei konkreter klinischer Verdachtsdiagnose oder bekanntem Erbgang erfolgt eine zielgerichtete Suche in spezifischen Bereichen des Erbgutes, dabei können konventionelle Untersuchungsmethoden ausreichend sein.

Bei unklaren mentalen Retardierungssyndromen, globalem Entwicklungsrückständen oder Epilepsiesyndromen werden molekulargenetische genomweite Untersuchungen, mit erweitertem Spektrum benötigt.

Die Klärung seltener entwicklungsneurologischer und neuropsychiatrischer Krankheitsbilder, mit sehr heterogener und multifaktorieller Ätiologie und einer großen Anzahl von Kandidatengenen ist den modernen Methoden, dem „Next Generation Sequencing“ vorbehalten.

Da Entwicklungsfortschritten einen bestimmten phasenhaften Ablauf mit individuellen Abweichungen zeigen, werden sie oft erst spät erkannt. Ein verspätetes Erreichen einzelner Entwicklungsphasen wird zu Beginn als Entwicklungsverzögerung definiert und mit entsprechender Förderung, ein rasches Aufholen versucht (Steinhausen, 2001).

Trotz zahlreicher Screening Methoden über den Mutter-Kind-Pass, werden Bewegungsstörungen, Sprech- und Sprachstörungen erst verspätet von Eltern und

Ärzten als bleibende Abweichung erachtet und einer Diagnostik zugeführt. Ihre große Variabilität führt zu unterschiedlichem Schweregrad und Beeinträchtigung im Alltag. Daraus leitet sich die Indikation für eine humangenetische Untersuchung oft verzögert ab, zumeist erst bei Entwicklungsstörung mit zusätzlichen Dysmorphien oder kognitiven Einschränkungen, vor allem aber bei Verhaltensstörungen.

7 Methodik

7.1 Datenmaterial:

Die Rekrutierung des Datenmaterials erfolgt über jene Patienten/innen, bei denen im Rahmen der neuropädiatrischen Diagnostik an der Abteilung eine humangenetische Untersuchung erfolgte. Da Kärnten über kein eigenes molekulargenetisches Labor verfügt, erfolgt der Versand des Probenmaterials (Blutprobe) über das hauseigene Labor an die Humangenetik Graz, in spezifischen Fragestellungen auch an andere Zentren in Österreich.

Evaluiert werden in dieser Arbeit nur jene Befunde, die in den letzten sechs Jahren (2013-2018) von der Abteilung Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters am LKH Klagenfurt an die Humangenetik Graz versandt wurden.

Gesucht wird nach den Zusammenhängen zwischen klinischer Symptomatik, Verdachtsdiagnose und Indikation für eine entsprechende humangenetische Methode.

Aus der Dokumentenanalyse geht den meisten dieser Befunde eine fundierte klinische neuropädiatrische Untersuchung voraus mit den begleitenden strukturellen Befunden und Laborergebnissen. Allen voran eine Wiederholung der Stoffwechselfparameter, da trotz Neugeborenen Screening davon ausgegangen wird, dass einige dieser Patienten/innen davon nicht erfasst wurden, da sie nicht in Österreich zur Welt kamen. Auch die zusätzlichen Informationen aus der Dokumentenanalyse, über familiäre Häufung, das Verwandtschaftsverhältnis, perinatale Risikofaktoren und soziodemografische Daten der Familie, gehen in die Interpretation ein und erfolgen anonymisiert. Das Alter zum Zeitpunkt der Erfassung in Jahren und Monaten ist wesentlich, um Verdachtsdiagnose und den humangenetische Befund wird mit den klinischen Symptomen in Zusammenhang zu bringen. Für die weitere Interpretation

werden neben Kognition und Entwicklungsstand auch die zugehörigen auffälligen organischen Befunde miteinfließen.

7.2 Inklusions- und Exklusionskriterien:

Insgesamt fließen in die Analyse zytogenetische- und molekulargenetische Befunde ein, die zwischen 2013 und 2018 an der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters im LKH Klagenfurt abgelegt wurden und über die Humangenetik Graz erstellt wurden.

Die gesammelten Befunde nach Exklusion stammen von insgesamt 49 Kindern und Jugendlichen im Alter von 6 Monaten bis 21 Jahren.

Inkludiert werden Fragestellungen nach Entwicklungsrückstand, mentaler Retardierung, schwer verlaufenden Epilepsiesyndromen und neuropsychiatrische Krankheitsbilder, mit Verhaltensauffälligkeiten aus dem Autismus Spektrum oder eine ADHS.

Exkludiert werden unvollständige Ergebnisse oder fehlende Befunden aus der Krankenakte, sowie Befunde anderer Humangenetischer Zentren.

Die retrospektive Datenauswertung wurde von der Ethikkommission des Landes Kärnten befürwortet. Mit 24.5.2019 ist das Votum erfolgt (**A25/19**).

8 Auswertung

Die Auswertung der Deskriptiven Statistiken erfolgt mit dem Statistikprogramm SPSS Version 22.

8.1 Soziodemographische Daten

Alter:

Die Stichprobe setzt sich aus 49 Personen zusammen, 29 Burschen (59 Prozent) und 20 Mädchen (40 Prozent).

Die Altersverteilung rangiert von 6 Monaten bis 21 Jahren, davon waren 39 Personen weniger als 10 Jahre alt, neun waren unter 18 Jahren und ein junger Erwachsener

darüber, da Patienten/innen mit Beeinträchtigungen über das 18 Lebensjahr hinweg von Kinderärzten und Neuropädiatern oftmals weiter behandelt werden.

Davon werden drei dem Kleinkindalter zugeordnet, 21 Kinder fallen in das Vorschulalter zwischen 2-5 Jahren und 22 gelten als Schulkinder zwischen 10-14 Jahren. Von der Auswertung werden auch drei Jugendlichen erfasst, einer gilt mit 21 Jahren bereits als junger Erwachsener.

Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der genetischen Untersuchung liegt bei 6,7 Jahren, somit im **Vorschul-und Schulalter**, wie nachfolgende Grafik zeigt. Die Standardabweichung beträgt $SD=5.52$, bei einer Spannweite von 0,5 - 21 Jahren.

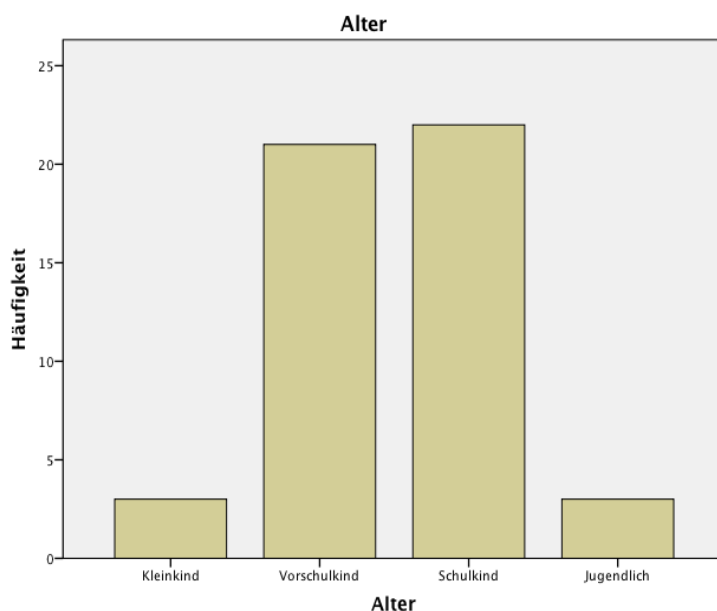


Abb.9: **Altersverteilung** bezogen auf den Untersuchungszeitpunkt der deskriptiven statistischen Auswertung mit SPSS

Motorische Entwicklungsdefizite:

In die Analyse sind entsprechend der Exklusionskriterien, insgesamt 49 Patienten/innen eingegangen.

Davon zeigen 23 Kinder milde motorische Symptome (46 Prozent), ein männliches Kleinkind schwere motorische Beeinträchtigung, in 51 Prozent (25) der Fälle werden in der Dokumentenanalyse keine motorischen Phänomene erwähnt.

