

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Bernhard Weber
Humangenetik

Evaluierung der Ganzgenomsequenzierung
für die molekulargenetische Diagnostik
erblicher Netzhautdystrophien

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Zoe Häusler

2026

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Bernhard Weber
Humangenetik

Evaluierung der Ganzgenomsequenzierung
für die molekulargenetische Diagnostik
erblicher Netzhautdystrophien

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Zoe Häusler

2026

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Stark
Tag der mündlichen Prüfung:	30.07.2026

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	5
1.1	Erbliche Netzhautdystrophien (IRDs)	5
1.2	Therapie und molekulargenetische Diagnostik von IRDs	8
1.3	Ganzgenomsequenzierung (WGS)	11
1.4	Bavarian Genomes Projekt	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Studienkohorte und Votum der Ethikkommission	16
2.2	Sequenzierprozess und zentrale Auswerter-Datenbank	19
2.3	Auswertung der Genomdaten	20
2.3.1	Klinische Informationen	21
2.3.2	Phänotypbasierte Suche	21
2.3.3	Erbgangbasierte Suche	21
2.3.4	Suche nach Strukturvarianten	22
2.3.5	Variantensuche nach Gen	22
3	Ergebnisse	26
3.1	Ungelöste Fälle	27
3.2	Wahrscheinlich gelöste Fälle	34
3.3	Gelöste Fälle	43
3.3.1	<i>MYO7A</i> (BG007)	46
3.3.2	<i>BBS10</i> (BG047)	49
3.3.3	<i>ALPK1</i> (BG057)	52

3.3.4	<i>PMM2</i> (BG026, BG048)	54
3.4	Zusatzbefunde	57
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung	71
6	Abkürzungsverzeichnis	73
7	Tabellenverzeichnis.....	76
8	Abbildungsverzeichnis	77
9	Anhangsverzeichnis.....	79
10	Anhang	80
11	Literaturverzeichnis.....	84
12	Selbstständigkeitserklärung.....	96

1 Einleitung

1.1 Erbliche Netzhautdystrophien (IRDs)

Erbliche Netzhautdystrophien (*Inherited Retinal Dystrophies*, IRDs) sind eine Gruppe genetisch sowie klinisch variabler Erkrankungen. All diesen Erkrankungen liegt eine Degeneration oder Dysfunktion von Photorezeptoren, den Zapfen und Stäbchen, in der Retina zugrunde. Dieser Prozess zieht eine Beeinträchtigung des Sehvermögens nach sich, welche je nach Schweregrad der Ausprägung bis hin zur vollständigen Erblindung reichen kann (1).

Klinisch unterscheiden lassen sich die einzelnen Krankheitsbilder nach den vorrangig betroffenen Sinneszellen, der Lokalisation von Veränderungen innerhalb der Retina, den vorliegenden visuellen Symptomen der Erkrankten, sowie nach Manifestationsalter und zeitlichem Verlauf der Erkrankung. Zum breiten Spektrum der IRDs zählen, um nur einige Beispiele zu nennen, Erkrankungen mit bereits früh-infantilem Auftreten, wie es bei der Leber'schen Kongenitalen Amaurose (LCA) der Fall ist, Makula-Dystrophien wie Morbus Best, die sich insbesondere durch einen zentralen Visusverlust auszeichnen, vorrangige Funktionsstörungen der Zapfen mit folglich abnormer Farbwahrnehmung und reduzierter Sehschärfe sowie Subtypen von IRDs, bei denen die Beteiligung der Stäbchen-Photorezeptoren überwiegt. Zu letztgenannter Untergruppe gehören unter anderem die Krankheitsbilder der Retinitis Pigmentosa (RP) Erkrankungen, welche durch Nachtblindheit sowie durch eine konzentrische Einengung des Gesichtsfeldes charakterisiert sind und durch ihren progredienten Verlauf bis zur vollständigen Erblindung führen können. Weiters sind auch Chorioretinopathien, wie beispielsweise die Choroideremie den IRDs zuzuordnen, obgleich bei diesen Erkrankungen die Degeneration des retinalen Pigmentepithels im Vordergrund steht. Darüber hinaus liegt aber auch eine Photorezeptordegeneration vor (1). Während die klinischen Ausprägungen der meisten IRDs auf die Retina beschränkt bleiben, können die retinalen Veränderungen auch als Bestandteil einer syndromalen Erkrankung auftreten (2). Dies trifft beispielsweise auf etwa 20-30 % aller von RP Betroffenen zu (3). Bislang wurden bereits über 80 Unterformen syndromaler IRDs mit ungefähr 200 dazu assoziierten Genen beschrieben, wobei sich diese in ihren extraokulären Krankheitsmanifestationen und im Verlauf unterscheiden. Dabei resultieren die meisten syndromalen Krankheitsbilder entweder aus einer angeborenen Störung des Stoffwechsels

wie z. B. bei Glykosylierungsdefekten oder aus einer Dysfunktion der primären Zilien, wie es unter anderem beim Usher-Syndrom der Fall ist (2).

Es gilt zu beachten, dass zwischen den einzelnen Erkrankungen im Spektrum der IRDs sowohl im klinischen Erscheinungsbild als auch in der genetischen Ursache beträchtliche Überschneidungen bestehen (3). Dies trägt dazu bei, dass sich die korrekte Diagnosestellung von IRDs oftmals als große Herausforderung erweist (4). Die klinische und genetische Vielschichtigkeit der IRDs ist in der folgenden Grafik bildlich dargestellt (**Abbildung 1**).

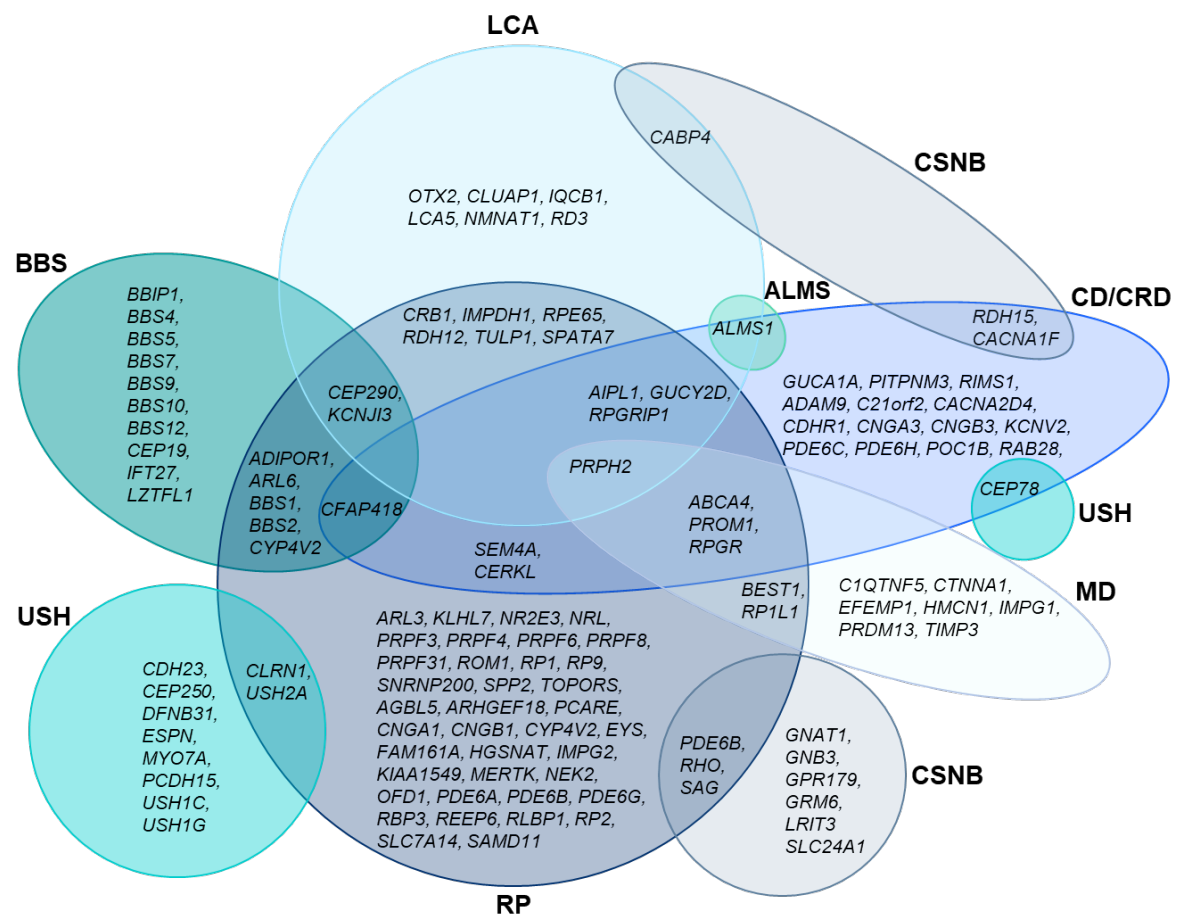


Abbildung 1: Klinische und genetische Heterogenität der IRDs. In diesem Venn-Diagramm dargestellt sind einige klinische Diagnosen (Kreisformen) aus der Gruppe der IRDs mit Beispielen möglich kausaler Gene (kursive Schrift). Die Heterogenität der Erkrankungsgruppe zeigt sich durch die Überschneidung der Erkrankungen samt zugehöriger Gene. In ein und demselben Gen können Veränderungen zu unterschiedlichen Phänotypen führen. LCA = Leber'sche Kongenitale Amaurose; CSNB = Kongenitale Stationäre Nachtblindheit; ALMS = Alström-Syndrom; CD/CRD = Zapfen-Dystrophie/Zapfen-Stäbchen-Dystrophie; USH = Usher-Syndrom; MD = Makula-Dystrophie; RP = Retinitis Pigmentosa; BBS = Bardet-Biedl-Syndrom; Diese Grafik bildet nur einige ausgewählte Diagnosen und Gene ab und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Modifizierte Abbildung nach Sangermano et al., 2020 (5).

Die Tatsache, dass zum aktuellen Zeitpunkt bereits über 340 unterschiedliche Gene als krankheitskausal für IRDs beschrieben wurden, verdeutlicht die genetische Komplexität dieser Erkrankungsgruppe (RetNet, Stand 26. Jan 2026) (6). Dabei folgen die Gene und Erkrankungen auch verschiedenen Erbgängen. Von autosomal-dominanter, autosomal-rezessiver, und X-chromosomaler über digenische Vererbung bis hin zu mitochondrialer Segregation sind in der Gruppe der IRDs sämtliche klassische Vererbungsmuster vertreten (6). Während beispielsweise bei autosomal-dominantem Erbgang bereits das Vorliegen einer schädlichen Veränderung auf nur einem Allel zur Erkrankung führt, liegen bei autosomal-rezessiven Erbkrankheiten zwei pathogene Varianten vor. Hierbei kann es einerseits sein, dass dieselbe pathogene Variante von beiden Elternteilen an die betroffene Person vererbt wurde, welche demnach homozygot für die Veränderung ist. Andererseits kann bei Betroffenen aber auch eine zusammengesetzte Heterozygotie im krankheitsauslösenden Gen vorliegen (**Abbildung 2**). Das bedeutet, dass von jedem Elternteil je eine andere schädliche Variante des gleichen Gens vererbt wurde und die beiden Varianten dadurch in *trans* zueinander, also auf den beiden unterschiedlichen Chromosomensträngen, gelegen sind. In diesem Fall kommt es zur Erkrankung. Sind die beiden Varianten hingegen auf einem Chromosom gelegen und demnach in *cis* lokalisiert, wurden sie von nur einem Elternteil vererbt und das Auftreten der Erkrankung bleibt aus (7).

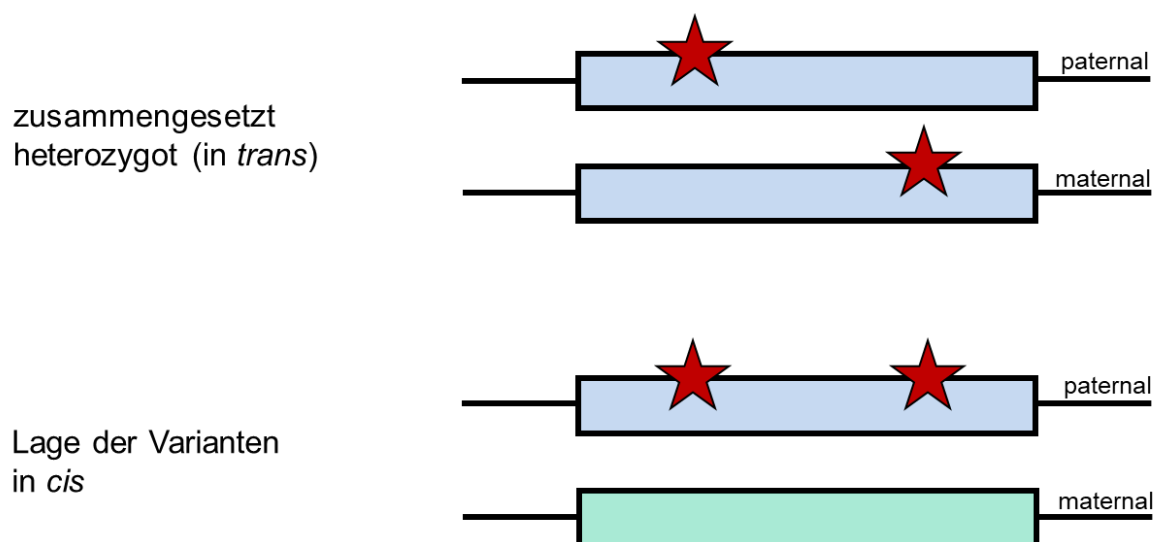


Abbildung 2: Mögliche Lageverhältnisse von Varianten. Bei zusammengesetzter Heterozygotie liegen zwei unterschiedliche Varianten in einem Gen, wegen ihrer Vererbung von paternaler und maternalen Seite, auf den beiden Chromosomensträngen (in *trans*). Dies stellt bei autosomal-rezessivem Erbgang einen Krankheitsmechanismus dar. Stammen beide Varianten vom selben Elternteil, dann sind die Varianten auf demselben Allel (in *cis*) lokalisiert. In diesem Fall verbleibt das zweite Allel (grünes Rechteck) funktionstüchtig und die Erkrankung bleibt aus. Die roten Sterne kennzeichnen das Vorliegen einer Variante. Modifizierte Abbildung nach Lunenburg et al., 2018 (8).

IRDs zählen aufgrund ihrer geringen Prävalenzen zu den seltenen Erkrankungen. Diese sind innerhalb Europas anhand einer Prävalenz von unter 5:10.000 definiert. Aufgrund der Vielzahl an seltenen Krankheitskonditionen, welche zu großen Teilen genetisch bedingt sind, leiden Schätzungen zufolge bis zu 6,2 % der Weltbevölkerung an einer von etwa 6.000 bis 7.000 seltenen Erkrankungen (9,10).

Die Prävalenz der Gesamtheit der IRDs unterliegt in der Literatur starken Variationen, oftmals werden jedoch, abhängig von der untersuchten Region, Zahlen im Bereich von 1:4.000 bis 1:3.000 genannt, was weltweit betrachtet auf über zwei Millionen Betroffene schließen lässt (4,11,12). Dabei stellt die Erkrankung RP mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 1:4.000 die häufigste Subform dar (3). Auf diesen Schätzungen basierend leben in Deutschland rund 30.000 Patienten mit IRDs, genauere Zahlenwerte für die einzelnen Erkrankungen sind jedoch nicht bekannt (13). Zudem lässt sich Studienergebnissen aus England und Australien zufolge festhalten, dass IRDs als die häufigste Ursache für Blindheit innerhalb der Bevölkerungsgruppe der Erwerbstätigen gelten, bei Kindern stehen sie an zweiter Stelle (14,15). Die Anzahl an Erkrankungsfällen verdeutlicht dabei, wie bereits von Weisschuh et al. (2020) angemerkt, das Ausmaß in dem IRDs einerseits viele Betroffene in deren Lebensqualität einschränken, andererseits aber auch das öffentliche Gesundheitssystem in Anspruch nehmen (13).

1.2 Therapie und molekulargenetische Diagnostik von IRDs

Unter dem Aspekt der geringen Prävalenzen und der bereits besprochenen Heterogenität von IRDs ist die genaue Charakterisierung der verschiedenen genetischen Pathomechanismen, die ihnen zugrunde liegen, eine Herausforderung. Eine Kenntnis dieser ist aber insofern von großer Bedeutung, als dass darauf die Entwicklung geeigneter Therapieansätze für die einzelnen Erkrankungen beruht (1). Als immunprivilegiertes, leicht zugängliches Organ wurde die Retina in den vergangenen Jahren bereits ausgiebig erforscht, mit der Absicht gentherapeutische Ansätze zu finden, die zur Heilung von IRDs führen oder zumindest deren Progression verlangsamen oder aufhalten. Diesem Ziel ist man seit der erstmaligen Zulassung von *Voretigene Neparvovec* (*Luxturna*®) durch die US-amerikanische Arzneimittelbehörde im Jahr 2017 einen großen Schritt nähergekommen. Es handelt sich dabei um die erste verfügbare Arznei zur Behandlung einer IRD, eine Gensatztherapie für die Erkrankung LCA, Subtyp 2 (MIM # 204100). Die Therapie richtet sich an Personen, bei denen biallelische pathogene Veränderungen im *Retinoid Isomerohydrolase RPE65*-Gen

(*RPE65*, OMIM * 180069) der Erkrankung zugrunde liegen (16). Das Prinzip von *Voretigene Neparvovec (Luxturna®)* beruht auf einer vektorbasierten Gensatztherapie: Dabei wird mithilfe eines Vektors, eines Adeno-assoziierten Virus, eine funktionstüchtige Kopie des Wildtyps von *RPE65* mittels subretinaler Injektion in die Zellen der Retina eingebracht. Infolgedessen kann das Proteinprodukt der eingebrachten Gensequenz seine Funktion im retinalen Stoffwechsel wieder erfüllen. In klinischen Phase-III-Studien zur Untersuchung von Wirksamkeit und Nebenwirkungen der Therapie konnte eine signifikante Verbesserung visueller Funktionen bei betroffenen Personen, die mit *Voretigene Neparvovec (Luxturna®)* behandelt wurden, gezeigt werden. Diese Besserung des Sehvermögens war dabei nach einem Zeitraum von vier Jahren immer noch nachweisbar (17). Zum aktuellen Zeitpunkt ist *Voretigene Neparvovec (Luxturna®)* die einzige zugelassene Therapieoption auf dem weiten Feld der IRDs, auf www.clinicaltrials.gov ist jedoch eine zunehmende Anzahl laufender klinischer Studien für die genbasierte Therapie von verschiedenen Krankheitsbildern gelistet (17,18). Zu den Erkrankungen, die gerade im Hinblick auf Therapiemethoden intensiv erforscht werden, gehören z. B. LCA, RP, Achromatopsie, Usher-Syndrom, X-gebundene Retinoschisis sowie Morbus Stargardt. Aktuell wird hierbei in den meisten klinischen Studien das Prinzip der Gensatztherapie angewandt, welches sich bereits bei der Behandlung der *RPE65*-assoziierten LCA bewährt hat. Das ist für Erkrankungen, die auf einem Funktionsverlust (*loss-of-function*) des Gens basieren, zielführend, aber insbesondere bei autosomal-dominanten Krankheiten mit zugrundeliegendem *gain-of-function* Pathomechanismus sind alternative Ansätze erforderlich. Hier könnten z. B. Gensuppression, Antisense-Oligonukleotide oder die Genom-Editierung mittels „Genomschere“ in Zukunft weitere therapeutische Möglichkeiten bieten. Der Nutzen der Genom-Editierung wird beispielsweise in der klinischen Studie *EDIT-101* für die mit dem *Centrosomal Protein, 290-KD* Gen (*CEP290*, OMIM * 610142) assoziierte Erkrankung LCA, Subtyp 10 (MIM # 611755) untersucht (18,19). Wichtig für den Erfolg jeglicher therapeutischen Intervention bei IRD-Erkrankungen ist eine frühzeitige Durchführung der Behandlung. In Studien an LCA-Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zeigte sich – trotz der angewandten Gentherapie – eine Progression der retinalen Degeneration. Das lässt wiederum darauf schließen, dass der Behandlungserfolg von IRDs maßgeblich von einem rechtzeitigen Therapiebeginn abhängt (16).

Bevor Patienten die Durchführung einer Therapie oder die Teilnahme an klinischen Studien ermöglicht werden kann, muss die genetische Ursache der vorliegenden IRD bekannt sein.

Jegliche Form der Gentherapie setzt eine gesicherte molekulargenetische Diagnose voraus (13). Auf dem Gebiet der molekulargenetischen Diagnostik sind in den vergangenen Jahren bereits bedeutende Entwicklungen zu vermerken. Die weiträumige Anwendung der Hochdurchsatz-Sequenzierung (*Next Generation Sequencing*, NGS) stellt dabei einen methodischen Meilenstein dar. Mittels NGS wurde eine kosteneffektive und schnelle Generierung großer Mengen an Sequenzdaten ermöglicht (20). Sowohl im Bereich der IRDs als auch anderer Mendelscher Erbkrankheiten hat die Einführung der NGS-Technologie damit die Dimension diagnostischer Möglichkeiten revolutioniert (21–23).

Die aktuell in der Diagnostik von IRDs vorherrschenden Vorgehensweisen zur Detektion krankheitskausaler Veränderungen sind die Anwendung von Gen-Panels sowie die Exomsequenzierung (*Whole Exome Sequencing*, WES) (24). Bei der Anwendung von Gen-Panels wird mittels NGS-Technologie gezielt eine Auswahl von Genen, deren ursächlicher Zusammenhang mit IRDs bekannt ist, sequenziert und auf relevante Veränderungen untersucht. Dabei werden mit dieser Methode nahezu ausschließlich kodierende Bereiche des Genoms erfasst. Die Ausnahme bilden Exon-flankierende Bereiche, in denen Varianten häufig Spleiß-Defekte verursachen, sowie intronische Regionen von Genen, in denen tief-intronische Varianten als Krankheitsursache bereits beschrieben sind (4). Ein Beispiel für tief-intronische Varianten stellt das *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4* Gen (*ABCA4*, OMIM * 601691) dar (25,26). Seit einigen Jahren ist auch WES als methodischer Ansatz in der IRD-Diagnostik vertreten. Durch die Untersuchung aller kodierenden Bereiche sollen mittels WES insbesondere Fälle mit unklarer Diagnose nach Gen-Panel-Untersuchung oder mit multiplen klinischen Differenzialdiagnosen geklärt werden. (26). Eine technische Überlegenheit von IRD-Panel-basierten Untersuchungen des Exoms gegenüber WES-Analysen, konnte in einer Studie von Consugar et al. (2015) gezeigt werden. Die Untersuchung mittels Gen-Panels bei Patienten mit erblichen Augenerkrankungen ergab hier gegenüber WES eine höhere Sensitivität bei zugleich sehr hoher Spezifität für die Detektion von Varianten (27). Während Gen-Panels bei definierten Genen heute weiterhin Vorteile hinsichtlich der Sequenziertiefe und der Abdeckung aufweisen, zeigt eine systematische Übersichtsarbeit von 2023, dass in Studien, in denen WES eingesetzt wurde, tendenziell höhere Diagnoseraten als mit Gen-Panels erzielt wurden, was den diagnostischen Mehrwert einer breiteren Exomabdeckung insbesondere in klinisch heterogenen Situationen unterstützt (28).

Nach aktueller Studienlage liegt die allgemeine Diagnoserate für IRDs unter Anwendung der in der molekulargenetischen Diagnostik gebräuchlichen Methoden bei Werten von etwa 50-70 % (4,24,28). Dabei ist nach Shah et al. (2020) die Höhe der jeweils erzielten Werte maßgeblich von Heterogenität und Komplexität der in der Studienkohorte vertretenen Erkrankungen abhängig (29).

Das Erreichen einer molekulargenetisch gesicherten Diagnose ist nicht nur unter dem Aspekt möglicher Therapien oder der Teilnahme an klinischen Studien relevant. Darüber hinaus kann die Kenntnis der genauen Ursache ihrer Erkrankung bei Betroffenen auch auf psychischer Ebene zu Entlastung führen und aufgrund zusätzlicher Informationen über Prognose und Erbgang für deren Zukunfts- und Familienplanung relevant sein. Dazu kommt, dass durch frühe genetische Diagnosestellung weitere medizinische Kosten durch zusätzliche Diagnostikverfahren eingespart werden und eine Anpassung des klinischen Vorgehens an die vorliegende Erkrankung ermöglicht wird (26,30).

1.3 Ganzgenomsequenzierung (WGS)

Unter Annahme einer derzeit mit Routinediagnostikverfahren maximal erreichbaren Diagnoserate von 70 % (4,28) verbleiben nach aktuellem Stand knapp ein Drittel aller an IRDs erkrankten Personen ohne molekulargenetische Diagnose – in Bezug auf Deutschland entspräche dies, wenn von geschätzt 30.000 Betroffenen ausgegangen wird (13), in etwa 9.000 Patienten.

Die Gründe, weshalb bei einer großen Anzahl der untersuchten Fälle eine Diagnosestellung misslingt, sind vielschichtig. Einerseits muss davon ausgegangen werden, dass bislang nicht alle Gene in Verbindung mit IRDs bekannt und erforscht sind (31). Andererseits sind molekulargenetisch ungeklärte Fälle auch den technischen Limitationen der aktuell gebräuchlichen Diagnostikverfahren geschuldet. Große strukturelle Veränderungen, wie beispielsweise Deletionen von Gensequenzen, deren Bruchpunkte sich außerhalb der kodierenden Bereiche befinden, können dabei nicht detektiert werden. Dazu kommt, dass die bislang angewandten Methoden weitgehend auf die Untersuchung kodierender Bereiche des Genoms beschränkt sind. Nicht-kodierende regulatorische Bereiche werden, zumindest für die überwiegende Anzahl aller Gene, durch diese Verfahren nicht erfasst (31,32). Daraus folgt, dass unter Gebrauch der aktuellen Methoden potenziell pathogene Varianten unentdeckt bleiben.

Für die genannten Defizite in der molekulargenetischen Diagnostik bietet die Ganzgenomsequenzierung (*Whole Genome Sequencing*, WGS) einen Lösungsansatz. Bei dieser Methode wird mittels NGS-Technologie eine vollständige Sequenzierung des Genoms vorgenommen, was bedeutet, dass sowohl proteinkodierende als auch intronische und intergenische Bereiche der Analyse genetischer Veränderungen zugänglich gemacht werden. Weitere methodische Vorteile von WGS bestehen in der sicheren Detektion von Strukturvarianten sowie in einer verbesserten Abdeckung repetitiver CG-reicher Regionen verglichen mit WES (4,33). Im Forschungsbereich konnte die Einführung von WGS bereits zur Ergründung der molekularen Basis verschiedener Erkrankungen beitragen und hat abgesehen davon auch in anderen relevanten Bereichen, wie z. B. der Pharmakogenetik, dabei geholfen, den Wissensstand zu erweitern (23).

Trotz dieser Vorzüge von WGS hat die Methode außerhalb von Studien bisher noch keinen flächendeckenden Einzug in den molekulargenetischen Diagnostikprozess von IRDs gefunden (24). Die Integration in klinische Diagnostikprozesse steht jedoch zunehmend im Fokus aktueller Studien und methodischer Weiterentwicklungen. Zentrale Limitationen bestehen insbesondere in dem erheblichen bioinformatischen Aufwand, der mit hohen erforderlichen Speicherkapazitäten von Genomdaten verbunden ist, was schlussendlich auch zu den im Vergleich zu anderen Methoden höheren Kosten beiträgt (4,32). Eine weitere Schwierigkeit bei der Durchführung von WGS-Analysen ist die korrekte Klassifizierung und Interpretation der Vielzahl an Varianten, die bei einer Sequenzierung des gesamten Genoms erfasst werden. Angesichts der Tatsache, dass nicht-kodierende Bereiche bisher kaum untersucht wurden, stellt die Bewertung dieser Varianten bezüglich Pathogenität den Diagnostikbereich vor Herausforderungen (34).

Zur Anwendung der WGS-Methode in Zusammenhang mit der Diagnostik verschiedener Erkrankungen existiert bereits eine Vielzahl an Studien. An erster Stelle ist hier das *U.K. 100,000 Genomes Project* zu nennen. Im Rahmen dieser groß-angelegten Studie wurden Patienten, die von einem breiten Spektrum seltener Erkrankungen betroffen waren, mittels Genomanalyse auf die zugrundeliegenden genetischen Ursachen untersucht. Anhand der Studienergebnisse gelang es Smedley et al. (2021), zu zeigen, dass mittels WGS ein Anstieg der Diagnoseraten vieler seltener Erkrankungen, darunter auch IRDs, erzielt werden kann. Des Weiteren legte das Projekt die Vorteile dar, die sich für Patienten durch die molekulare Diagnosestellung ergaben. Die im Rahmen der Studie durchgeführten Genomanalysen trugen darüber hinaus dazu bei, mehrere zuvor unbekannte krankheitskausale Gene ausfindig

zu machen (35). In einer weiteren Studie, durchgeführt von Stranneheim et al. (2021), wurde die WGS-Methode ebenfalls im Sinne der Diagnostik seltener Erkrankungen erprobt. Die Genomanalysen, welche am *Karolinska University Hospital* in Stockholm, Schweden durchgeführt wurden, erstreckten sich hierbei über einen Zeitraum von fünf Jahren. Das Projekt diente als Versuch, die Genomanalyse in den Diagnostikprozess und in weiterer Instanz ins schwedische Gesundheitssystem zu integrieren. Auch in diesem Projekt wurden die bereits im *100,000 Genomes Project* genannten Vorzüge von WGS aus den Ergebnissen ersichtlich. Als für den Erfolg des Vorhabens bedeutend erwiesen sich dabei insbesondere standardisierte Analyseabläufe sowie die Zusammenarbeit in interdisziplinären Teams, mit enger Vernetzung von Klinikern und Genetikern (36). In Anbetracht der rasanten Entwicklungen, die in den letzten Jahren auf dem Feld der Genommedizin zu beobachten sind, sowie der vielversprechenden Möglichkeiten, die der Bereich noch zu bieten hat, wurden eine Reihe von Initiativen sowohl deutschlandweit als auch europaweit angestoßen (**Abbildung 3**). Zunächst erfolgte im Jahr 2018 auf EU-Ebene die Gründung der *1+ Million Genomes* Initiative. Die in den aktuell 27 Mitgliedsstaaten generierten Genomdaten sollen dabei – unter Gewährleistung der Datensicherheit – international vernetzt und zu einer europaweiten Referenzressource im Sinne eines „*Genome of Europe*“ zusammengeführt werden (37). Das deutsche Projekt *genomDE* verfolgt seit 2019 das Ziel einer nationalen Datenbank für Genomdaten, welche die Forschung in den Bereichen Prävention, Diagnostik und Therapie genetischer Erkrankungen vorantreiben soll. Nach Gründung dieser Initiative folgte 2020 der Beitritt Deutschlands zum *1+ Million Genomes* Projekt (38,39). Eine weitere Initiative innerhalb Deutschlands, das *Modellvorhaben § 64e SGB V*, geht von den Krankenkassen aus und zielt auf eine mögliche Implementierung der Genommedizin in die patientennahe Versorgung ab. Seit Juli 2024 wird hierdurch Patienten, die an seltenen oder onkologischen Erkrankungen leiden, der Zugang zur molekulargenetischen Diagnostik mittels WGS ermöglicht. Dieses Vorhaben dient der Evaluation der Anwendung dieser Methodik in der Diagnostik, wobei das Projekt auf eine Laufzeit von mindestens fünf Jahren ausgelegt ist (39,40).