Somatische Auffälligkeiten:

49 Prozent zeigen begleitende somatische Auffälligkeiten wie eine Mikrocephalie oder eine Adipositas. Zwei Burschen weisen einen Hochwuchs auf, bei einem ist ein Minderwuchs dokumentiert.

Sprache und Kommunikation und Kognition:

Sprachliche Auffälligkeiten treten in dieser Stichprobe am häufigsten auf, insgesamt bei 85 Prozent der Untersuchten.

Bei 15 Kindern wird ein Sprachentwicklungsrückstand beschrieben, bei 10 Kindern wenig bis keine Sprachentwicklung und eine zusätzlich kognitive Beeinträchtigung beschrieben. 17 Kindern weisen zusätzlich zu den Sprech- und Sprachauffälligkeiten mangelnde soziale Kompetenzen auf. Diese Gruppe zeigt damit jene Auffälligkeiten im Sozialkontakt auf, die eine Autismus Spektrum Störung definieren.

Bei nur sieben Kindern finden sich keinerlei Hinweise auf kommunikative oder sprachliche Defizite.

Verhaltensauffälligkeiten:

Neben den Entwicklungsdefiziten werden in der Auswertung bei 27 Kindern keinerlei zusätzliche psychiatrische Symptome erfasst. Die restlichen 45 Prozent der Kinder und Jugendlichen zeigen in 18 Prozent (9 Kinder) aggressive Verhaltensweisen. Fünf zeigen stereotype Verhaltensweisen und bei acht Kindern werden Hinweise auf Angst und Depression gefunden.

Dies veranschaulicht auch folgende Grafik.

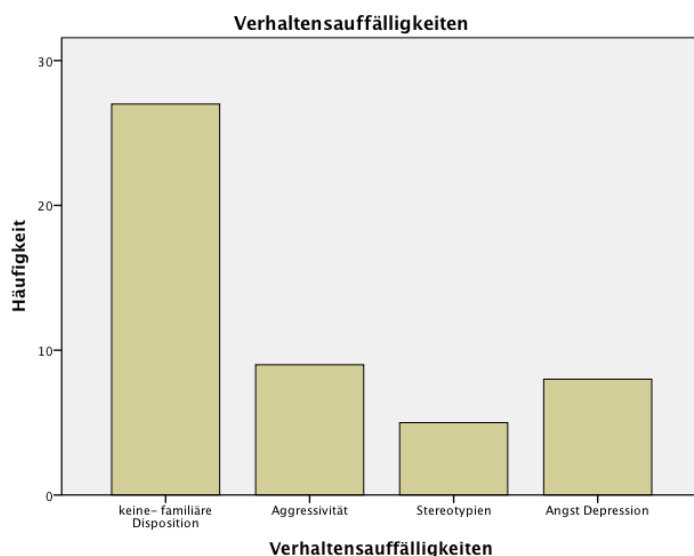


Abb.9: **Verhaltensauffälligkeiten** entsprechend der deskriptiven statistischen Auswertung mit SPSS

Epilepsien:

In mehr als 80 Prozent werden keine Anfälle oder Auffälligkeiten im EEG (Elektroenzephalogramm) in der Dokumentenanalyse gefunden.

Bei sechs Kindern ist die Anfallsanamnese positiv, bei einigen wird auch eine antiepileptische Medikation erwähnt.

Bildgebung:

Bei mehr als 50 Prozent (29) der Kinder kann in der Krankenakte keine Bildgebung gefunden werden. Bei den übrigen 15 Personen der Patienten/innen sind die MRT Befunde (Magnetresonanztomographie des Neurocraniums) unauffällig und in 10 Prozent (5 Befunde) werden verschiedene Auffälligkeiten beschrieben. Einmal wird eine Chiari Malformation beschrieben, zweimal eine Pinealiszyste als Zufallsbefund erwähnt und einmal eine kleine Arachnoidalzyste dokumentiert.

Bei einem männlichen Kleinkind wird eine Hirnatrophie beschrieben, diese am Hintergrund einer Kindesmisshandlung mit den zusätzlichen entsprechenden Auffälligkeiten eines „battered child“ - Syndroms mit einer Schädelfraktur und subduralen Blutungen.

Heredität:

Leider sind in der Dokumentenanalyse nur wenige Informationen zum Stammbaum erhältlich. Von den 49 analysierten Personen sind bei 40 Fällen keine Einträge zur Testung weiterer Familienmitglieder vorhanden. In einem Fall mit positiver genetischer Testung innerhalb der Familie, ist in der Kontrolle der Patientin keine ähnliche Veränderung gefunden worden.

In sechs weiteren Fällen ist das positive Ergebnis der getesteten Kinder und Jugendlichen auch bei anderen Familienmitgliedern gefunden worden.

In einem Fall mit klinisch unauffälliger Kindesmutter jedoch als nicht kausal erachtet worden.

9 Ergebnisse

9.1 Ergebnisse bezogen auf die klinische Symptomatik:

In der Stichprobe der 49 Kinder bezogen auf motorische und sprachliche Defizite sowie psychiatrische Symptome, zeigen 27 Kinder **keinen** positiven humangenetischen Befund, vier davon trotz positiver Familienanamnese

22 Patienten/innen zeigen ein **positives** Ergebnis, bei elf Kindern stehen die gefundenen Veränderungen und die beschriebene Klinik, nach Abgleich mit verschiedenen Datenbanken in kausalem Zusammenhang.

Vier Resultate gelten als fraglich pathogen und bei den restlichen sieben wird trotz positiven Ergebnissen kein kausaler Zusammenhang genannt.

Dazu zählen möglicherweise jene bisher noch unbekanntes Mikrodeletionssyndrome, die über eine molekulare Karyotypisierung (Array Technik) mit höherer Auflösung gefunden werden. Beim Vergleich mit ähnlichen genotypischen Veränderungen können sie keinem Phänotyp zugeordnet werden, oder zum aktuellen Zeitpunkt sind in den gängigen Datenbanken bisher keine ähnlichen Fälle erfasst worden.

Jene 45 Prozent der Befunde mit genetischen Auffälligkeiten setzen sich aus vier Befunden der Humangenetik Graz zusammen, mit einem möglichen kausalem Zusammenhang und 11 Ergebnissen mit Zuordnung zu einer kausalen Veränderung, mit zum Teil Erklärungen und Verweise auf einzelne Literaturstellen.

Bei den positiven Ergebnissen mit **fraglich kausalem** Zusammenhang, zeigen drei Kinder milde motorische Phänomene, ein Kind weist Stereotypien auf. Bezogen auf die psychiatrischen Symptome zeigt ein Kind aggressive Verhaltensweisen, einer der Jugendlichen zeigt internalisierende Verhaltensweisen, wie Angst und depressive Symptome, die beiden anderen positiven Resultate stehen mit keinerlei auffällige Verhaltensweisen in Verbindung.

Bei den sprachlichen Phänomenen werden davon bei drei Kindern ein Sprachentwicklungsrückstand beschrieben, bei einem weiteren Kind zusätzlich kognitive Einbußen erwähnt. Keine/r in dieser Gruppe weist ein Problem in der sozialen Interaktion auf.

Bei nur einer Patientin wird die Untersuchung auf Grund einer familiären Disposition durchgeführt und ergibt keinen Hinweis für eine genetische Veränderung.

In der Gruppe der **als kausal erachteten positiven genetischen Veränderungen** weisen zwei Kinder milde motorische Probleme auf, zwei davon zeigen Stereotypien und sieben andere zeigen keinerlei motorische Auffälligkeiten.

Bei den psychiatrischen Symptomen zeigt eine Patientin Ängste und Zwänge, zwei werden als aggressiv erlebt und bei den restlichen Kindern werden keinerlei Hinweise auf Verhaltensauffälligkeiten beschrieben.

In der Gruppe der Sprech- und Sprachprobleme und kommunikativen Defizite werden drei Kinder mit Sprachentwicklungsrückstand zugeordnet, zwei mit zusätzlich kognitiven Einbußen und vier Kinder mit Störungen der Sprache und der sozialen Interaktion, zwei mit familiärer Disposition.

9.2 Ergebnisse bezogen auf Symptomatik und Genetik

Gesamt betrachtet zeigen bezogen auf die Indikation zur genetischen Untersuchung weniger untersuchte **Vorschul- und Schulkinder** motorische Auffälligkeiten. Bei 25 von 49 werden keine Probleme in der Dokumentenanalyse gefunden.

Bei den psychiatrischen Symptomen zeigen 27 Kinder keine Hinweise, bei den restlichen 22 rangieren die beschriebenen Symptome ziemlich gleichmäßig über aggressives Verhalten, Stereotypien bis hin zu internalisierenden Symptomen mit Angst und Depression. Altersbezogen zeigen sich aggressive Symptome häufiger bei den Schulkindern.

In der Gruppe der sprachlichen -und kommunikativen Störungen zeigen nur sieben Patienten/innen keinerlei Symptomatik, bei 15 von den 49 Kindern wird ein Sprachentwicklungsrückstand beschrieben, bei 10 Kindern kognitive Beeinträchtigung erwähnt und bei 17 Kindern werden neben sprachlichen Auffälligkeiten auch Schwierigkeiten in der sozialen Kommunikation gefunden.

9.2.1 Zusammenfassende Befunde von Klinik und Genetik

Mit verschiedenen humangenetischen Methoden werden 22 positiven Ergebnisse erzielt. Aus diesen Zuweisungen von Entwicklungsstörungen und mentalen Beeinträchtigungen im Kindes- und Jugendalter kann in **elf** Fällen eine **kausale Ursache** gefunden werden. In sieben Fällen ergeben sich trotz positivem Befund keine Genotyp-Phänotyp Korrelation. In vier Verdachtsfällen kann, das dokumentierte phänotypische Erscheinungsbild nicht eindeutig zugeordnet werden.

Dabei gelten Entwicklungsstörungen der Sprache, der kommunikativen Fähigkeiten und damit verbundenen Einbußen der kognitiven Entwicklung als **häufigste Zuweisungen** für humangenetische Untersuchungen.

Bezogen auf die **Altersverteilung** werden Entwicklungsstörungen der Motorik, vor allem aber der Sprache im Vorschulalter häufiger gefunden, Verhaltensauffälligkeiten treten hierbei im Jugendalter öfters in Erscheinung.

9.3 Ergebnisse bezogen auf Somatische Symptome und EEG

Obwohl Entwicklungsstörungen häufig mit EEG Veränderungen (Elektroenzephalographie) und/oder Epilepsie eiergehen, werden nur in 12 Prozent (bei 6 Kindern) Auffälligkeiten erwähnt.

Auch begleitende körperliche Auffälligkeiten werden nur in 49 Prozent (bei 24 Kindern), somit bei weniger als der Hälfte der untersuchten Kinder gefunden und zumeist als Veränderungen der Größenparameter beim Hochwuchs oder mit vermindertem Kopfumfang als Mikrocephalus, beschrieben. Faciale Auffälligkeiten oder andere Fehlbildungen werden selten erwähnt.

Eine Erklärung hierfür wäre, dass diese bereits im Neugeborenenalter und somit der Kinderabteilung auffallen und eine humangenetische Zuordnung zu einem Syndrom damit bereits viel früher erfolgt ist

9.4 Ergebnisse bezogen auf die verwendeten humangenetischen Methoden und klinische Symptomatik:

Konventionelle Zytogenetik:

Bei den angewandten Methoden wurde von den 49 untersuchten Kindern bei 35 davon ein Karyogramm in der Krankenakte gefunden.

Von den 22 **positiven** humangenetischen Befunden war in **drei** Fällen bereits das Karyogramm auffällig.

In einem dieser Fälle wurde zum damaligen Zeitpunkt (2013) auf eine weitere Untersuchung verzichtet. Bei diesem Patienten findet sich eine numerische gonosomale Chromosomenveränderung in engem Zusammenhang mit der entsprechenden Symptomatik eines **Klinefelter-Syndroms** (47, XXY) und ist damit im Karyogramm bereits klar ersichtlich (siehe auch Kapitel 3.2.2).

Ein weiterer männlicher Patient zeigt eine numerische Veränderung der Geschlechtschromosomen durch eine 47 XYY Konstellation auf. Dazu wird in der Literatur ein unklarer kausaler Zusammenhang beschrieben. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich mittels Array Technik bestätigt. Bei beiden Patienten wird neben den psychiatrischen externalisierenden Verhaltensweisen auf somatischer Ebene ein Hochwuchs erwähnt.

Bei letzterem besteht neben der chromosomalen Veränderung einer **47 XYY Konstellation** auch eine Minderbegabung und im Jugendalter sind zuletzt psychiatrische Verhaltensweisen mit vorwiegend aggressiven und impulsiven Durchbrüchen hinzugekommen mit mehreren Krisenaufnahmen. Durch die umfassende psychologische und humangenetische Testung war es rascher möglich, eine entsprechende Beschulung mit sonderpädagogischem Förderbedarf zu etablieren und eine entsprechende institutionelle Betreuung im Rahmen der Behindertenhilfe in die Wege zu leiten. Für die Kindesmutter hat die genetische Untersuchung damit zu einer wesentlichen Entlastung beigetragen, die schon im Schulalter durch das rasante Größenwachstum und die psychiatrischen Verhaltensweisen mit ihm körperlich überfordert war. Große Schwierigkeiten zeigten sich auch durch die Diskrepanz der körperlichen und mentalen Entwicklung mit den Gleichaltrigen, die ihm sprachlich und kognitiv überlegen waren. Auch ohne kausalen Zusammenhang ist durch den positiven humangenetischen Befund eine Erklärung der

Problematik für die Familie möglich gewesen und die Diagnose einer numerischen gonosomalen Veränderung, entlastend erlebt worden. Gesundheitspolitisch war dadurch auch die Umsetzung der entsprechenden Förderungen leichter möglich.

Molekulare Karyotypisierung:

Am häufigsten wird die Array-Technik gewählt. Bei 49 untersuchten Kindern kommt die Array Methode in 43 Fällen zur Anwendung, alleinig oder in Kombination mit einem Karyogramm oder einer weiteren Bestätigung durch eine nachfolgende PCR Methode oder eine Sequenzierung.

In sechs Fällen zeigt die Sequenzierung kein positives Ergebnis oder eine kausal zusammenhängende Veränderung, in zwei Fällen wird von einer möglichen kausalen Veränderung gesprochen, dies mit dem Hinweis auf verschiedene Datenbanken.

9.4.1 Zusammenfassende Ergebnisse der humangenetischen Methoden:

Von den 22 **positiven** humangenetischen Ergebnissen erfolgten drei über das Karyogramm, einer konventionellen zytogenetischen Untersuchungsmethode.

Die restlichen positiven Ergebnisse (20) sind mittels Array Technik alleinig oder als bestätigende Methode erfolgt. Dies zeigt auch die folgende Abbildung.

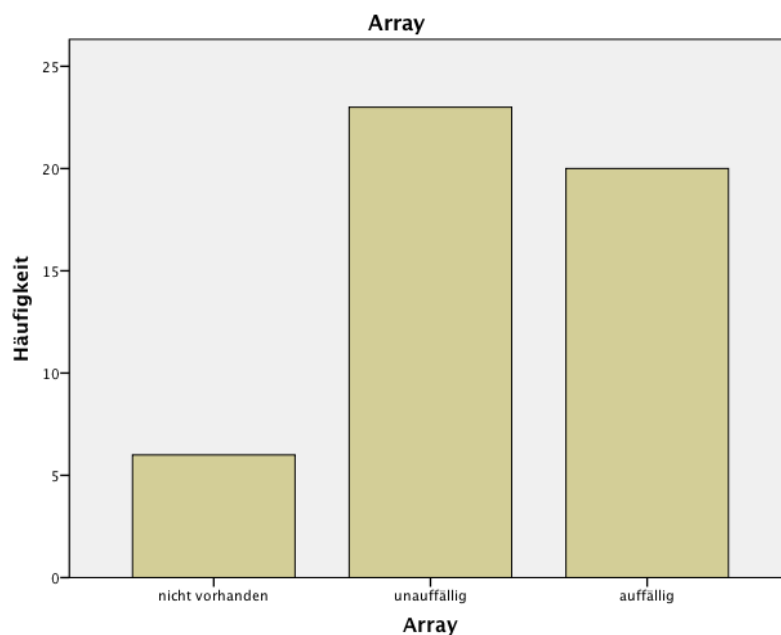


Abbildung 11: **Detektionsrate** mittels Array-Technik bezogen auf die auffälligen Ergebnisse entsprechend der deskriptiven statistischen Auswertung mit SPSS.