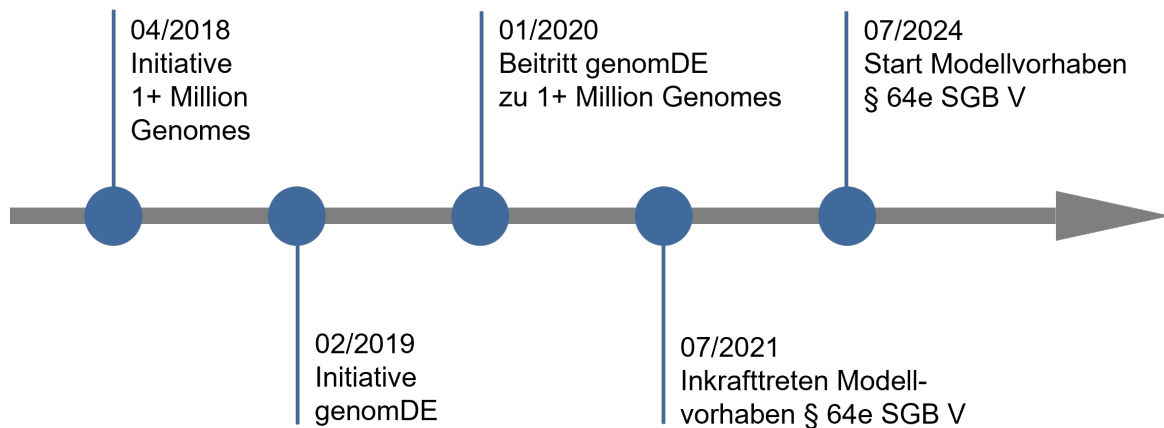


Abbildung 3: Aktuelle Initiativen und Projekte in Zusammenhang mit der Genomsequenzierung. Am Zeitstrahl sind einige aktuelle Projekte, die mit dem Thema Genomsequenzierung in Zusammenhang stehen, in chronologischer Reihenfolge dargestellt. Die *1+ Million Genomes Initiative* ist ein EU-weites Projekt (mit Ausnahme einer Teilnahme des Vereinigten Königreichs und Norwegens), *genomDE* und das *Modellvorhaben § 64e SGB V* sind nationale Strategien innerhalb Deutschlands. Modifizierte Abbildung des deutschen Bundesministeriums für Gesundheit (38).

1.4 Bavarian Genomes Projekt

Ein weiteres Projekt innerhalb Deutschlands, welches das Thema Genomsequenzierung adressiert, ist das *Bavarian Genomes: 1000 Klinische Genome für Seltene Erkrankungen in Bayern*, kurz *Bavarian Genomes*, Projekt. Es handelt sich hierbei um eine im Jahr 2018 gegründete Forschungsinitiative mit Förderung durch das Bayerische Staatsministerium für Wissenschaft und Kunst. Das Projekt basiert auf einem Zusammenschluss der universitären Humangenetiken und Zentren für Seltene Erkrankungen in Bayern mit den Standorten Augsburg, Erlangen, München, Regensburg und Würzburg und richtet sich an Patienten, bei denen seltene Erkrankungen vorliegen, zu deren molekulargenetischer Aufklärung bereits durchgeführte diagnostische Verfahren nicht beitragen konnten. Das Ziel besteht darin, mittels Genomanalyse eine molekulargenetische Diagnosefindung für diese Patienten zu ermöglichen. Weitere Intentionen im Zuge des Projekts sind die Erschaffung und Verbesserung einer Datenbankinfrastruktur, welche den Auswertern Zugriff auf die Genomdaten der Studienteilnehmer ermöglicht (41). An den am *Bavarian Genomes* Projekt teilnehmenden Zentren ist der Fokus jeweils auf unterschiedliche Krankheitsentitäten ausgerichtet – am Institut für Humangenetik des Standortes Regensburg befasst man sich mit der Genomanalyse von Fällen aus der Erkrankungsgruppe der IRDs. Die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten WGS-Untersuchungen erfolgten als Teil des *Bavarian Genomes* Projekts.

1.5 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

Obwohl auf dem Gebiet der WGS-Diagnostik bereits intensiv geforscht wird, ist der tatsächliche Nutzen dieser Technologie für einzelne Erkrankungsgruppen bis heute nicht abschließend geklärt. Größere Studien, wie das *U.K. 100,000 Genomes Project* (35), wandten WGS meist auf breit gestreute Erkrankungsgruppen mit jeweils nur wenigen Fällen an. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Methode WGS speziell für die molekulargenetische Diagnostik von IRDs im Detail zu evaluieren. Von besonderem Interesse ist dabei zum einen die Frage nach einer diagnostischen Überlegenheit von WGS gegenüber anderen Methoden. Darüber hinaus sollen potenzielle Herausforderungen, die sich aus der Durchführung von WGS-Untersuchungen ergeben, erkannt werden. Das abschließende Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, anhand der gewonnenen Erkenntnisse einen Eindruck über die aktuelle Anwendbarkeit von WGS in der Diagnostik von IRDs zu erhalten.

Hinweis zur Sprachverwendung: Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

2 Material und Methoden

2.1 Studienkohorte und Votum der Ethikkommission

Die Analyse der Genomdaten, die den Ergebnissen dieser Arbeit zugrunde liegt, erfolgte im Zeitraum April bis August des Jahres 2022. Die vorliegenden Ergebnisse sind daher unter Kenntnisnahme des zum damaligen Zeitpunkt vorherrschenden Wissensstandes zur Auffindung und Bedeutung genetischer Varianten zu betrachten.

Die Studienkohorte, deren WGS-Daten untersucht wurden, bestand aus 22 Familien mit der klinischen Diagnose einer IRD. Die Rekrutierung dieser Familien erfolgte als Teil des *Bavarian Genomes* Projekts durch ophthalmologische Zentren an Kliniken sowie durch niedergelassene Ophthalmologen innerhalb Deutschlands. Voraussetzung für den Studieneinschluss war das Vorliegen einer Netzhauterkrankung innerhalb der Familie sowie eine vorangegangene humangenetische Untersuchung diesbezüglich, bei der jedoch keine molekulargenetische Diagnose gestellt werden konnte. Zusätzlich zu den Indexpatienten wurden noch weitere betroffene sowie auch nicht-erkrankte Familienmitglieder in die Studie aufgenommen. Ein positives Votum der lokalen Ethikkommission lag zu Studienbeginn vor (Referenz-Nr. 20-2100-103). Eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der *Bavarian Genomes* Studie wurde von allen eingeschlossenen Studienteilnehmern vor Analysebeginn eingeholt (**Anhang 5**). In diesem Dokument konnten die teilnehmenden Personen sowohl über die Mitteilung von Analyseergebnissen bezüglich der Untersuchungsindikation als auch über mögliche Zusatzbefunde (*incidental findings*) entscheiden. Vor Durchführung der Datenanalyse wurden alle Familien und Familienmitglieder durch individuelle Studien-IDs pseudonymisiert. Die 22 Familien der Studienkohorte umfassten insgesamt 50 Personen, unter denen sich 30 Patienten und 20 nicht-betroffene Familienmitglieder befanden (**Tabelle 1**). Die Anzahl sequenzierter Genome in den Familien reichte von eins bis fünf.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Studienkohorte (n Familien = 22).

<i>Familien-ID</i>	<i>Indikation</i>	<i>Betroffene Personen</i>	<i>Sequenzierte Familienmitglieder</i>	<i>Vermuteter Erbgang</i>
BG002	RP	2	4	AR
BG004	RP	1	1	Simplex
BG007	RP/USH	3	5	AR
BG008	RP	1	1	Simplex
BG010	RP	2	4	AR
BG011	RP	1	1	Simplex
BG012	RP	1	1	Simplex
BG016	MD	2	2	AD
BG018	RP	1	1	AD
BG020	RP	1	2	Simplex
BG022	RP	1	1	Simplex
BG026	RP	1	1	Simplex
BG031	RP	1	2	Simplex
BG034	RP	1	1	Simplex
BG038	ZSD	1	1	Simplex
BG042	RP	1	3	Simplex
BG047	RP	1	3	Simplex
BG048	RP	1	3	Simplex
BG051	RP	2	4	AD
BG052	RP	1	2	Simplex
BG057	OA	3	4	AD
BG069	Syndromale RP	1	3	Simplex
<i>n</i>	22	30	50	

RP = Retinitis Pigmentosa; USH = Usher-Syndrom; MD = Makuladystrophie; ZSD = Zapfen-Stäbchen-Dystrophie; OA = Optikusatrophie; AR = autosomal-rezessiv; AD = autosomal-dominant

Unter den 22 untersuchten Familien befanden sich neun Einzelpersonen (41 %), also Indexpatienten ohne weitere teilnehmende Familienmitglieder (**Abbildung 4**). Weitere neun Familien (41 %) entsprachen einer Trio-Konstellations, was bedeutet, dass die Genomdaten der Indexperson sowie die der jeweiligen Eltern vorlagen. Zusätzlich zu Eltern und Indexperson konnte diese Konstellation auch noch weitere Familienmitglieder beinhalten. Bei den verbleibenden vier Familien (18 %) nahmen jeweils die Mutter der Indexperson und die Indexperson teil.

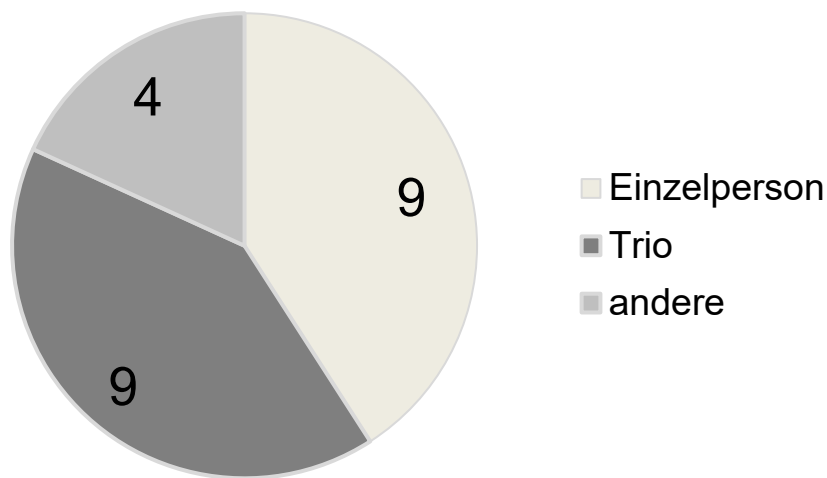


Abbildung 4: Familienkonstellationen innerhalb der Studienkohorte (n = 22). Die unterschiedliche Zusammensetzung der Familien wird in diesem Diagramm dargestellt. Zu den vorkommenden Konstellationen zählten Einzelpersonen, Trios und davon abweichende Zusammensetzungen. Die Anzahl der jeweiligen Familienkonstellationen in unserer Studienkohorte entspricht den Zahlen innerhalb der Sektionen des Diagramms.

Die sequenzierten Familien unterschieden sich neben der Zusammensetzung auch in ihrer Indikation für die Studienteilnahme (**Abbildung 5**). Beim Großteil, nämlich 17 von 22 Familien (77 %), war die Diagnose RP. Bei den verbleibenden fünf Familien (23 %) lag in jeweils einem Fall syndromale RP, RP mit Differenzialdiagnose Usher-Syndrom, Makula-Dystrophie, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie oder Optikusatrophie als klinische Diagnose vor.

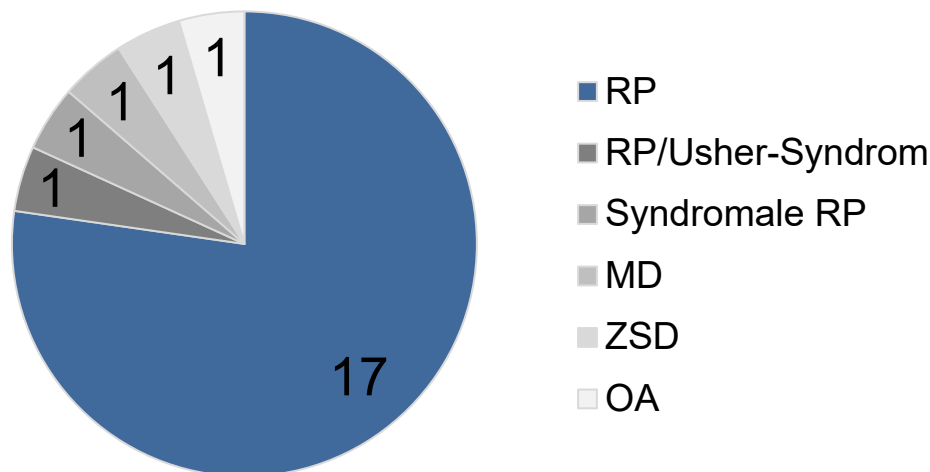


Abbildung 5: Indikation der Indexpatienten (n = 22). Das Diagramm zeigt die Anteile der vorkommenden Indikationen innerhalb der sequenzierten Familien. Die Zahlen innerhalb der Sektionen repräsentieren dabei die Anzahl an Indexpatienten mit der jeweiligen Indikation. RP = Retinitis Pigmentosa; MD = Makula-Dystrophie; ZSD = Zapfen-Stäbchen-Dystrophie; OA = Optikusatrophie

2.2 Sequenzierprozess und zentrale Auswerter-Datenbank

Nach Asservierung der Bioproben in Form von Blut erfolgte die Sequenzierung für das *Bavarian Genomes* Projekt auf der zentralen Sequenzierplattform am Institut für Humangenetik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (41). In München wurden anschließend die bioinformatische Prozessierung der generierten Rohgenomdaten sowie eine Qualitätskontrolle dieser vorgenommen. Referenz für sämtliche Daten war das humane Referenzgenom GRCh37 (hg19). Im nächsten Schritt wurden die Genomdaten der Studienteilnehmer in die zentrale Datenbank, die *Exome Variant Analysis Database* (EVAdb) (42), geladen, über die Auswerter der Studie dezentral, von ihrem jeweiligen Standort aus, auf die pseudonymisierten Daten zugreifen konnten.

Die EVAdb setzt sich aus einer Exom- und einer Genomdatenbank zusammen und beinhaltet alle bei der Genomsequenzierung detektierten Varianten. Zudem enthält die EVAdb Verknüpfungen zu weiterführenden, online verfügbaren öffentlichen Datenbanken und Programmen, die Informationen zu den einzelnen Varianten bereithalten und auf welche im Folgenden noch näher eingegangen wird.

2.3 Auswertung der Genomdaten

Jeder Mensch ist – aktuellen Schätzungen zufolge – Träger von etwa drei bis vier Millionen genetischen Veränderungen, sogenannten genetischen Varianten (34). Die Datenmenge, welche durch die Methode WGS demnach mit jeder Genomsequenzierung generiert wird, ist groß. Um diese Daten gezielt hinsichtlich der jeweiligen Indikation untersuchen zu können, wurde ein strukturiertes Analyseschema erstellt (**Abbildung 6**). Hierbei wurden die WGS-Daten in der Datenbank EVAdb anhand festgelegter Kriterien in mehreren unabhängigen Schritten gefiltert und anschließend ausgewählte Varianten mittels verschiedener Programme auf funktionelle Konsequenzen hin untersucht. Dabei erfolgte die Applikation der Filter immer zuerst in der Exomdatenbank und erst danach in der Genomdatenbank. Dies diente der sicheren Detektion krankheitsverursachender exonischer Varianten in Genen, die in der vorangegangenen Diagnostik noch nicht untersucht wurden. Im Anschluss daran wurde nach intronischen und intergenischen Varianten in der Genomdatenbank gesucht.

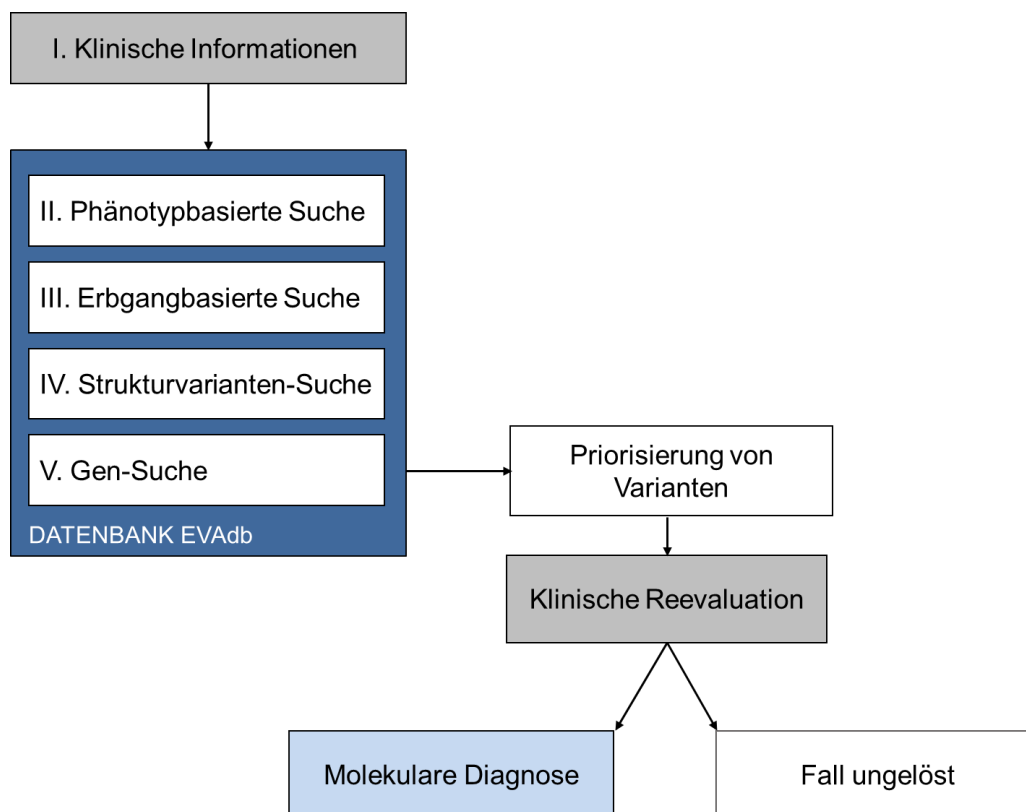


Abbildung 6: Strukturiertes Analyseschema. Die Abbildung fasst die standardisierten Analyseschritte des Auswertungsprozesses zusammen. Die Analyse erfolgte in drei großen Schritten: 1. Sichtung klinischer Informationen zum Fall, 2. Variantensuche in der Datenbank EVAdb durch Anwendung von vier Filterschritten, 3. Klinische Reevaluation der priorisierten Varianten und molekulare Diagnosestellung oder Klassifikation des Falls als „ungelöst“.

2.3.1 Klinische Informationen

Im ersten Schritt des Analyseschemas erfolgte die Sichtung der klinischen Informationen zur jeweiligen Familie. Diesem Vorgang dienten sowohl Arztbriefe als auch den Indexpatienten zugeordnete Phänotyp-Annotationen (*Human Phenotype Ontology Terms*, HPO-Terms) (43,44), die deren klinische Merkmale näher charakterisierten. Zudem wurden Familienstammbäume erstellt, um mögliche Erbgänge zu ermitteln und eine Segregationsanalyse zu erleichtern.

2.3.2 Phänotypbasierte Suche

In Schritt zwei wurde in der EVAdb nach genetischen Varianten, die bereits mit retinalen Erkrankungen in Verbindung stehen, gefiltert. In einem ersten phänotypbasierten Filterschritt wurde in der Exom- und der Genomdatenbank nach Varianten gesucht, zu denen in der Datenbank ClinVar (45,46) bereits Klassifikationen hinterlegt waren. Die *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (47,48) diente der Überprüfung dieser Varianten auf Assoziation zu retinalen Phänotypen. Dieser sowie auch alle nachfolgenden Filterschritte erfolgten in der EVAdb unter den jeweils in Klammern vermerkten Modifikationen der dortigen Standardeinstellungen (Exomdatenbank: in-house exomes “ ≤ 500 “ – bei ca. 26.000 in der Datenbank enthaltenen Exomen; Genomdatenbank: function „only intronic“). Im zweiten phänotypbasierten Filter wurde in der Exomdatenbank eine Schlagwortsuche durchgeführt (Suchbegriff „retin*“, function ohne „unknown“). Alle Varianten in Genen, welche in der Datenbank *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) (49) diesen Suchbegriff enthielten, wurden manuell weiter auf passende Phänotypen untersucht.

2.3.3 Erbgangbasierte Suche

In der Exomdatenbank wurden Varianten in einem dritten Analyseschritt nach ihrer Segregation innerhalb der Familie gefiltert. Dabei wurden im autosomal-rezessiven Filter Gene angezeigt, in denen homozygote Varianten oder je eine heterozygote Variante von Mutter und Vater bei der Indexperson vorlagen (function ohne „unknown“, Trio „yes“ / “no“). Im autosomal-dominanten Filter wurde nach Varianten gesucht, die bei erkrankten Familienmitgliedern vorkamen (function ohne „unknown“). Eine Suche nach *de novo* entstandenen Varianten bei der Indexperson war nur möglich, wenn eine Trio-Konstellation gegeben war (function ohne „unknown“, affected „all“). Alle Suchergebnisse wurden nach Einträgen in OMIM, Populationsfrequenzen in der *Genome Aggregation Database*

(gnomadAD) (v2.1.1) (50,51), Häufigkeit in der EVAdb und nach Einträgen in der Datenbank *Mouse Genome Informatics* (MGI) (52,53) vorselektiert. Die verbleibenden Varianten wurden mittels einer Recherche zum Gen in der Datenbank GeneCards (54,55) ausgeschlossen oder entsprechend priorisiert. Bei interessanten Varianten in Genen mit noch unklarer Krankheitsassoziation wurde die Genexpression in humanen retinalen Geweben über EyeIntegration (v1.05) (56,57) geprüft.

2.3.4 Suche nach Strukturvarianten

Im darauffolgenden vierten Schritt wurden alle im Genom vorkommenden strukturellen Veränderungen untersucht (minimal cases „1“, in-house genomes „15“, overlap with annotation „all“, OMIM „all“, caller „ ≥ 3 “). Zu diesen zählen unter anderem Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Insertionen und Translokationen, welche allesamt die Genstruktur verändern. Zuerst lag der Fokus dabei auf proteinkodierenden Regionen, im Folgenden wurde die Suche auf nicht-kodierende Bereiche ausgeweitet. Die Relevanz der vorkommenden Strukturvarianten wurde mithilfe von Segregationsanalysen, Einträgen auf OMIM und Informationen zum jeweils veränderten Gen auf GeneCards bewertet. Zur Visualisierung von strukturell veränderten Regionen wurde der *UCSC Genome Browser* (UCSC) (Referenzgenom: Human GRCh37/hg19) (58,59) genutzt. Die Verifizierung und genauere Charakterisierung von Strukturvarianten erfolgte unter Anwendung des Programms *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (v.2.12.3) (60). Die Bereiche detektierter Strukturvarianten wurden unter Anwendung der durch die *Human Genome Variation Society* (HGVS, v.20.05) (61,62) empfohlenen Nomenklatur definiert.

2.3.5 Variantensuche nach Gen

Der fünfte und letzte Filterschritt war die Analyse ausgewählter Gene, die zuvor in Schritt II-IV des Analyseschemas priorisiert worden waren. Diese Suche erfolgte ausschließlich in der Genomdatenbank (affected „all“, function „all“, in-house exomes „ ≤ 10 “). Alle Varianten innerhalb eines Gens sowie in den umliegenden Bereichen wurden dabei gefiltert und analysiert. Zunächst wurde die Segregation der Varianten geprüft und nach Populationsfrequenzen gefiltert. Varianten, die nur bei gesunden Personen vorkamen, oder deren Allelfrequenz (AF) über dem zuvor definierten Grenzwert lag, wurden ausgeschlossen (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Grenzwerte für akzeptierte Frequenzen von Varianten innerhalb von gnomAD und EVAdb.

<i>Erbgang des Gens</i>	<i>gnomAD</i>	<i>EVAdb</i>
AD	Homozygot = 0 Heterozygot < 10 *	Homozygot = 0 P Heterozygot ≤ 2 F
AR	Homozygot < 5 ** AF < 1 %	Homozygot ≤ 1 F Heterozygot ≤ 10 P ***

* Der Grenzwert < 10 entspricht einer Frequenz von unter ~ 0.06 % in der gnomAD Datenbank.

** Der Grenzwert von < 5 entspricht einer Frequenz von unter ~ 0.03 % in der gnomAD Datenbank.

*** Der Grenzwert von ≤ 10 entspricht einer Frequenz von unter ~ 1 % in der EVAdb Genomdatenbank.

P = Personen; F = Familien; AF = Allelfrequenz; AD = autosomal-dominant; AR = autosomal-rezessiv

Mithilfe der in die EVAdb integrierten Werte der Vorhersageprogramme *PolyPhen-2* (pph2) (63,64), *Sorting Intolerant from Tolerant* (SIFT) (65,66) und *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD) (67,68) wurden mögliche funktionelle Konsequenzen von Varianten eingeschätzt. Die Festlegung der Grenzwerte für die Nutzung der Programme orientierte sich dabei an den Informationen, die von den jeweiligen Herausgebern veröffentlicht wurden (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: Grenzwerte und Interpretation für die Vorhersageprogramme pph2, SIFT und CADD.

<i>Vorhersageprogramm</i>	<i>Grenzwerte</i>	<i>Interpretation</i>
pph2	(0-1) ≤ 0.75 kein Einfluss > 0.75 Einfluss	Einfluss von SNP in kodierender Region auf Proteinstruktur und -funktion.
SIFT	(0-1) < 0.05 Einfluss ≥ 0.05 kein Einfluss	Einfluss von SNP in kodierender Region, gemessen anhand von Konservierungsdaten.
CADD	(1-99) ≥15 mäßige Wahrscheinlichkeit ≥ 20 hohe Wahrscheinlichkeit	Maß für Wahrscheinlichkeit, dass eine Variante die Proteinstruktur und -funktion schädigt.

Pph2 = Polyphen-2; SIFT = Sorting Intolerant from Tolerant; CADD = Combined Annotation Dependent Depletion; SNP = Single Nucleotide Polymorphism

Die Datenbanken ClinVar und *Leiden Open Variation Database* (LOVD) (v.3.0) (69,70) wurde für vorhandene Einstufungen zu den Varianten genutzt. Die Konservierung der veränderten Bereiche wurde über UCSC ermittelt. Das Programm *Database of*

Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER) (v.11.13) (71,72) wurde angewendet, um die Lagebeziehung von Varianten zu bestimmten regulatorischen Elementen zu überprüfen und die *Probability of Loss-of-function Intolerance* (pLI) zu ermitteln. Der pLI-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit für die Intoleranz eines Gens gegenüber dem Auftreten von Funktionsverlustvarianten an und kann dabei Zahlenwerte zwischen null (Toleranz) und eins (Intoleranz) annehmen (72).

Um mögliche Spleiß-Effekte intronischer Varianten zu detektieren, wurden diese mittels SpliceAI (73,74) überprüft. Ausgewählte Varianten wurden zusätzlich in Alamut (Alamut Visual Plus version v1.6.1 | © 2022 SOPHiA GENETICS) auf das Vorhandensein von Spleiß-Effekten untersucht. Alamut greift dabei auf die Vorhersage-Algorithmen der vier Programme SpliceSiteFinder-like (75), MaxEntScan (76), GeneSplicer (77) und NNSPLICE (78) zurück.

Bei Varianten, die in kodierenden Bereichen gelegen sind oder mit diesen überlappen und nach Abschluss der zuvor beschriebenen Analysen als möglich kausal erachtet wurden, wurde eine Klassifikation anhand der Kriterien des *American College of Medical Genetics* (ACMG-Kriterien) (79) vorgenommen. Dieser Kriterienkatalog dient der Einstufung der Wahrscheinlichkeit von Varianten krankheitsverursachend zu sein (**Tabelle 4**). Genetische Veränderungen werden dabei einer der fünf Klassen *benign* (B), *likely benign* (LB), *variant of uncertain significance* (VUS), *likely pathogenic* (LP) oder *pathogenic* (P) zugeordnet. Diese Zuordnung basiert auf einer Reihe definierter Kriterien der Kategorien *very strong evidence of pathogenicity* (PVS), *strong evidence of pathogenicity* (PS), *moderate evidence of pathogenicity* (PM) und *supporting evidence of pathogenicity* (PP), welche z. B. Eigenschaften wie Allelfrequenzen, Ergebnisse von *in silico* Programmen sowie Segregationsmuster beinhalten. Die zu untersuchende Variante wird zunächst auf das Zutreffen der einzelnen Kriterien überprüft, aus Anzahl und Zusammensetzung erfüllter Kriterien ergibt sich anschließend die Klasse. Für eine detaillierte Erklärung der im Folgenden für einige Varianten angeführten Kriterien sei an diesem Punkt auf die entsprechende Veröffentlichung des ACMG verwiesen (79).

Tabelle 4: Einteilung in Klassen nach den ACMG-Kriterien.