Mit der Array Technik resultiert eine ausreichend hohe Detektionsrate, die über die zuletzt noch in 2018 verwendete Agilent Methode eine durchschnittliche Auflösung von 124,5 Kb erzielt.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass in der Suche nach zugrundeliegenden Ursachen unklarer Entwicklungsstörungen die Array-Technik weiterhin eine vorrangige Stellung an unserer Abteilung einnimmt.

Als genomweite Screening Methode können damit erste Auffälligkeiten detektiert werden und weiterführende zusätzliche Methoden zur Bestätigung oder weiteren Abklärung angeschlossen werden.

Als weitere konventionelle Untersuchungen werden die FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) erwähnt sowie die RT-PCR Methode (Real Time Polymerase Kettenreaktion), die zumeist zur quantitativen Bestätigung des Mikrodeletions-Duplikationsausmaßes (Anzahl der betroffenen Basenpaare in Kb) bei familiären Untersuchungen oder bekannter Veränderung bei einem weiteren Familienmitglied zur Anwendung kamen.

In spezifischen Fragestellungen ist in den letzten Jahren bereits eine **Sequenzierung** erfolgt, um damit die Aminosäuresequenz der betroffenen Region und ihre Genveränderung detailliert bestimmen zu können.

In acht Fällen betreffen die submikroskopischen Veränderungen Regionen mit **Genveränderungen**. Davon werden in 5 Fällen je zwei Gene genannt, einmal sind 4 Gene von einer Duplikation betroffen und zuletzt auch einmalig bis zu 6 Gene erfasst worden.

9.4.2 Ergebnisse bezogen auf die Entwicklung in der Humangenetik:

Während im ersten Untersuchungsjahr viele Blutproben versandt wurden und daraus nur wenige positive Ergebnisse erzielt wurden, zeigen die Jahren 2017-2018 deutlich mehr positive Ergebnisse, bezogen auf die Anzahl der Einsendungen.

Von den 16 Anforderungen 2013 waren nur 5 positiv. Im Jahr 2014 sind aus organisatorischen Gründen (Dokumentation) keine Einträge vorhanden. Im Jahr 2015

wurden neun Anforderungen nach Graz versandt, davon kamen fünf positive Ergebnisse zurück. Im Jahre 2016 waren es zwei von acht Einsendungen. 2017 wurden von acht Verdachtsfällen vier bestätigt und im Jahr 2018 von neun Einsendungen sechs positive Ergebnisse rückgemeldet.

Damit kann in jüngster Zeit von einer **präziseren Vorselektionierung** mittels klar definierter Verdachtsdiagnose ausgegangen werden.

Dies ist aus der nachfolgenden Tabelle1 auf Seite 77 ersichtlich und mit folgender grafischer Abbildung über die Häufigkeit der jährlichen Anforderungen gut nachvollziehbar.

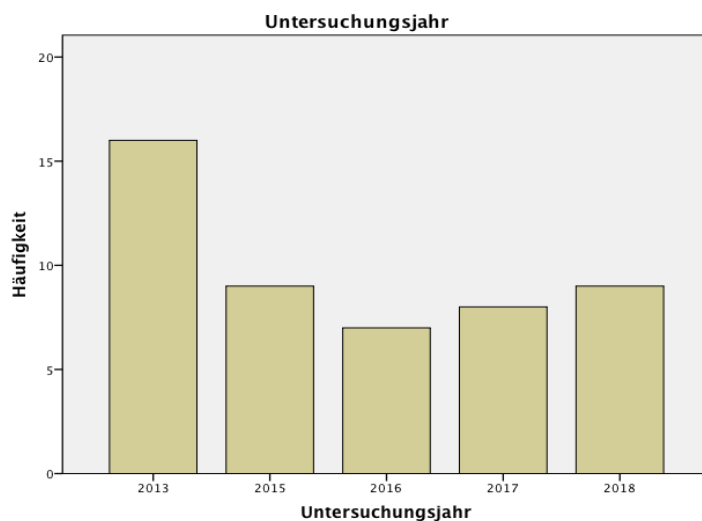


Abbildung 11: **Häufigkeit der angeforderten humangenetischen Untersuchungen** bezogen auf einzelne Jahre (Deskriptive Statistik) das Jahr 2014 enthält keinerlei Einträge.

9.5 Ergebnisse bezogen auf Kausalität und klinisches Erscheinungsbild

Im Jahr **2013** ergab die Untersuchung eines Geschwisterpaares eine Duplikation am Chromosom 22 im Ausmaß von 3,16 Mb. Diese Veränderung wird über OMIM als kausal für die phänotypischen Auffälligkeiten, die Entwicklungsverzögerung und Lernschwierigkeiten angenommen, wobei eine inkomplette Penetranz bei diesem **22q11.2 Duplikationssyndrom** erwähnt wird (OMIM: #608363). Davon ist auch der Kindesvater betroffen, die Kindesmutter und eine untersuchte Schwester zeigen negative Befunde.

In anderen Fällen die Aussage zum Stammbaum und dem Vererbungsmuster nur eingeschränkt möglich, da zahlreiche Befunde von Familienmitgliedern nicht auffindbar sind. Diese wurden zum Teil extern in die Wege geleitet und sind daher nachträglich nicht entsprechend eingelangt oder dokumentiert worden.

Aus den wenigen vollständigen Befunden einzelner Familien, ist die Heredität dieser Veränderungen ersichtlich, in einem Fall die Symptomatik aber als nicht kausal erachtet worden, da die ebenfalls betroffenen Mutter trotz Veränderung keinerlei Symptomatik aufweist.

Im Jahr **2015** wird mittels Karyogramm ein **Klinefelter-Syndrom** (siehe auch Kapitel 3.2.2) festgestellt und passend zur Klinik als kausal erachtet, daher auf eine weitere Bestätigung mit anderen humangenetischen Methoden verzichtet, während die numerische Veränderung einer 47XYY Konstellation ohne kausalen Zusammenhang mit der Intelligenzminderung und den psychiatrischen Verhaltensweisen gilt (s. auch Kapitel 9.4).

Ein weiteres positives Ergebnis (Dup10q26.3 und Del12q24.33) gilt zwar nicht kausal für die beschriebenen psychiatrischen Verhaltensweisen und die Intelligenzminderung eines mittlerweile jungen Erwachsenen, aber das enthaltene Gen POLE1 der Deletion des Chromosoms 12 im Ausmaß von 1,2 Mb wird für **Colonadenome** verantwortlich gemacht. Daher ist in diesem Fall eine zweite Beratung der Familie erfolgt und entsprechende Vorsorgeuntersuchungen in die Wege geleitet worden. Diese Empfehlung ist auch für den Kindesvater erfolgt, der dieselbe Mutation trägt.

Eine weitere Duplikation am langen Arm vom Chromosom 6q21 im Ausmaß von 446 Kb betrifft 6 Gene in dieser Region. Vergleichbare Einträge in den Datenbanken erklären die phänotypischen Auffälligkeiten mit Gesichtsdysmorphien und globalem Entwicklungsrückstand. Auf Grund der vorwiegend sprachlichen Defizite wurden die Symptome einem **tiefgreifenden Autismus** zugeordnet.

Im Jahre **2016** wird eine SLC4A2 Veränderung (Biosynthese von Melanin), die mittels Sequenzierung bestätigt wird, ursächlich mit den klinischen Symptomen einer hellen Haut und einem Nystagmus in Verbindung gebracht. Dieser familiäre **okulokutane Albinismus** (Typ 4) tritt auch bei den Geschwistern in Erscheinung und kann bei der Kindesmutter bestätigt werden. Da ein konsanguines Verwandtschaftsverhältnis der Kindeseltern, die nicht aus Europa kommen, aus dem Stammbaum wahrscheinlich ist,

erfolgt die weitere Beratung der Familie über die Humangenetik Graz, wo eine dermatologische Vorsorge der gesamten Familie nahegelegt wird.

Ein zweiter positiver Befund in diesem Jahr weist eine Duplikation am Chromosom 16 auf im Ausmaß von 205 Kb auf und wird für den klinisch erhobenen Entwicklungsrückstand der Patientin verantwortlich gesehen. Die von der Duplikation betroffenen Regionen mit LCR`s (low copy repeats) stehen mit Symptomen einer Autismus Spektrum Störung in Einklang und erklären damit **die auffällige Sprachentwicklung** auch den niedrige BMI und reduzierten Allgemeinzustand.

Im Jahr **2017** wird eine Deletion am Chromosom 15 (Del15q13.2) als kausal erachtet und die betroffenen Region BP4,5 mit den sprachlichen Auffälligkeiten in der Anamnese in Verbindung gebracht bei insgesamt **globalem Entwicklungsrückstand**.

Drei weitere Mutationen werden nur als möglich verursachend gesehen und werden daher klinisch nicht beschrieben.

Im letzten Untersuchungsjahr **2018** waren von neun Einsendungen **sechs** humangenetische Befunde **positiv** und davon **vier kausal** für die Klinik verantwortlich. Darunter findet man zwei Deletionen am Chromosom 15q11.2 im Ausmaß von 395 Kb. Dieses **Mikrodeletionssyndrom 15q11.2** liegt zwischen den Bruchpunkten BP1 und 2 der Prader-Willi- und Angelman-Syndrom kritischen Region und enthält vier Gene (TUBGCP5, NIPA1, NIPA2 und CYFIP1) die nicht dem Imprinting unterliegen und denen neurologische- und verhaltensmodulierende Funktionen zugesprochen werden. Damit ist jener epigenetische Mechanismus gemeint, der durch Methylierung einzelne Gene stilllegen kann. Epigenetische Mechanismen spielen bei der Gen-Umwelt Interaktion eine große Rolle. Diese Veränderung steht bei einem Vorschulkind mit der entsprechenden Sprachentwicklungsverzögerung und mentaler Beeinträchtigung in Zusammenhang, die den Besuch eines Förderkindergartens notwendig macht. Über positive psychosoziale Rahmenbedingungen und gesundheitsbewusstem Umgang werden epigenetischen Mechanismen auch reversible Eigenschaften zugesprochen und können damit die therapeutischen Einflüsse erklären.

Bei einem weiteren Buben gilt die Deletion derselben Region (15q11.1-11.2) im Ausmaß von 2,6 Mb nicht als Ursache für die beschriebene Klinik eines Entwicklungsrückstandes.

Die Duplikation an selber Stelle (Dup 15q11.2) im Ausmaß von 276 Kb wird bei einem Jugendlichen für die beschriebene ASS in Form eines **Asperger-Autismus** jedoch wieder als kausal gesehen.

Bei einem weiteren Patienten wird die Duplikation am Chromosom 11q14.1-q 22.1 im Ausmaß von 18 Mb bereits im Karyogramm detektiert und mit Array-CGH bestätigt. Eine familiäre Vererbung durch die Bestätigung der Symptomatik und derselben genetischen Veränderung bei der Kindesmutter erhärten die kausale Ursache für die Verhaltensstörung, die Symptome einer **Aufmerksamkeitsdefizit Störung (ADHS)** und die schulischen Leistungsprobleme.

Mittels Array Technik wird eine Duplikation am Chromosom 11q24.3-q25 im Ausmaß von 885 Kb gefunden ohne weitere klinische Relevanz. Bei klinischem Verdacht kann erst mittels NGS (TruSight One) die Genveränderung am ATP7B (Kupfertransporter) nachgewiesen werden und für die Symptome eines **Morbus Wilson** kausal geltend gemacht werden.

Bisher weist die erst Dreijährige noch keine typischen Augenveränderungen auf, auch das MRT noch unspezifisch und entsprechenden Laborbefunde mangels Kooperation nur bedingt vorhanden. Ein niedriger Coeruloplasminspiegel im Serum spricht dafür, die Kupferausscheidung im Harn ist bei der kleinen Patientin leider nicht gelungen.

9.6 Zusammenfassung der Ergebnisse:

Bezogen auf die angenommene Hypothese, humangenetischen Befunde an der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters spiegeln die Entwicklung moderner Untersuchungstechniken durch eine Änderung im Schwerpunkt der Fragestellung von neuropädiatrischen zu neuropsychiatrischen Krankheitsbildern wieder, kann über die Ergebnisse dieser **retrospektiven Analyse** durchaus bestätigt werden.

In den ersten Jahren (2013-2016) wurden bei konkreten Fragestellungen konventionelle humangenetische Methoden eingesetzt und damit vorwiegend

monogenen Krankheiten diagnostiziert. Mit der Modernisierung sind in den letzten beiden Jahren vermehrt neuropsychiatrische Krankheitsbilder einer humangenetischen Untersuchung zugeführt worden. Somit erfolgt eine Änderung der Anforderungen von monogenen zu komplexeren heterogenen, multifaktoriell bedingten Störungsbildern, wenngleich hier die kausale Ursache nicht immer erzielbar ist.

Mit der Etablierung der **Array-Technik** zeigen daher die untersuchten Entwicklungsstörungen mit neurologischer Symptomatik oder begleitenden neuropsychiatrischen Symptomen in 45 Prozent ein positives Ergebnis, wobei der kausale Zusammenhang nur in 11 Fällen gegeben ist. Weitere vier werden als möglich kausal erachtet. Die restlichen sieben Fälle mit positivem humangenetischem Befund gelten zum derzeitigen Wissenstand nicht als Ursache für die Verdachtsdiagnose.

Zahlreiche Mikrodeletionen- und Duplikationen stehen laut Recherchen in verschiedenen Datenbanken nicht in engem Zusammenhang mit den beschriebenen Symptomen und gelten daher nicht allein als kausale Ursache hierfür (Speer und Gahr, 2018).

Dies kann auch mit nachfolgender Tabelle gezeigt werden.

Alter	KARYO	ARRAY	SANGER/NGS/ PCR/FISH	ERGEBNIS	HEREDITÄT
2013				5/16	
1,2	46XX	Dup 16p11.2		Pos	
12,1		Del 1q44		Pos	KM pos aber gesund
6,1		Dup22q11.2		Pos- kausal	KV und Bruder pos.
8,3		Dup22q11.2		Pos- kausal	Schwester pos. Schwester neg
12,5	47XYY	DupY11.32-q12		Pos	
2014				0/0	
2015				5/9	
21	46XY	Dup10q26.3 Del12q24.33	POLE1	Pos	KM neg KV pos
6,6	46XY	Dup6q21	6 Gene	Pos-kausal	
10,7	46XY	Del10q21.3		Pos	
4,7	46XY	Dup1q22.3		Pos	
13,4	47XXY			Pos-kausal	

			2016	2/7	
2,10			MC1Rneg SLC4A2 pos heterozygot	Pos-kausal	KM und Schwester pos
4,8	46XX	Dup16p11.2		Pos-kausal	
2017			4/8		
4,4	46XY	Del15q13.2		Pos-kausal	
7,2	46XX	Dup22q13.2	NGS Nooan neg.	Pos.-kausal?	
3,3	46XX	Dupq13.4		Pos-kausal?	
1,9		DupXq22.31		Pos-kausal?	
2018			6/9		
4,3		Del15q11.2		Pos-kausal	
8,6		Dup8p12		Pos-kausal ?	
9,6	46XY,Du p11q14.1 q22.1	Dup11q14.1		Pos kausal	KM pos KV neg
12,7		Dup15q11.2		Pos	
3,7		Del15q11.1- 11.2		Pos-kausal	
2,10		Dup11q24.3- q25	NGS ATP7B pos.	Pos- kausal AB	

Tabelle 1: **Ergebnisse** vorwiegend mittels **Array Technik** erzielt, zeigen 16 Duplikationen und 6 Deletionen, in 3 Fällen ist auch das Karyogramm auffällig. Ersichtlich auch Zusatzbefunde zur Bestätigung mittels FISH, RT-PCR oder Sequenzierung, sowie die familiäre Komponente.