<i>Klasse</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Interpretation</i>
1	B	Normvariante ohne klinische Relevanz
2	LB	Wahrscheinliche Normvariante
3	VUS	Variante unklarer klinischer Signifikanz
4	LP	Wahrscheinlich pathogene Variante
5	P	Pathogene Variante

B = benign; LB = likely benign; VUS = variant of uncertain significance, LP = likely pathogenic; P = pathogenic

Anschließend wurde ein Fazit erstellt, in dem alle möglich kausalen Varianten mitsamt ihren Eigenschaften dargestellt wurden. Dies wurde durch eine detaillierte Literaturrecherche zu den vorliegenden Varianten – mit besonderem Fokus auf bereits beschriebene tief-intronische Varianten – in den Datenbanken PubMed (80) und Google Scholar (81) gestützt. Es folgte eine Reevaluation der klinischen Daten, um Unstimmigkeiten zwischen vorliegendem Phänotyp und molekularer Verdachtsdiagnose zu erkennen. Zu diesem Zweck fanden auch molekulare Diagnostikboards mit den zuweisenden Behandlern statt, in denen klinische und genetische Befunde besprochen wurden. Fälle, die dadurch konsensuell als gelöst eingestuft werden konnten, wurden zur Diagnosesicherung vom Forschungs- an den Diagnostikbereich übergeben. Erst nach unabhängiger Bestätigung der Varianten erfolgte die Mitteilung des molekularen Befundes an die Patienten. Fälle, bei denen die Analyse keine auffälligen Varianten ergab, es mehrere möglich kausale Gene gab, oder Phänotyp und Genotyp nicht korrelierten, wurden als ungelöst klassifiziert.

3 Ergebnisse

Alle Familien der Studienkohorte wurden nach der Untersuchung anhand des in **Abbildung 6** dargestellten strukturierten Analyseschemas in gelöste, wahrscheinlich gelöste und ungelöste Fälle unterteilt (**Abbildung 7A**). Dabei konnten fünf (23 %) der insgesamt 22 Familien als „gelöst“ eingestuft werden, weitere sieben Familien (32 %) wurden der Kategorie „wahrscheinlich gelöst“ zugeordnet. Die verbleibenden zehn Familienfälle (45 %) wurden zum Untersuchungszeitpunkt als „ungelöst“ klassifiziert. Diese drei Kategorien weisen unterschiedliche Verteilungen der verschiedenen Familienkonstellationen auf. Unter den gelösten Fällen befinden sich vier Trios (80 %) und nur ein Einzelfall (20 %) (**Abbildung 7B**). Bei den wahrscheinlich gelösten Fällen liegen drei Trios (43 %), drei Einzelpersonen (43 %) sowie noch eine andere Familienkonstellation (14 %) vor (**Abbildung 7C**). Die ungelösten Fälle setzen sich aus zwei Trios (20 %), fünf Einzelpersonen (50 %) und drei davon abweichenden Konstellationen (30 %) zusammen (**Abbildung 7D**).

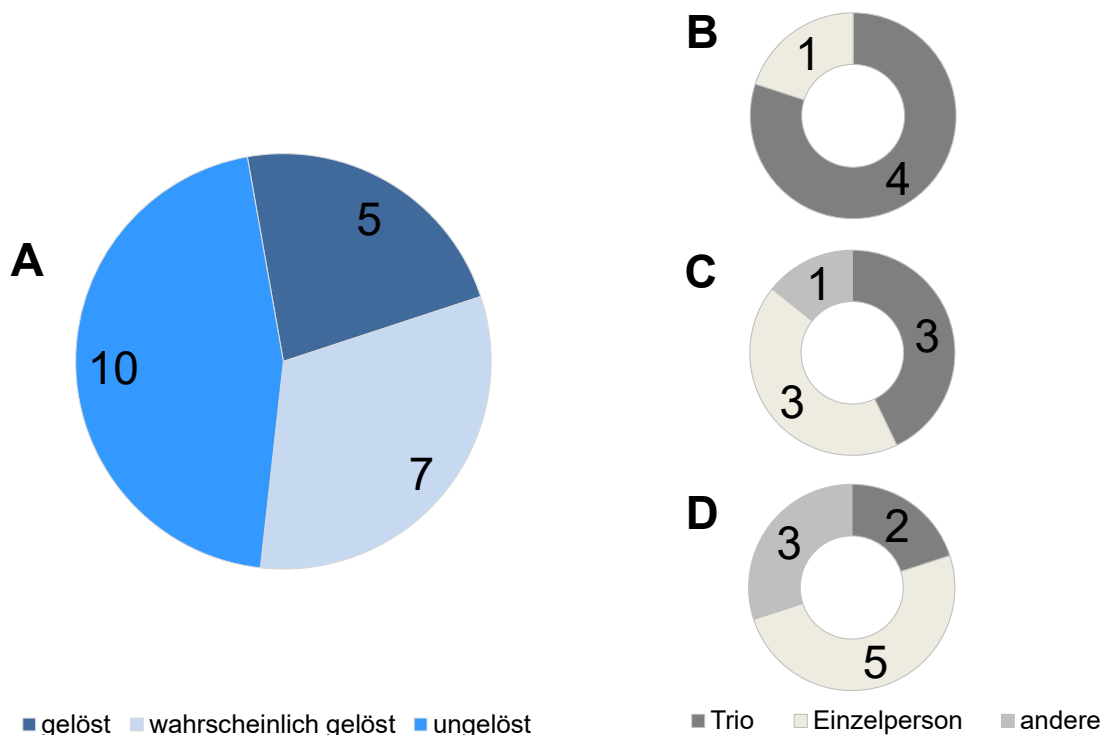


Abbildung 7: Anteil von gelösten, wahrscheinlich gelösten und ungelösten Fällen an der Studienkohorte und Verteilung der Familienkonstellationen (n = 22). Die Zahlen in den Sektionen der Diagramme geben die Anzahl an Familien, die der jeweiligen Kategorie zugeordnet wurden, wieder. Die verschiedenen Farben der Sektionen kodieren für die unterschiedlichen Kategorien und sind der Legende zu entnehmen. **(A) Einteilung der Fälle in drei Kategorien.** Das Diagramm stellt die Einteilung aller analysierten Familienfälle in die Kategorien „gelöst“, „wahrscheinlich gelöst“ und „ungelöst“ dar. **(B) Familienkonstellationen innerhalb der gelösten Fälle (n = 5).** Dargestellt ist die Zusammensetzung der

gelösten Familienfälle aus Trios und Einzelpersonen. **(C) Familienkonstellationen innerhalb der wahrscheinlich gelösten Fälle (n = 7).** Dargestellt ist die Zusammensetzung der wahrscheinlich gelösten Familienfälle aus Trios, Einzelpersonen und davon abweichenden Familienstrukturen. **(D) Familienkonstellationen innerhalb der ungelösten Fälle (n = 10).** Die Abbildung zeigt die Verteilung der Familienkonstellationen unter den ungelösten Fällen.

3.1 Ungelöste Fälle

In zehn der analysierten Fälle (45 %) konnte durch die WGS-Analyse keine molekulargenetische Ursache, welche das Vorliegen einer IRD mit ausreichender Sicherheit erklären würde, gefunden werden. Diese Familien fallen demnach in die Kategorie „ungelöste Fälle“. Die Stammbäume dieser Familien sind im Folgenden gesammelt dargestellt (**Abbildung 8**).

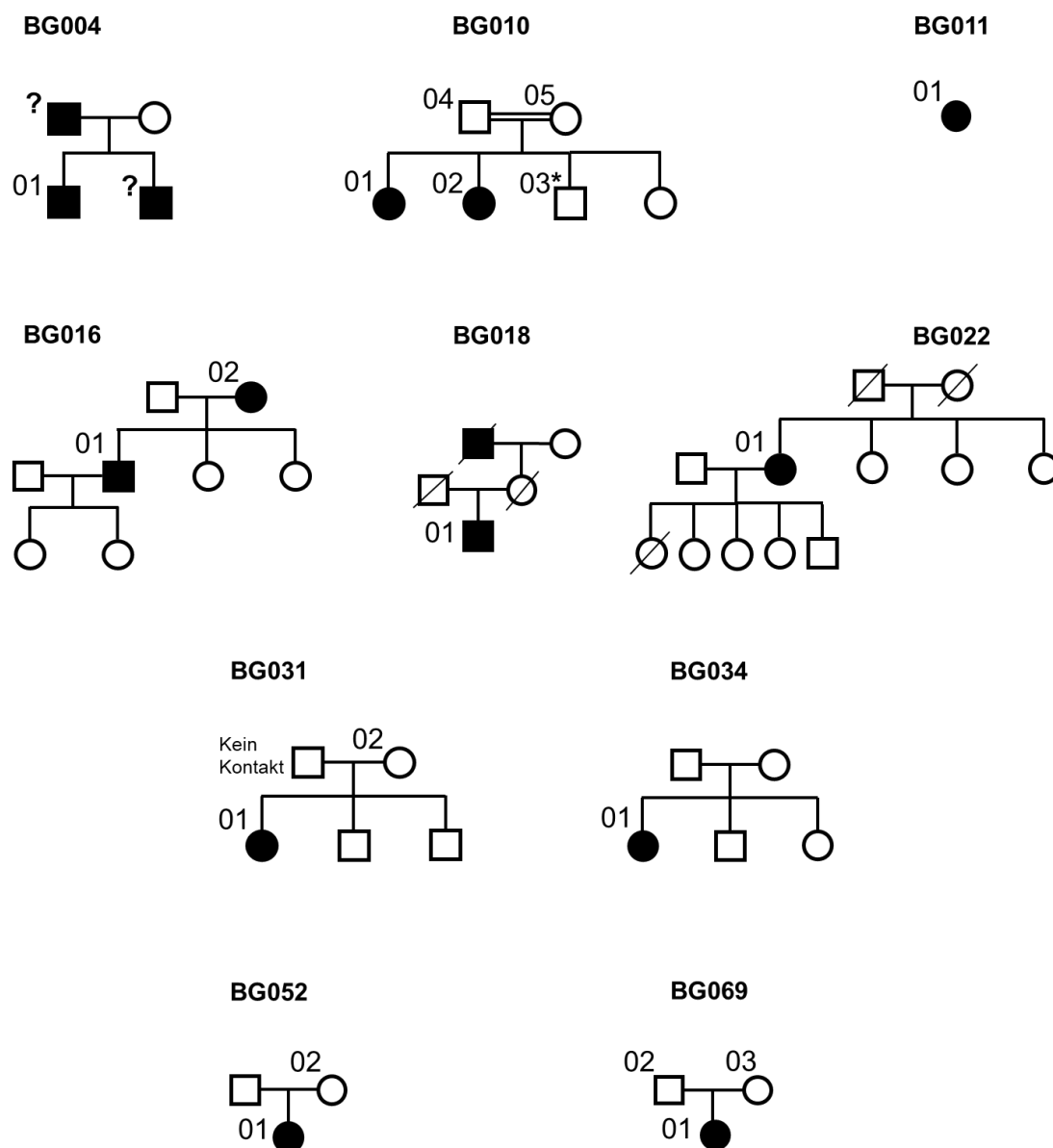


Abbildung 8: Stammbäume der ungelösten Fälle. Dargestellt sind die Stammbäume der Familien, die als „ungelöst“ eingestuft wurden. Alle nummerierten Familienmitglieder nahmen an der Studie teil (DNA

vorhanden) und wurden mit Ausnahme der Person BG010/03 (mit * gekennzeichnet) mittels WGS untersucht. Kreise kodieren in dieser Darstellung für Frauen, Quadrate für Männer. Betroffene Personen sind anhand der schwarz ausgefüllten Formen erkennbar. Bereits verstorbene Familienmitglieder sind in der Abbildung durchgestrichen. Bei Personen, die mit einem Fragezeichen gekennzeichnet sind, ist das Vorliegen der Erkrankung nicht gesichert. Alle Indexpersonen tragen die Nummer 01.

Die Zuordnung der Fälle zur Kategorie „ungelöst“ erfolgte aus unterschiedlichen Gründen: Zum Teil wurden genetische Veränderungen in mehreren IRD-Genen gefunden, es war jedoch nicht möglich, eine eindeutig krankheitsauslösende Veränderung unter diesen Genen zu detektieren. Häufig lagen in den ungelösten Fällen auch tief-intronische Varianten in IRD-Genen vor, welche am ehesten unter der Annahme zusammengesetzt heterozygoter Vererbung mit einer kodierenden Variante als Krankheitsursache infrage kämen (**BG004**, **BG010**, **BG011**, **BG018**, **BG022**, **BG031**, **BG034**, **BG052**, **BG064**). Über die funktionelle Relevanz dieser intronischen Varianten konnte aber – nach aktuellem Stand in Wissenschaft und Forschung – in vielen Fällen keine Aussage getroffen werden. Bei einigen Patienten passten auch deren klinische Merkmale nicht zu jener Erkrankung, mit der Veränderungen im betreffenden Gen assoziiert sind (**BG016**, **BG031**). In einer weiteren Familie wurde eine auffällige Strukturvariante in einem Gen gefunden, welches bisher nicht zu den bekannten IRD-Genen zählt (**BG034**).

Tabelle 5 bietet eine vollständige Auflistung aller ungelösten Fälle, inklusive der darin priorisierten Varianten. Einige der ungelösten Fälle werden im Folgenden näher besprochen, um die Herausforderungen, die sich bei der Diagnosefindung mittels WGS-Methode ergaben, an Beispielen zu zeigen. Alle vorkommenden Varianten liegen, wenn im Text nicht anders erwähnt, in heterozygoter Form vor. Eine Auflistung der entsprechenden NM-Nummern zu allen in Text und Tabellen angeführten Genen findet sich im **Anhang 1**. Weitere, in den Familien **BG022**, **BG034** und **BG052** vorkommende, intronische Varianten sind ebenso dem Anhang zu entnehmen (**Anhang 2-4**).

Tabelle 5: Ungelöste Fälle mit priorisierten Varianten und deren ACMG-Klassifikation in ClinVar (46).