Bei dieser Studie handelt es sich um eine sehr kleine, vorselektionierte Patientengruppe einer Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters. Die Vorstellungen erfolgten zumeist im Rahmen einer Entwicklungsabklärung oder Verhaltensauffälligkeiten im schulischen Kontext. Daher gehen vorwiegend Lern- und Leistungsstörungen, Defiziten der Sprachentwicklung, der sozialen und kommunikativen Fähigkeiten mit Überlappungen zu neuropsychiatrischen Störungsbildern in die Analyse ein. Diese Kinder zeigen nur wenig begleitenden somatischen Auffälligkeiten und nur vereinzelt strukturelle Veränderungen. Durch die zumeist fehlenden Daten der Kindeseltern können Neumutationen nicht sicher ausgeschlossen werden.

10 Diskussion

Entwicklungsstörungen können sich mit einem milden Verlauf als Lernstörungen manifestieren bis hin zu schweren Retardierungssyndromen und phänotypisch sehr variable auftreten. Die begleitenden Verhaltensstörungen zeigen Überschneidungen mit neuropsychiatrischen Krankheitsbildern und ihrer sehr komplexen Entstehung aus Umwelt und Anlage.

Zahlreiche Krankheitsbilder werden erst durch ihren schwerwiegenden Verlauf und zusätzliche Dysmorphiezeichen einer genetischen Untersuchung zugeführt. Viele neuropsychiatrische Störungsbilder mit polygenetischer Ursache benötigen in der Klärung einen hohen technischen Aufwand und werden aus Kostengründen durch die hohe Anzahl an Kandidatengenen nur bedingt vom Kostenträger bewilligt, da hier ein WES (Whole Exon Sequencing) notwendig wäre.

Andere Syndrome, wie aus der Gruppe der Epilepsien, lassen sich trotz Ausschluss entsprechender Differentialdiagnosen und klarer Verdachtsdiagnose dennoch nicht nur einem einzelnen Genort zuordnen, hier kann mit einem Genpanel die Aufklärung gelingen.

Trotz raschen technischen Fortschrittes in der Humangenetik, gelingt es bei komplexen Krankheitsbildern mit sehr heterogenen Ursachen nicht immer, eine kausale Ursache zu finden. Zusätzliche Umwelteinflüsse und die Erziehung spielen eine zusätzliche Rolle. Mit Bioinformatischer Verarbeitung werden aus den gewonnenen Rohdaten, mögliche pathogenen Mutationen herausgefiltert und mit den Datenbanken abgeglichen. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass genotypische Varianten zu einem späteren Zeitpunkt und durch neue Erkenntnisse phänotypischen Auffälligkeiten zugeordnet werden können.

Die Klärung neuropsychiatrischen Krankheitsbildern mit sehr heterogener und multifaktorieller Ätiologie und einer großen Anzahl von Kandidatengenen ist den modernen Methoden, dem „Next Generation Sequencing“ vorbehalten. Dennoch sind hier die Forschungsergebnisse noch unbefriedigend, da die Objektivität und Zuordnung zu entsprechenden Krankheitsentitäten über die deskriptive Beschreibung nur bedingt gegeben sind. Das Vorkommen von einzelnen Genloci bei zwei oder mehr psychiatrischen Krankheitsbildern gleichzeitig erschwert die Zuordnung.

10.1 Limitationen

Evaluiert wurden all jene Befunde, die an der Abteilung in der fraglichen Zeitdauer erhoben wurden, sofern vorhanden. Leider ist dies nicht für alle Patienten/innen gleichermaßen der Fall. Um „*de novo*“ Mutationen von familiär bekannten Erbgängen abgrenzen zu können, müsste immer das Ergebnis der Eltern vorliegen. Diese Untersuchungen wurden aber nach extern delegiert, daher sind die Ergebnisse zumeist direkt an die Eltern oder an den/die zuweisende/n Kollegen/in aus dem niedergelassenen Bereich ergangen und in der Krankenakte durch ein verspätetes Einlangen, als ausständig oder gar nicht vorhanden, erwähnt worden.

Da es sich bei dieser Arbeit um ein stark vorselektiertes Patientengut aus dem Bereich der Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters handelt, werden vorwiegend Entwicklungsstörungen im Vorschul- und Schulalter erfasst.

Während frühe neurologische Symptome bereits im Kleinkindalter gemeinsam mit somatischen Fehlbildungen oder Epilepsien bereits über die Kinderabteilung auffallen, erfolgen die Vorstellungen an der Abteilung altersbezogen wesentlich später.

Eine Erklärung hierfür ist das Abwarten eines möglichen Aufholens von Entwicklungsschritten, somit werden einige der vorgestellten Kinder erst auf Anraten einer Kindergartenpädagogin oder mit den ersten Schwierigkeiten im Schulalltag vorgestellt.

Dabei stehen nicht immer die Entwicklungsstörungen schulischer Fertigkeiten oder die kognitiven Defizite im Vordergrund. Vielmehr werden Jugendlicher oft erst über die begleitenden psychiatrischen Verhaltensprobleme vorgestellt. Ein Nebeneinander von störenden Verhaltensweisen, Problemen in der sozialen Kommunikation und Beziehungsgestaltung beherrschen das Bild. Über externalisierende Symptome mit einer aggressiven Verweigerungshaltung bis hin zur Neigung von Rückzug und depressiven Symptomen, zeigen sich Übergänge zu internalisierenden Störungen, hinter denen sich auch einige neurologische Defizite manifestieren.

Aus dieser multifaktoriellen Genese eine konkrete Verdachtsdiagnose ableiten zu können, stellt den Neuropädiater/in und den Jugendpsychiater/in vor eine große Herausforderung.

So sind an der Abteilung für Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters in den Jahren 2013-2018 vorwiegend bei sehr konkreten Verdachtsfällen eine zusätzliche humangenetische Untersuchung aus Kostengründen angeordnet worden.

Dies bildet sich auch in der hohen Detektionsrate von 45 Prozent positiver Ergebnisse ab, bezogen auf die Gesamtzahl der angeforderten Untersuchungen.

Eine andere Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass bei sehr heterogenen Erkrankungen trotz familiär gehäuften Auftretens, eine Untersuchung aus Kostengründen nicht erfolgte, oder weil bei vielen neuropsychiatrischen Krankheitsbildern von sehr heterogenen Ursachen ausgegangen wird, die mit den derzeit gängigen Routinemethoden nicht ausreichend erfasst werden.

Daher wird bei vielen Befunden mit fraglich kausalem Ergebnis auf verschiedenste Einträge in Datenbanken verwiesen. Über diese gelingt es möglicherweise in Zukunft einen Zusammenhang phänotypischer Eigenschaften mit denselben Genveränderungen herzustellen.

Bisher konnte über die klinische Symptomatik und Literaturrecherchen eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Eine Hilfestellung, um einige Quellen zu nennen, liefern hierzu verschiedenste Datenbanken (OMIM, Orphanet), ein Blick in Wiedemanns Atlas klinischer Syndrome (Kunze, 2010) oder dem Atlas der Entwicklungsdiagnostik von Baumann (2015), um physiologische Varianten von pathologischen Veränderungen klarer differenzieren zu können.

Für eine genauere Benennung von Merkmalen phänotypischer Besonderheiten oder bereits konkreter klinischer Auffälligkeiten, hat sich im LKH an der Neurologie und Psychiatrie des Kindes- und Jugendalters auch das Softwarepaket Possum Version 5.0 bewährt mit Verbindungen zu OMIM (online Mendelian Inheritance in Man)

POSSUM steht dabei für „picture of standard syndroms and undiagnosed malformations“ und ermöglicht die Suche nach Merkmalen, Syndromen und klinischen Bildern (Murdoch Institute, 1998). Die Seltenheit der Störungsbilder, vor allem aber ihre große Variabilität kann die Zahl der Differentialdiagnosen und den Zusammenhang mit den gefundenen Varianten nahezu unmöglich machen (Müller Jerrentrup und Schäfer, 2018).

Um daher die verschiedensten phänotypischen Erscheinungen mit somatischen Merkmalen, entwicklungsneurologischen und neuropsychiatrischen Symptomen gemeinsam mit auffälligen Laborbefunden oder einer Bildgebung besser einordnen zu können, sind zuletzt zahlreiche Computerprogramme entstanden, wie Phenicons (Mc

Ray et al., 2018) oder der Phenomizer über NCBI (s. Kapitel 4.5). Damit ist es möglich somatische Merkmale, strukturelle Auffälligkeiten oder pathologische Laborbefunde zu vereinen, um daraus mögliche Phänotypen zu betroffenen Genen zu erhalten.

10.2 Abteilungsspezifischer Algorithmus

In Zusammenschau mit den klinischen Ergebnissen, den Literaturempfehlungen und der rasanten Entwicklung humangenetischer Untersuchungsmethoden, hat sich die Entwicklungsabklärung an der Abteilung damit nur unwesentlich verändert. Trotz der hochmodernen Technologie sind einige dieser Möglichkeiten aus Kostengründen nur einzelnen Patientengruppen vorbehalten. Die Indikation und die Finanzierung dieser speziellen Untersuchungsmethoden erfolgt in enger Absprache mit der Humangenetik und deren Entscheidung trifft dabei das Humangenetikboard, ein Expertenteam aus verschiedenen Berufsgruppen.

In der Entwicklungsabklärung sind die Kenntnisse des Entwicklungsverlaufes wesentlich, um Normvarianten von pathologischen Krankheitsbildern abgrenzen zu können. Eine rasche Diagnose bei seltenen genetisch verursachten Entwicklungsstörungen vermeidet unnötige Untersuchungen und ermöglicht Behandlung -und Unterstützungsangebote für Betroffenen und ihre Familie.

Daraus ergeben sich folgende **Vorgehensweisen in der Entwicklungsabklärung**:

Da sehr viele Zuweisungen erst im Vorschul- und Schulalter erfolgen mit Sprachentwicklungsrückstand oder kognitiven Defiziten, über den Kindergarten oder im Zusammenhang mit der Einschulung, erfolgt ein ähnliches Vorgehen wie im Kapitel 5.3 erwähnt auch an der Abteilung.

Über eine ausführliche Anamnese, unter Beiziehung der Informationen aus dem Umfeld (Kindergarten und Schule) werden die Meilensteine der kindlichen Entwicklung erfasst und mit der Familiengeschichte (Stammbaum) abgeglichen. Die körperliche und entwicklungs-neurologische Untersuchung wird durch eine ergotherapeutische und logopädische Diagnostik ergänzt. Verschiedenste psychologische Testverfahren werden für die Erfassung des kognitiven Niveaus eingesetzt und gegebenenfalls bei neuropsychiatrischen Auffälligkeiten durch Fragebögen und Selbstbeurteilungsbögen ergänzt. Bei konkretem Verdacht auf soziale Defizite wird eine psychologisch-

emotionale Diagnostik angeschlossen, mit besonderem Augenmerk auf das Autismus Spektrum (ASS) oder eine hyperkinetische Störung des Sozialverhaltens (ADHS).

Bei Kindern mit zusätzlichen morphologischen oder somatischen Auffälligkeiten wird die Indikation zu einer humangenetischen Untersuchung häufiger gestellt, bei unklaren oder multifaktoriell bedingten Störungen, hier vorrangig mit neuropsychiatrischen Symptomen aus Kostengründen weiterhin eher selten.

Je massiver daher die Symptomatik, wie es bei den tiefgreifenden Entwicklungsstörungen der Fall ist, desto früher und umfassender erfolgt die Abklärung und Diagnosesicherung über interne und externe Möglichkeiten.

Je milder die Lernstörungen desto eher wird vorerst eine Unterstützung durch verschiedene funktionelle Therapien (Ergotherapie, Teilleistungstraining, Förderung der Sozialkompetenzen und Betreuung in einer Wohngemeinschaft) in die Wege geleitet.

Bei anhaltenden, begleitenden Verhaltensstörungen wird aber auch hier zuletzt häufiger eine humangenetische Untersuchung in Erwägung gezogen, wenngleich diese auf dem Gebiet des „high functioning autism“, dem Asperger-Syndrom in der Klärung kognitiver Störungen bei ADHS wenig erfolgversprechend war, wie die Analyse zeigt.

10.3 Ausblick für die Zukunft

Seit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms durch das HUGO (Human Genome Project) im Jahr 2003 hat die Humangenetik eine rasante Entwicklung vollzogen. Neben der Suche nach krankheitsassoziierten Genen und den Möglichkeiten in der Pränataldiagnostik mittels NGS bereits aus dem mütterlichen Blut fetale DNS zu untersuchen, haben sich weitere vielversprechende neue Methoden entwickelt und damit auch Studien über das menschliche Mikrobiom ermöglicht. In der personalisierten Medizin ist es mit diesen bereits möglich, über Veränderungen der Transkriptions – und Translationsprodukte die Funktionszusammenhänge genetisch bedingter Erkrankungen zu erfassen, aber auch epigenetische Methylierungsmuster und deren Einfluss zu verstehen.

Über die Methode der RNA-Sequenzierung gelingt es, das gesamte Transkriptom zu erfassen und über Expressionsprofile einzelner Gene den Phänotyp besser zu

verstehen. Damit werden unterschiedliche Spleißvarianten und Fusionstranskripte identifiziert (Kuß, 2014),

Über das Ribosomenprofiling können Syntheseraten von Proteinen bestimmt werden. Hingegen ermöglicht die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP-Seq) die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren für verschiedene Zielgene und mittels MeDIP-Seq (methylated DNA immunoprecipitation) ist das Methylierungsmuster und damit der Einfluss epigenetischer Mechanismen fassbar.

CpG Regionen, Regionen die reich an den Cytosin- und Guaninbasen sind, findet man vorwiegend in Promotorbereichen und damit ist ihr Einfluss auf die Genregulation verständlich. Ihre Anhäufungen werden oft an jenen Genorten gefunden, deren Mutationen mit neurologischen Störungen oder geistiger Behinderung in Zusammenhang stehen (Kuß, 2014).

Die meisten dieser Methoden sind jedoch der Forschung vorbehalten, da sie an technischen Voraussetzungen von enormen Readlängen ausgehen und einer speziellen Probenaufbereitung bedürfen, aber auch eine hohe Fehleranfälligkeit aufweisen.

11 Literatur

- Aksu Fuat (2011) Neuropädiatrie. *Bremen: Uni-Med. Neuroscience S153-229.*
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2012) Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. *München: WILEY-VCH Verlag S 317-339.*
- Baumann, Thomas (2015). Atlas der Entwicklungsdiagnostik. Vorsorgeuntersuchungen von U1-U10/J1. *Stuttgart: Thieme Verlag S50-62.*
- Bernhard Thomas (2018) Der Untergeher. *Frankfurt: Suhrkamp Taschenbuch S134.*
- Braus, F.D. (2014) Ein Blick ins Gehirn. *Stuttgart: Thieme Verlag S25-81.*
- O`Byrne, J. J., Lynch, S.A., Tracy, E.P., King, M. D., Betts, D. R., Mayne, P. D., Sharif, F. (2016) Unexplained developmental delay/learning disability: guidelines for best practice protocol for first line assessment and genetic/radiological investigations. *Ireland Journal Med Sci 185: 241-248.*
- Choo, Y.Y., Agarwal, P., How How, Ch., Yeleswarapur, S. P. (2019) Developmental delay: identification and management at primary care level. *Singapore Me J 60(3): 119-123.*
- Vom Dahl, S., Wendel, U., Strohmeyer, G. (2006) Genetisch bedingte Stoffwechselerkrankungen. *Köln: Deutscher Ärzte-Verlag S7-12.*
- Duba, Hans-Christoph (2006) Änderungen im Österreichischen Gentechnikgesetz (GTG). *Medgen 18:224-225.*
- Dilling, H., Mombour, W., Schmidt, M.H. (2005) Internationale Klassifikation psychischer Störungen. ICD-10 Kapitel V (F) Klinisch-diagnostische Leitlinien. Bern: Hogrefe Verlag S 261-291.
- Falkai, P., Wittchen, H.U. (2015). Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-5. *Göttingen: Hogrefe Verlag. S39-116.*
- Gasser, T., Maier, W. (2017) Genetische Risikofaktoren für neuropsychiatrische Erkrankungen. *Nervenarzt 88:711-712.*
- Gijsberg, A.C.J., Lew, J.Y.K, Bosch, C.A.J., Schuurs-Hoeijmakers, J.H.M., Van Haeringen, A., Den Hollander, N.S., Kant, S.G., Bijlsma, E.K., Breuning, M.H., Bakker, E., Ruivenkamp, C.A.L. (2009) A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test array first. *European Journal of Human Genetics 17:1394-1402. Zugriff 22.4.2019*
- Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G., Veltman J.A. (2012) Disease gene identification strategies for exome sequencing. *European Journal of Human Genetics 20: 490-497.*