<i>Familien-ID</i>	<i>Indikation</i>	<i>Gen</i>	<i>Erkrankung, Erbgang</i>	<i>V1</i>	<i>ACMG V1</i>	<i>V2</i>	<i>ACMG V2</i>
BG004	RP	<i>RAB28</i>	ZSD 18, AR	c.22A>T p.(Ser8Cys)	VUS *	c.392-36899G>T p.?	-
BG010	RP	<i>PDE6B</i>	RP 40, AR	c.2206G>A p.(Val736Met)	VUS	c.711+1585T>C p.? oder c.711+8930G>A p.?	- -
BG011	RP	<i>NMNAT1</i>	LCA 9, AR	c.619C>T p.(Arg207Trp)	P-LP	c.-56-11728A>C p.?	-
		<i>SPP2</i>	RP, AD	c.591C>A p.(Tyr197Ter)	VUS *	-	-
BG016	MD	<i>TEAD1</i>	SCRA, AD	c.443C>T p.(Pro148Leu)	VUS *	-	-
BG018	RP	<i>PRPF6</i>	RP 60, AD	c.2638T>G p.(Phe880Val) oder c.2639T>C p.(Phe880Ser)	- -	- -	- -
		<i>CACNA2D4</i>	RCD 4, AR	c.721_722del p.(Asp241ProfsTer26)	-	c.2247-1850T>C p.?	-

		<i>ABCA4</i>	RP 19, AR	c.5338C>G p.(Pro1780Ala)	P-VUS	c.6005+63G>C p.?	-
BG022	RP	<i>CDH23</i>	USH1D, AR	c.2078T>C p.(Leu693Pro)	VUS	7 intronische Varianten	-
BG031	RP	<i>IMPG2</i>	RP 56, AR	c.392G>A p.(Arg131His)	VUS-LB	c.533+6993T>C p.?	-
		<i>RCBTB1</i>	RDEOA, AR	c.488G>A p.(Gly163Asp)	-	c.-41-5809T>C p.? oder c.1172+412G>A p.?	- -
BG034	RP	<i>USH2A</i>	RP 39, AR	c.10190_10191del p.(Lys3397fs)	P	18 intronische Varianten	-
		<i>EHBP1</i>	-	NC_000002.11: g.62929389_ 62942944del p.?	-	c.-295-10291C>T p.?	-
BG052	RP	<i>USH2A</i>	RP 39, AR	c.5266G>A p.(Val1756Ile)	VUS *	4 intronische Varianten	-
		<i>SAMD11</i>	RP, AR	c.1913C>T	VUS *	c.73-1987C>T	-

				p.(Pro638Leu)		p.? oder c.73-1991C>T p.?	-
BG069	Syndromale RP	<i>AIRE</i>	APS 1, AD/AR	c.982C>T p.(Arg328Trp)	VUS	c.132+60G>C p.? oder c.1504-741dup p.?	-
		<i>NCAPG2</i>	3KS, AR	c.1390C>T p.(Leu464Phe)	VUS *	c.1816-856del p.?	-
n	10						

Der Krankheitsbezug zum jeweiligen Gen wurde der Datenbank OMIM entnommen. Bei Genen, die mehrere Erkrankungen auslösen können, ist nur die jeweils zur Untersuchungsindikation passende Erkrankung mit Erbgang angegeben. Die teils vorhandenen ACMG-Klassifikationen der Varianten stammen größtenteils aus ClinVar, in einigen Fällen (mit * gekennzeichnet) wurden Varianten bei der Auswertung klassifiziert. In ClinVar lagen teils variable Einschätzungen zur selben Variante vor, deren Spannweite jeweils in der Tabelle angegeben ist. Die genaue Position der sieben intronischen Varianten in *CDH23* (BG022), sowie die 18 bzw. vier intronischen Varianten in *USH2A* (BG034 bzw. BG052) sind dem Anhang zu entnehmen (**Anhang 2-4**). RP = Retinitis Pigmentosa; MD = Makula-Dystrophie; ZSD = Zapfen-Stäbchen-Dystrophie; LCA = Leber'sche Kongenitale Amaurose; SCRA = Sveinsson'sche Chorioretinale Atrophie; RCD = Retinale Zapfen-Dystrophie; USH1D = Usher-Syndrom Typ 1D; RDEOA = Retinale Dystrophie mit oder ohne extraokuläre Anomalien; BBS 15 = Bardet-Biedl-Syndrom 15; APS 1 = Autoimmunes Polyendokrines Syndrom Typ 1; 3KS = Khan-Khan-Katsanis-Syndrom; AR = autosomal-rezessiv; AD = autosomal-dominant; V1 = Variante 1; V2 = Variante 2

BG031 ist eine Familie, bei der sowohl die nicht-betroffene Mutter als auch die Indexpatientin mit der Indikation RP an der Studie teilnahmen. Aus der molekulargenetischen Analyse des Genoms ergaben sich potenziell kausale Varianten in zwei Genen. Im *Interphotoreceptor Matrix Proteoglykan 2* Gen (*IMPG2*, OMIM * 607056), welches mit autosomal-rezessiver Retinitis Pigmentosa 56 (MIM # 613581) assoziiert ist, wurden eine Variante, die zum Aminosäureaustausch führt (*missense*), bei beiden Personen und eine intronische Variante nur bei der Indexperson gefunden. Für die *missense* Variante c.392G>A / p.(Arg131His) existierten auf ClinVar zum Analysezeitpunkt Einstufungen von VUS bis LB, die intronische Variante c.533+6993T>C war in keiner der aufgerufenen Datenbanken bekannt. Im zweiten Gen, *RCC1 Domain- and BTB Domain-Containing Protein 1* (*RCBTB1*, OMIM * 607867), liegt ebenso eine *missense* Variante c.488G>A / p.(Gly163Asp) bei Mutter und Indexpatientin vor, bisher jedoch ohne vorhandene Klassifikation. Zudem ist die Indexpatientin Trägerin zweier intronischer Varianten in *RCBTB1*, c.1172+412G>A und c.-41-5809T>C, die im Genom der Mutter nicht detektiert wurden. Pathogene Varianten in *RCBTB1* sind mit dem Auftreten von Retinaler Dystrophie mit oder ohne extraokulären Anomalien (MIM # 617175) assoziiert. Als mögliche Anomalien können bei dieser Erkrankung unter anderem Innenohrschwerhörigkeit, Lungenfibrose sowie hormonelle Veränderungen auftreten (49). In einem molekularen Diagnostikboard konnte geklärt werden, dass bei der Indexpatientin weder extraokuläre Anomalien noch andere Symptomatiken vorliegen, die *RCBTB1* als kausales Gen wahrscheinlicher als *IMPG2* machen würden. Bei Vorhandensein von zwei möglich kausalen Genen konnte dieser Fall nicht gelöst werden. Ähnlich dieser Familie bestehen auch in **BG011**, **BG018** und **BG052** mögliche Veränderungen in mehr als einem Gen.

In Familie **BG010** lagen die Genomdaten zweier Schwestern mit RP sowie der nicht-betroffenen Eltern zur Analyse vor. Von einem weiteren Bruder ohne retinale Erkrankung waren Bioproben für die Möglichkeit einer genetischen Nachuntersuchung asserviert worden. Bei den Eltern war in diesem Fall eine Konsanguinität unklaren Grades bekannt. Nach Durchführung der WGS-Auswertung wurde aufgrund der Segregationsweise der vorhandenen Varianten nur ein Gen als möglich kausal befunden. Im *Phosphodiesterase 6B* Gen (*PDE6B*, OMIM * 180072) trat eine *missense* Variante c.2206G>A / p.(Val736Met) bei der Indexperson, der erkrankten Schwester sowie der Mutter auf. Diese Variante war auch bereits aus einer Untersuchung mittels Gen-Panel im Jahr 2016 bekannt und als VUS eingestuft worden. Einträge in den Datenbanken ClinVar und LOVD stützten diese

Klassifikation. Die mit *PDE6B* assoziierte Erkrankung, Retinitis Pigmentosa 40 (MIM # 613801), folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang, weshalb eine weitere Variante in *trans* notwendig wäre, um einen retinalen Phänotyp ursächlich zu erklären. Zusätzlich zur *missense* Variante wurden zwei seltene, tief-intronische Varianten, c.711+1585T>C und c.711+8930G>A, bei beiden Betroffenen und beim Vater detektiert. Eine Sanger-Sequenzierung zur Überprüfung des Vorliegens der drei gefundenen Varianten beim nicht-betroffenen Bruder (BG010/03) könnte dem Ausschluss von *PDE6B* als kausales Gen dienen oder alternativ die Vermutung der Krankheitsursächlichkeit noch bekräftigen. Auch die Familien **BG004** und **BG022** konnten bei nur einem gefundenen Gen-Kandidaten mit unbekannten intronischen Varianten bisher nicht gelöst werden.

Im Fall der Familie **BG016** wurden die Genomdaten des Indexpatienten sowie dessen ebenfalls betroffener Mutter untersucht. Bei beiden Personen wurde zuvor klinisch eine Makula-Dystrophie diagnostiziert. Im Rahmen der Analysen wurde eine *missense* Variante c.443C>T / p.(Pro148Leu) im *Tea Domain Family Member 1* Gen (*TEAD1*, OMIM * 189967) als am ehesten kausale genetische Veränderung gefunden. Die Variante wurde als VUS bewertet (ACMG: PM2, PP1, PP2, PP3) (79), dies stimmte auch mit einer Einschätzung auf ClinVar überein. Das *TEAD1*-Gen ist als Krankheitsursache für die autosomal-dominant vererbte Erkrankung Sveinsson'sche Chorioretinale Atrophie (SCRA, MIM # 108985) bekannt. Die SCRA wird in der Literatur jedoch in Zusammenhang mit einem sehr speziellen Phänotyp beschrieben. Bei Erkrankten erkennt man in der Untersuchung des Augenhintergrunds bilaterale, zungenförmige Streifen von atropher Retina und Choroidea, welche von der peripapillären Region ausgehend in die Peripherie des Augenhintergrunds reichen (82). Ein molekulares Diagnostikboard zum Fall ergab, dass der bei den in dieser Familie Betroffenen erhobene Fundoskopie-Befund nicht mit dem typischen Bild einer SCRA übereinstimmt. Aufgrund der phänotypischen Diskrepanz sowie unklarer funktioneller Bedeutung der gefundenen Variante konnte der Fall nicht als gelöst eingestuft werden.

BG034 ist eine weibliche Einzelperson mit der Indikation RP, in deren Familie es keine weiteren Fälle von IRDs gibt. Hier wurde die heterozygote Variante c.10190_10191del / p.(Lys3397fs), die zu einer Verschiebung des Leserasters (*frameshift*) führt, im *Usherin* Gen (*USH2A*, OMIM * 608400) gefunden, das mit Retinitis Pigmentosa 39 (MIM # 613809) assoziiert wurde. Diese Veränderung konnte auch schon 2014 bei einer Gen-Panel-Untersuchung festgestellt und als P klassifiziert werden. Durch WGS wurden noch 18

weitere intronische Varianten gefunden, deren Bedeutung jedoch aktuell unklar ist (**Anhang 3**). Zudem fiel bei der Betroffenen eine ca. 13.600 Basenpaare (bp) lange heterozygote Deletion im Bereich NC_000002.11:g.62929389_62942944del auf, welche die ersten beiden Exons des Gens *EH Domain-Binding Protein 1* (*EHBPI*, OMIM * 609922) umfasst. In den Geweben der humanen Retina ist eine Expression von *EHBPI* laut EyeIntegration (57) gegeben, in Studien mit Mäusen, in denen das *EHBPI*-Gen ausgeschaltet wurde, wiesen die Versuchstiere allerdings keinen besonderen okulären Phänotyp auf (53).

3.2 Wahrscheinlich gelöste Fälle

In sieben Familien der Studienkohorte (32 %) führte die Analyse zu Ergebnissen, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit als kausal zu betrachten sind. Diese Fälle wurden der Kategorie „wahrscheinlich gelöst“ zugeteilt. Im Folgenden sind die zu den Familien gehörigen Stammbäume dargestellt (**Abbildung 9**).

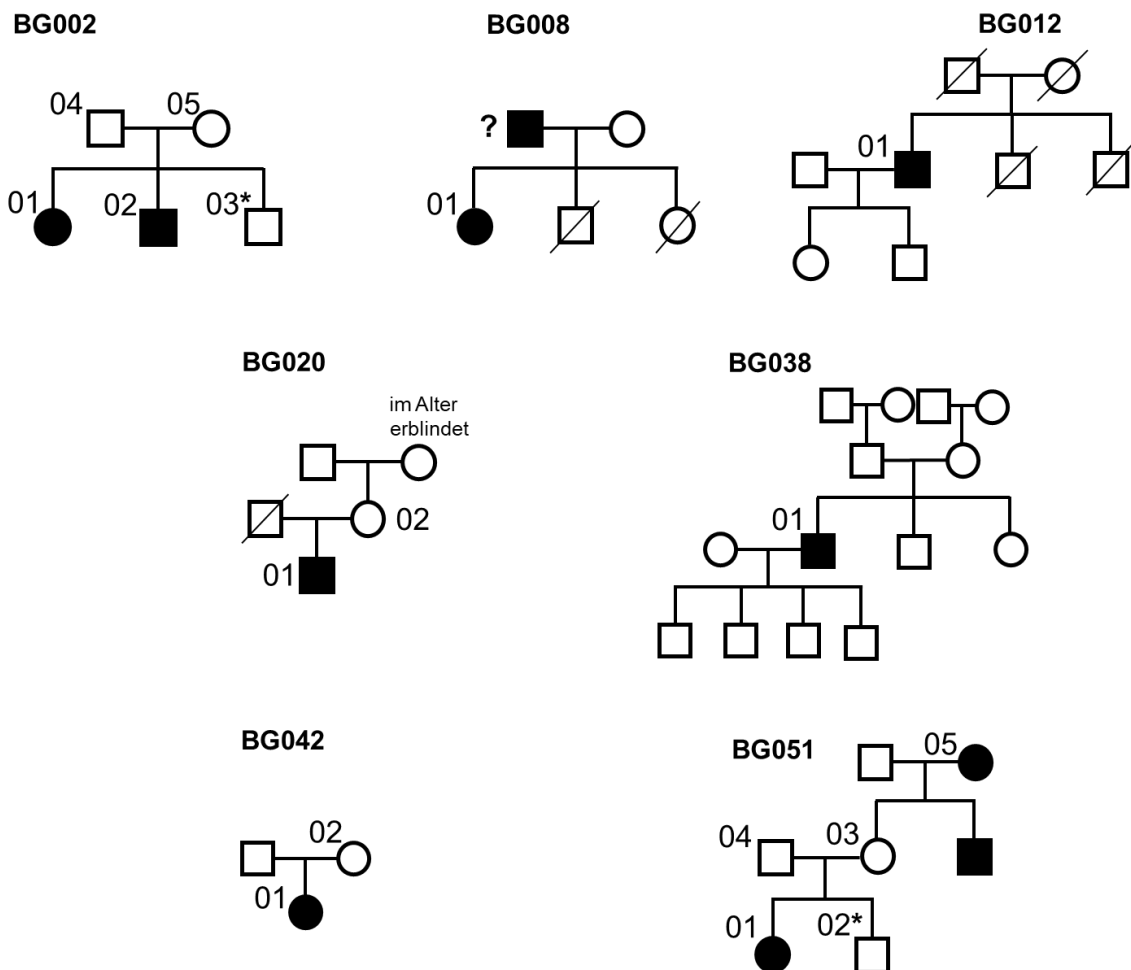


Abbildung 9: Stammbäume der wahrscheinlich gelösten Fälle. Dargestellt sind die Stammbäume der Familien, die als „wahrscheinlich gelöst“ eingestuft wurden. Alle nummerierten Familienmitglieder

nahmen an der Studie teil (DNA vorhanden) und wurden mit Ausnahme der Personen BG002/03 und BG051/02 (mit * gekennzeichnet) mittels WGS untersucht. Alle Indexpersonen tragen die Nummer 01.

Die molekulargenetischen Analyseergebnisse ausgewählter Fälle sollen hier exemplarisch näher ausgeführt werden. Eine vollständige Auflistung der wahrscheinlich gelösten Familien und der dabei priorisierten Varianten ist in **Tabelle 6** zur Übersicht dargestellt. Alle vorkommenden Varianten liegen, sofern nicht anders beschrieben, in heterozygoter Form vor.

Tabelle 6: Wahrscheinlich gelöste Fälle mit priorisierten Varianten und deren ACMG-Klassifikation in ClinVar (46).