Goldstein, D. B., Allen, A., Keebler, J., Margulies, E. H., Petrou, S., Petrovski, S., Sunyaev, S. (2013) Sequencing studies in human genetics: design and interpretation. *Nat Rev.Genet.* 14(7):460-470.

Griebler, R., Nowotny, M. (2015) Entwicklungsverzögerungen / Entwicklungsstörungen bei Kindern und Jugendlichen: Versorgungsaspekte aus Elternsicht. Grundlagenbericht für das Bundesministerium für Gesundheit. *Wien: Gesundheit Österreich GmbH.* S1-34.

Henn, W. (2005) Der Diskussionsentwurf des Gendiagnostikgesetzes. Meilensteine der Patientenautonomie? *Ethik Med* 17: 34-38.

Henn, W. (2014) Multiparameter-Genomanalyse und informationelle Selbstbestimmung. *Medgen* 26: 273-277.

Heyne, H. O., Lemke, J. H. (2015) Die historische Entwicklung genetischer Epilepsiediagnostik. *Zeitschrift für Epileptologie* DOI 10.1007/s10309-015-0031-4 Zugriff 17.7.2019.

Hochstenbach, R., van Binsbergen, E., Engelen, J., Niuwint, A., Plstra, A., Poddighe, P., Ruivenkamp, C., Sikkema-Raddatz, B., Smeets, D., Poort, M. (2009) Array analysis and karyotyping: Workflow consequences based on a retrospective study of 36.325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *European Journal of Medical Genetics* 52:161-169.

Hoeflerle, J. (2017) Methoden in der Humangenetik. *Nephrologe* 12:271-278.

Horton, R., Bell, B., Fenwick, A., Lucassen, A. M. (2019) Is it acceptable to contact an anonymous egg donor to facilitate diagnostic genetic testing for the donor conceived child? *J Med Ethics: 0:1-4.*

Karall, D., Scholl-Bürgi, S. (2017) Seltenen Krankheiten: Angeborene Stoffwechselstörungen im Kindes- und Jugendalter. *Pädiatrie&Pädologie* 52: 194-198

Köhler, s., Robinson, P. N. (2017) Genetische Diagnostik seltener Erkrankungen. Integration von Phänotyp- und Genotyp. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 5:542-549

Kortüm, F., Abdollapour, H., Alawi, M., Korenke, G.C., Seemanova, E., Tinschert, S., Zneker, M., Rosenberger, G., Kutsche, K. (2014) Exomsequenzierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen für seltene Syndrome. Erfahrungen aus Hamburg. *Medgen* 26: 246-254.

Kunze, Jürgen (2010). Wiedemanns Atlas klinischer Syndrome. Phänomenologie-Ätiologie-Differentialdiagnose. *Stuttgart: Schattauer Verlag* S2-21.

Kuß, A. W. (2014). Next Generation Sequencing in der Humangenetik. *Medgen* 26:229-230.

Kuß, A. W. (2014). Das methodische Potential der neuen Sequenziertechnologien jenseits der Mutationssuche. *Medgen* 26:264-272.

Locke, J. L. (2010) A Theory of Neurolinguistic Development. *Science Direct* 58:256-326. <https://doi.org/10.1006/brln.1997.1791> Zugriff am 26.6.2019

Metzker, M. L. (2010) Sequencing technologies-the next generation. Application of Next-Generation Sequencing. *Nature Reviews* 11:3146.

Michaelis, R., Niemann, G. (1995) Entwicklungsneurologie und Neuropädiatrie. Grundlagen und diagnostische Strategien. *Stuttgart: Hippokrates Verlag* S126-137.

Moog, U., Hoffmann, G.F., Zschocke, J. (2009) Geistige Behinderung infolge Stoffwechselkrankheit. *Medgen* 21:202-208.

Murken, J., Grimm, T., Holinski-Feder, E., Zerres, K. (2017) Humangenetik. *Stuttgart: Thieme Verlag*.

Müller, T., Jerrentrup, A., Schäfer, J. R. (2018) Computerunterstützte Diagnosefindung bei seltenen Erkrankungen. *Internist* 59: 391-400.

Neveling, K., Hoischen, A. (2014) Einführung in die Grundlagen der Hochdurchsatzsequenzierung. *Medgen* 26:231-238

NCBI- National Center for Biotechnology Information
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Zugriff am 16.7.2019

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man
<https://www.omim.org/> Zugriff am 16.7.2019

Orphanet
<https://www.orpha.net/concor/cgi-bin/index.php> Zugriff am 16.7.2019

Österreichisches Gentechnikgesetz (GTG) BGBl. Nr. 510/1994 (NR: GP XVIII IA 732/A AB 1730 S. 168. BR: AB 4827 S. 588.)
<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10010826> Zugriff am 14.7.2019

Petek, E., Windpassinger, Ch., Vincent, V. J., Cheung, J., Bricht, A. P., Scherer, S. W., Kroisl, M. P., Wagner, K. (2001) Disruption of a Novel Gene (IMMP2L) by a Breakpoint in 7q31 Associated with Tourette Syndrom. *American Journal Hum. Genet.* 68:848-858.

Mc Rae, J. F., Clayton, S., Fitzgerald, T. W., Kaplanis, J., Prigmore, E., Rajan D. (2018) Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature* 23: 542 (7642) 433-438.

Remschmidt, H., Schmidt, M., Poustka, F. (2006) Multiaxiales Klassifikationsschema für psychische Störungen des Kindes und Jugendalters nach ICD-10 der WHO. *Bern: Hogrefe Verlag, 5. Auflage*.

Roche (2003). Lexikon der Medizin. Urban& Fischer, 5. Aufl.
<http://www.tk-online.de/rochelexikon/ro05000/r07414.000.html> Zugriff am 24.7.2019.

Schaaf, Ch. P., Zschocke, J. (2018) Basiswissen Humangenetik. Berlin: Springer Verlag.

Speer, Ch. P., Gahr, M. (2018) Pädiatrie. *Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, S7-30.*

Sperl, W., Karall, D. (2014) Angeborene Stoffwechselstörungen. Der österreichische Weg einer Schwerpunktsetzung. *Pädiatrie & Pädologie 49: 20-24.*

Steinhausen, Hans-Christoph (2001). Entwicklungsstörungen im Kindes- und Jugendalter. Ein interdisziplinäres Handbuch. Stuttgart: Kohlhammer Verlag.

Strassburg, H.-M., Dacheneder, W., Kreß, W. (2002) Entwicklungsstörungen bei Kindern. Würzburg: Urban & Fischer Verlag S10-16, S159-176.

Sullivan, P. F., Geschwind, D. H. (2019) Defining the Genetic, Genomic, Cellular, and Diagnostic Architectures of Psychiatric Disorders.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.015> Zugriff am 16.8.2019

Weißmann, R., Gilissen, C. (2014) NGS Datenanalyse und Qualitätskontrolle. *Medgen 26:239-245.*

Zech, M., Wagner, M., Schormair, B., Oexle, K., Winkelmann, J. (2019) Exomdiagnostik in der Neurologie. *Nervenarzt 90:131-137.*