<i>Familien-ID</i>	<i>Indikation</i>	<i>Gen</i>	<i>Erkrankung, Erbgang</i>	<i>V1</i>	<i>ACMG V1</i>	<i>V2</i>	<i>ACMG V2</i>
BG002	RP	<i>ABCA4</i>	RP 19, AR	c.4685T>C p.(Ile1562Thr)	P-VUS	c.2161-123C>T p.?	-
BG008 *	RP	<i>HGSNAT</i>	RP 73, AR	c.1594C>T p.(Pro532Ser)	VUS	c.1843G>A p.(Ala615Thr)	P-B
		<i>NR2E3</i>	RP 37, AD	c.458C>T p.(Ala153Val)	VUS	-	-
BG012 *	RP	<i>ABCA4</i>	RP 19, AR	c.6148G>C p.(Val2050Leu)	LP-B	c.769-784C>T p.[=,Leu257Aspfs*3] und/oder c.5603A>T p.(Asn1868Ile)	P-LB LP-B
		<i>CNGB1</i>	RP 45, AR	c.413-1G>A p.?	P-LP	c.2634+232G>A p.?	-
BG020	RP	<i>SNRNP200</i>	RP 33, AD	c.1951C>T p.(Leu651Phe)	VUS	-	-
BG038	ZSD	<i>ALMS1</i>	ALMS, AR	c.370C>T p.(Gln124Ter)	P	c.325-6070G>A p.?	-
						oder c.9778+1328G>A p.?	-

						oder c.10382-5946A>G p.?	-
BG042	RP	<i>RPGRIP1</i>	ZSD 13, AR LCA 6, AR	c.2554C>T p.(Arg852Ter)	P-LP	c.3100-163dup p.?	-
BG051	RP	<i>RPGR</i>	RP, X-gebunden	NC_000023.10: g.38141092_ 38144107del p.?	-	-	-
n	7						

Der Krankheitsbezug zum jeweiligen Gen wurde der Datenbank OMIM entnommen. Bei Genen, die mehrere Erkrankungen auslösen können, ist nur die jeweils zum Fall passende Erkrankung mit Erbgang angegeben. Die ACMG-Klassifikationen der Varianten entstammen ClinVar (Ausnahme: *SNRNP200*, c.1951C>T im Auswertungsprozess klassifiziert und *ABCA4*, c.769-784C>T aus LOVD). Dabei kamen in ClinVar teils variable Einschätzungen zur selben Variante vor, deren Spannweite jeweils in der Tabelle angegeben ist. In den Familien BG008 und BG012 (mit * gekennzeichnet) liegen in je zwei Genen priorisierte Varianten vor, die als mit gleich hoher Wahrscheinlichkeit kausal bewertet wurden. RP = Retinitis Pigmentosa; ZSD = Zapfen-Stäbchen-Dystrophie; ALMS = Alström-Syndrom; LCA = Leber'sche kongenitale Amaurose; AR = autosomal-rezessiv; AD = autosomal-dominant; V1 = Variante 1; V2 = Variante 2

In Familie **BG002** wurden die Indexpatientin, deren erkrankter Bruder sowie die nicht-betroffenen Eltern untersucht. Bei beiden Erkrankten lautet die klinische Diagnose RP, wobei der Phänotyp der Geschwister Arztbriefen zufolge außerordentlich ähnlich ist (Beginn im zehnten Lebensjahr mit progressiver Dunkelsehstörung). Von einem weiteren, nicht-betroffenen Bruder waren Bioproben für eine mögliche Nachsequenzierung vorhanden. Bei der Genomanalyse wurden zwei Varianten im *ABCA4*-Gen (OMIM * 601691) priorisiert. Dieses Gen ist mit verschiedenen retinalen Erkrankungen assoziiert, Veränderungen führen unter anderem zur autosomal-rezessiven Retinitis Pigmentosa 19 (MIM # 601718). Die zwei betroffenen Personen sind Träger der *missense* Variante c.4685T>C / p.(Ile1562Thr), welche sie von der Mutter geerbt haben. Diese Variante war bereits in einer vorangegangenen Gen-Panel-Untersuchung 2020 als VUS klassifiziert worden, die Suche auf ClinVar hingegen ergab variable Einstufungen von P bis VUS. Als zweite Variante liegt bei den Erkrankten die intronische Variante c.2161-123C>T vor, die vom Vater vererbt wurde und Datenbanken und der Literatur zufolge noch nicht bekannt war. Diese Variante zeigte keinen Spleiß-Effekt in den abgerufenen Programmen, ist jedoch im regulatorischen Bereich um den Promotor lokalisiert. Das Vorhandensein der beiden gefundenen Varianten in *ABCA4* wurde im nicht-erkrankten Bruder (BG002/03) überprüft. Dieser trägt weder die *missense* Variante noch die intronische Variante. Trotz einem der Erkrankung entsprechenden Segregationsmuster der priorisierten Varianten war es unter dem Aspekt einer unbekannten intronischen Variante nicht möglich, den Fall als gelöst abzuschließen.

Vergleichbar mit diesem Fall wurde auch in **BG038**, einer 74-jährigen männlichen Einzelperson, eine als P klassifizierte Variante c.370C>T / p.(Gln124Ter), bei welcher der Basenaustausch zu einem Stoppcodon führt, sowie drei bisher unbekannte intronische Varianten, c.325-6070G>A, c.9778+1328G>A und c.10382-5946A>G, gefunden. Die Veränderungen traten hier im *Centrosome and Basal Body Associated Protein* Gen (*ALMS1*, OMIM * 606844) auf. Die mit *ALMS1* verbundene Erkrankung ist das Alström-Syndrom (MIM # 203800), eine Ziliopathie mit sehr variabler Klinik. Neben dem Auftreten einer Zapfen-Stäbchen-Dystrophie, Hörverlust und hormonellen Störungen, kann es hierbei zur Erkrankung weiterer Organe, wie z. B. Herz, Leber und Nieren kommen (83). Beim eben beschriebenen Indexpatienten besteht die klinisch gesicherte Diagnose einer Zapfen-Stäbchen-Dystrophie. Zudem ist bekannt, dass bei ihm vor etwa 20 Jahren ein Leberversagen unklarer Ätiologie eintrat, das eine Organtransplantation zur Folge hatte. Weitere Informationen zum Phänotyp des Patienten lagen zum Analysezeitpunkt nicht vor. Auch in diesem Fall, sowie darüber hinaus

im Fall von **BG042**, fehlte es an Evidenz zur Relevanz der vorliegenden intronischen Veränderungen, um eine definitive molekulargenetische Diagnose treffen zu können.

In den Familien **BG008** und **BG012** liegen jeweils Veränderungen in zwei möglichen Genen vor, durch welche sich die Erkrankung der Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit genetisch begründen lässt. **BG012** ist ein 82-jähriger, an RP erkrankter Patient, bei dem keine weiteren Familienmitglieder für die Studie rekrutiert werden konnten. Im *Cyclic Nucleotide-Gated Channel Beta-1* Gen (*CNGB1*, OMIM * 600724), das mit autosomal-rezessiver Retinitis Pigmentosa 45 (MIM # 613767) assoziiert ist, wurden bei ihm zwei intronische Varianten gefunden. Die erste Variante c.413-1G>A war schon aus einer 2014 durchgeführten Gen-Panel-Analyse bekannt und als P klassifiziert worden. Das Programm SpliceAI (74) sagte einen starken Einfluss auf den Spleiß-Prozess für diese nahe am Exon gelegene Variante voraus. Die Variante wurde zudem in einer Studie von Saqib et al. (2015) beschrieben, in welcher auch der vorhergesagte Spleiß-Effekt belegt werden konnte (84). Das Vorliegen der zweiten Variante c.2634+232G>A, welche tief-intronisch gelegen ist, wurde erstmals bei Durchführung der WGS-Analyse festgestellt. Über deren Konsequenz konnte durch Vorhersageprogramme und Datenbanken keine Aussage getroffen werden. Im zweiten auffälligen Gen, *ABCA4*, liegen beim Indexpatienten zwei ebenfalls aus 2014 bekannte Veränderungen vor. Dies sind die *missense* Varianten c.6148G>C / p.(Val2050Leu) (2014: VUS) und c.5603A>T / p.(Asn1868Ile) (2014: VUS, hypomorphe Variante). Zudem fiel im Rahmen der WGS-Analyse die intronische Veränderung c.769-784C>T / p.[=,Leu257Aspfs*3] auf. Die *missense* Varianten c.6148G>C und c.5603A>T wurden in einer Studie, bei der *ABCA4* in Fällen mit Morbus Stargardt (MIM # 248200) untersucht wurde, von Schulz et al. (2016) beschrieben (85). Dabei wurde c.6148G>C als LP und c.5603A>T als risikomodulierend für das Auftreten der Erkrankung eingestuft. Sangermano et al. (2019) berichteten zudem über das Vorliegen der tief-intronischen Variante c.769-784C>T in Kombination mit der *missense* Variante c.5603A>T als komplexes Allel, was das gleichzeitige Vorhandensein von zumindest zwei Veränderungen auf demselben Allel bedeutet. Im Rahmen der Studie zeigten sich funktionelle Auswirkungen der intronischen Variante c.769-784C>T, eine definitive Aussage über deren Pathogenität konnte dennoch nicht getroffen werden (25). In **BG012** konnten die Lagebeziehungen der drei vorhandenen Varianten auf den beiden Allelen von *ABCA4* bei der betroffenen Einzelperson nicht überprüft werden und darüber hinaus ergab ein molekulares Diagnostikboard, dass der retinale Phänotyp dieses Patienten nicht dem klassischen Bild einer *ABCA4*-assoziierten

Erkrankung entspricht. Der Fall konnte trotz der Detektion von zwei möglicherweise kausalen Genen somit nicht eindeutig gelöst werden.

Bei Familie **BG020** nahmen die 39-jährige Indexpatientin mit der Indikation RP sowie deren nicht-erkrankte Mutter an der Studie teil. Die Großmutter mütterlicherseits ist laut Angaben der Familie im Alter erblindet – genauere Details lagen hierzu nicht vor. Die Genomanalyse ergab eine *missense* Variante c.1951C>T / p.(Leu651Phe) im *Small Nuclear Ribonucleoprotein, 200-KD* Gen (*SNRNP200*, OMIM * 601664) als wahrscheinlichste genetische Ursache für die bestehende IRD. Veränderungen in diesem Gen können die autosomal-dominant vererbte Erkrankung Retinitis Pigmentosa 33 (MIM # 610359) hervorrufen. Die vorliegende Veränderung kommt sowohl bei der vermutlich nicht-erkrankten Mutter als auch bei der Indexpatientin vor und wurde bereits bei einer Voruntersuchung 2019 als VUS eingestuft. Alle geprüften Vorhersageprogramme sagten für c.1951C>T einen schädigenden Effekt voraus (pph2 0.998; SIFT 0; CADD 31) (64,66,68). Die Durchführung einer Re-Klassifizierung bestätigte die Einstufung als VUS (ACMG: PM1, PM2, PP3) (79). Für *SNRNP200* ergab die Literaturrecherche Fallberichte mit unvollständiger Penetranz der Erkrankung und ausgeprägter phänotypischer Heterogenität. Zudem wurde eine langsame Progression der Erkrankung mit gut erhaltenem Sehvermögen bis in die fünfte oder sechste Lebensdekade beschrieben (86) – ein Zusammenhang mit dem späten Erblinden der Großmutter scheint in der untersuchten Familie möglich. ClinVar Einträgen zufolge gelten *missense* Varianten in diesem Gen als üblicher Erkrankungsmechanismus. Unter Berücksichtigung dieser Informationen erschien die Variante c.1951C>T im *SNRNP200*-Gen, trotz Vorkommen bei der vermutlich nicht-betroffenen Mutter, als die wahrscheinlichste Variante in diesem Fall. Zum aktuellen Zeitpunkt wurde die Evidenzlage zu dieser dennoch als unzureichend für eine genetische Diagnosestellung beurteilt.

Bei Familie **BG051** lag eine Trio-Konstellation für die Analyse vor. Neben der mit RP diagnostizierten Indexpatientin wurden die nicht-betroffenen Eltern und die ebenfalls an RP erkrankte Großmutter mütterlicherseits in der Studie untersucht. Beim nicht-betroffenen Bruder wurde initial keine Genomsequenzierung vorgenommen, eine Blutprobe zur möglichen Nachuntersuchung war jedoch vorhanden. Es war zudem bekannt, dass neben der Indexpatientin und deren Großmutter auch der Onkel mütterlicherseits von der Erkrankung betroffen ist. Eine Voruntersuchung der Indexpatientin mittels Gen-Panel-Analyse 2017 hatte zu keiner molekulargenetischen Diagnose geführt. Bei der WGS-Analyse im Rahmen dieser Studie wurde eine strukturelle Veränderung im *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator* Gen

(*RPGR*, OMIM * 312610), welches sich auf dem X-Chromosom in der p11.4 Region befindet, detektiert. Diese Strukturvariante wurde mittels IGV visualisiert und näher charakterisiert (**Abbildung 10**). Es handelt sich dabei um eine Deletion von etwa 3.000 bp, welche heterozygot bei der Indexperson, der Mutter und der Großmutter vorliegt. Der deletierte Bereich wurde anhand der deutlich erkennbaren Bruchpunkte als NC_000023.10:g.38141092_38144107del definiert. In Richtung der untranslatierten Region (UTR) am 5'-Ende war eine weitere Veränderung der DNA-Sequenz auffallend, welche jedoch aufgrund ihres Vorkommens in mehreren unabhängigen Personen und des Fehlens klarer Bruchpunkte als Artefakt gewertet wurde.

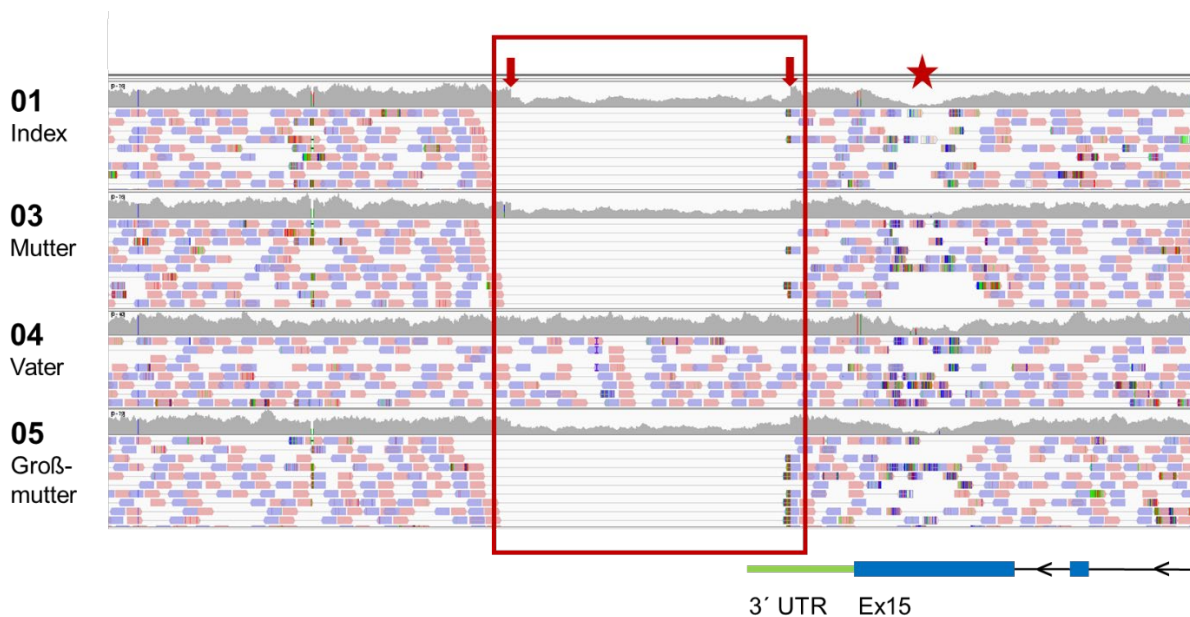


Abbildung 10: Darstellung der Strukturvariante in *RPGR* in IGV (BG051). Die Bildschirmaufnahme aus IGV bildet den chromosomalen Bereich chrX:38.136.758-38.148.454 in der Region p11.4 des X-Chromosoms ab. In der Abbildung gezeigt ist eine ca. 3.000 bp große, heterozygote Deletion. Die roten Pfeile markieren die Bruchpunkte, welche die Strukturvariante begrenzen. Die Leserichtung des Gens ist entlang des Minus-Strangs von rechts nach links. Am ersten Bruchpunkt (rechts gelegen) sinkt die Abdeckung der Reads, einer heterozygoten Variante entsprechend, auf halbe Höhe, am zweiten Bruchpunkt (links gelegen) steigt sie wieder auf Ausgangsniveau an. Der deletierte Bereich (rot umrandet) umfasst einen Teil des 3' UTR-Bereichs von *RPGR* (grüner Balken) sowie einen intergenisch gelegenen Abschnitt. Die Variante kommt nur bei der Indexpatientin (01), der Mutter (03) sowie der Großmutter mütterlicherseits (05) vor. Beim Vater der Indexperson (04) liegt in diesem Bereich des Gens keine Deletion vor. Rechts der markierten Strukturvariante ist, im Bereich von Exon 15, ein weiterer Einbruch der Abdeckung zu erkennen (mit Stern gekennzeichnet) – diese Auffälligkeit ist als Artefakt zu werten. UTR = Untranslatierte Region; Ex = Exon

Das *RPGR*-Gen, in welchem die hier gefundene Veränderung lokalisiert ist, hat im retinal exprimierten Transkript NM_001034853 insgesamt 15 Exons und wird am Minus-Strang abgelesen (**Abbildung 11**). Dabei umfasst der in der Familie vorkommende, deletierte Bereich NC_000023.10:g.38141092_38144107del einen Teil des 3' UTR-Endes (406 bp) von *RPGR*

sowie einen intergenischen Abschnitt, der sich dem Gen anschließt. Die proteinkodierenden Bereiche sind hingegen nicht von der Veränderung betroffen.

***RPGR*-Gen**

NM_001034853, 53.087 bp

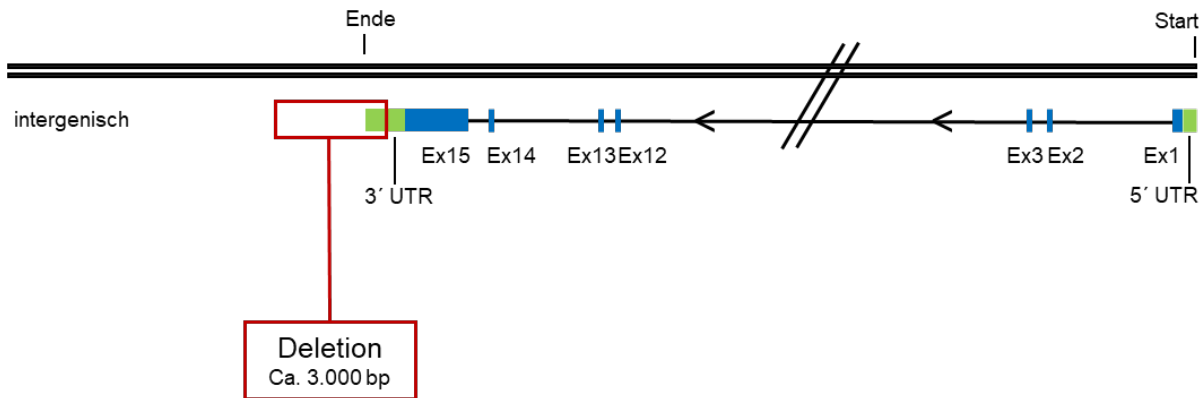


Abbildung 11: Schematische Darstellung des *RPGR*-Gens mit Strukturvariante (BG051). Zu sehen ist das *RPGR*-Gen mit seinen Exons (Ex 1-15, blau) sowie den UTR-Bereichen (grün). Das Transkript umfasst dabei einen Bereich von 53.087 bp. Die heterozygote Deletion (rot umrandet), vorkommend bei Indexpatientin, Mutter und Großmutter, hat eine Größe von ca. 3.000 bp und beinhaltet einen Teil des 3' UTR-Bereichs von *RPGR* sowie einen intergenisch gelegenen Abschnitt. Die Leserichtung des Gens ist entlang des Minus-Strangs von rechts nach links. UTR = Untranslatierte Region; Ex = Exon; bp = Basenpaare

Zu *RPGR* bestehen mehrere Krankheitsassoziationen. Dazu gehört unter anderem die Erkrankung Retinitis Pigmentosa 3 (MIM # 300029). Diese kann bei X-gebundener Vererbung von Varianten sowohl bei hemizygoten männlichen Trägern als auch bei heterozygoten weiblichen Trägerinnen zu Veränderungen der Retina führen. Dabei ist die Ausprägung des Krankheitsbilds bei Variantenträgern männlichen Geschlechts im Allgemeinen schwerwiegend, bei weiblichen Personen reicht das klinische Spektrum hingegen von asymptomatischen Verläufen bis hin zum Auftreten schwerer Formen von RP (87). Ein phänotypisches Charakteristikum ist bei Konduktorinnen pathogener Veränderungen zudem das Vorliegen eines tapetoiden retinalen Reflexes in der Fundoskopie (88). Dieser Befund war auch den Arztbriefen der Indexpatientin im Fall **BG051** zu entnehmen. Des Weiteren wurde ihr gesunder Bruder (BG051/02) zur Segregationsanalyse auf Vorliegen der genetischen Veränderung untersucht. Dabei bestätigte sich die Annahme, dass er kein Träger der Variante ist. Unter diesem Aspekt wurde die Variante im vorliegenden Fall als wahrscheinliche Krankheitsursache gewertet.

3.3 Gelöste Fälle

Von den insgesamt 22 untersuchten Familien konnten fünf Fälle (23 %) als „gelöst“ klassifiziert werden. Die Diagnose, welche die Patienten nach molekulargenetischer Untersuchung mittels WGS erhielten, unterscheidet sich in vier dieser fünf Fälle von der initialen Diagnose für die Studienteilnahme. Im fünften Fall stimmt die endgültige Diagnose mit der ursprünglich gestellten Differenzialdiagnose überein. Unter den gelösten Familien der Studienkohorte lautet die endgültige Diagnose in je einem Fall Usher-Syndrom, ROSAH-Syndrom und Bardet-Biedl-Syndrom (**Abbildung 12A**). In den beiden verbleibenden Familien ergab die Untersuchung einen Glykosylierungsdefekt als Ursache für das vorliegende Krankheitsbild. Bei der Analyse der fünf gelösten Familien traten dabei insgesamt acht verschiedene krankheitskausale Varianten auf (**Abbildung 12B**). Diese Varianten setzen sich aus fünf *missense* Varianten, zwei Strukturvarianten und einer *frameshift* Variante zusammen. In vier der fünf Familien liegt dabei ein autosomal-rezessiver Erbgang vor, in einem Fall folgt die vorliegende Erkrankung einem autosomal-dominanten Vererbungsmuster.

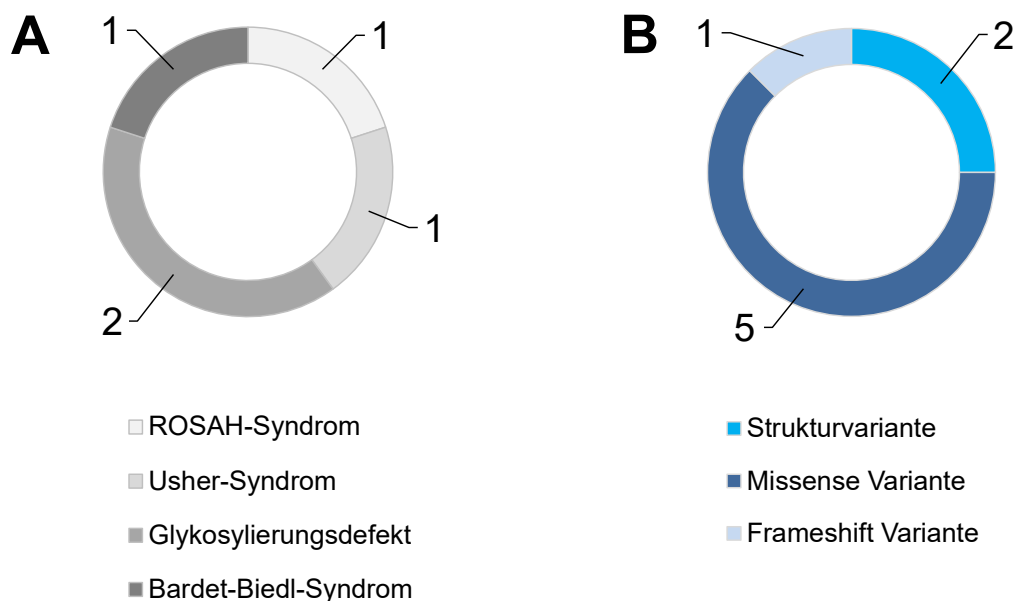


Abbildung 12: Diagnosen und Varianten innerhalb der gelösten Fälle. **(A) Diagnosen der gelösten Familien nach WGS-Untersuchung (n = 5).** Das Diagramm zeigt die Verteilung der endgültigen Diagnosen, die nach Durchführung der WGS-Analyse bei den gelösten Familienfällen gestellt wurden. Die Zahlen am Rand der einzelnen Sektionen geben die Anzahl der jeweiligen Diagnose unter den gelösten Fällen wieder. **(B) Art der kausalen Varianten (n = 8).** Die Grafik gibt einen Überblick über den Anteil verschiedener Varianten an allen kausalen Varianten. Die Zahl am Rand der einzelnen Sektionen stellt die Häufigkeit der jeweiligen Variantenart dar.

Im Weiteren folgen Fallbeschreibungen sowie eine Darstellung der Analyse-Ergebnisse der gelösten Familienfälle. Eine Übersicht über die Stammbäume der besprochenen Familien ist dem vorangestellt (**Abbildung 13**). In **BG007**, **BG047**, **BG057** und **BG048** waren die Voraussetzungen für eine Trio-Analyse erfüllt, **BG026** ist eine Einzelperson. Die Ergebnisse der einzelnen Familien, inklusive der im jeweiligen Fall kausalen Varianten mit ACMG-Einstufung sind der nachfolgenden Übersichtstabelle zu entnehmen (**Tabelle 7**).

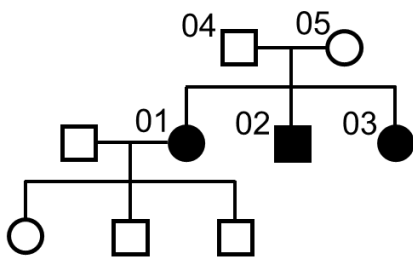
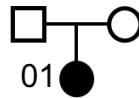
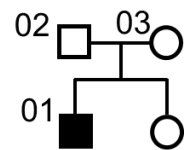
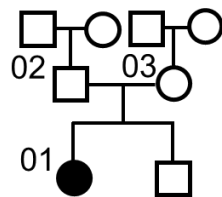
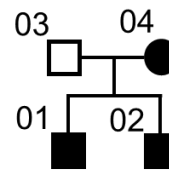
BG007**BG026****BG047****BG048****BG057**

Abbildung 13: Stammbäume der gelösten Fälle. Dargestellt sind die Stammbäume der Familien, die als „gelöst“ eingestuft werden konnten. Alle nummerierten Familienmitglieder nahmen an der Studie teil (DNA vorhanden) und wurden mittels WGS untersucht. Alle Indexpersonen tragen die Nummer 01.

Tabelle 7: Gelöste Fälle mit kausalen Varianten und deren ACMG-Klassifikation.

<i>Familien-ID</i>	<i>Indikation</i>	<i>Gen</i>	<i>Erkrankung, Erbgang</i>	<i>V1</i>	<i>ACMG V1</i>	<i>V2</i>	<i>ACMG V2</i>
BG007	RP/USH	<i>MYO7A</i>	USH1B, AR	NC_000011.9: g.76833599_76849204del p.?	P	NC_000011.9: g.76895250_76897426del p.?	P
BG026	RP	<i>PMM2</i>	CDG1A, AR	c.422G>A p.(Arg141His)	P	c.484C>T p.(Arg162Trp)	P
BG047	RP	<i>BBS10</i>	BBS10, AR	c.235dup p.(Thr79fs)	P	c.856T>C p.(Ser286Pro)	LP
BG048	RP	<i>PMM2</i>	CDG1A, AR	c.422G>A p.(Arg141His)	P	c.53C>G p.(Thr18Ser)	P
BG057	OA	<i>ALPK1</i>	ROSAH-Syndrom, AD	c.710C>T p.(Thr237Met)	P	-	-
<i>n</i>	5						

Der Krankheitsbezug zum jeweiligen Gen wurde der Datenbank OMIM entnommen. Bei Genen, die mehrere Erkrankungen auslösen können, ist nur die zum jeweiligen Fall passende Erkrankung mit Erbgang angegeben. Die angeführte ACMG-Klassifikation aller Varianten erfolgte bei der Auswertung. RP = Retinitis Pigmentosa; USH = Usher-Syndrom; OA = Optikusatrophie USH1B = Usher-Syndrom Typ 1B; CDG1A = Kongenitale Glykosylierungsstörung Typ 1A; BBS10 = Bardet-Biedl-Syndrom 10; AR = autosomal-rezessiv; AD = autosomal-dominant; V1 = Variante 1; V2 = Variante 2

3.3.1 *MYO7A* (BG007)

In Familie **BG007** sind drei Geschwister von einer IRD betroffen, deren Eltern sowie die drei Kinder der Indexpatientin (nicht in die Studie eingeschlossen) sind hingegen nicht erkrankt. Der Studieneinschluss erfolgte aufgrund der klinischen Diagnose RP, jedoch mit der Differenzialdiagnose Usher-Syndrom. Bei der 46-jährigen Indexpatientin liegt neben der Sehstörung noch eine mittelgradige Hörstörung, jedoch ohne Sprachentwicklungsstörung oder Notwendigkeit eines Cochlea-Implantats, vor. Zudem berichtete sie von Gleichgewichtsproblemen. Bei ihrem zum Analysezeitpunkt 40-jährigen Bruder ist ebenfalls eine Hörstörung mit Beginn im fünften Lebensjahr bekannt, sein Gleichgewichtssinn erwies sich aber als unauffällig. Bei der dritten Patientin waren zum Analysezeitpunkt keine Informationen über das Vorliegen zusätzlicher Krankheitssymptome vorhanden. Eine molekulargenetische Untersuchung mittels Gen-Panel war bereits 2016 durchgeführt worden, ergab jedoch keine genetische Diagnose für das vorliegende Krankheitsbild.

Die vorgenommene Genomanalyse ergab bei dieser Familie das Vorliegen von zwei Deletionen in den Betroffenen, wobei beide Strukturvarianten Teile des *Myosin VIIA* Gens (*MYO7A*, OMIM * 276903) umfassen. Die Darstellung der in der Genomdatenbank detektierten Veränderungen erfolgte mithilfe von IGV (**Abbildung 14**). Die erste strukturelle Veränderung, eine heterozygote Deletion, die von der Mutter an alle ihre Kinder vererbt wurde, umfasst einen Bereich von etwa 15.600 bp (**Abbildung 14A**). Der deletierte Bereich wurde anhand der Bruchpunkte als NC_000011.9:g.76833599_76849204del definiert und schließt Teile zweier Gene mit ein. Dies sind die ersten beiden Exons des *MYO7A*-Gens sowie die beiden terminalen Exons des *Calpain 5* Gens (*CAPN5*, OMIM * 602537). Die zweite gefundene Deletion mit ca. 2.200 bp Länge konnte dem Bereich NC_000011.9:g.76895250_76897426del zugeordnet werden (**Abbildung 14B**). Diese Veränderung ist im Genom der Betroffenen und des Vaters in heterozygoter Form vorhanden und umfasst intronische Bereiche sowie das gesamte Exon 27 von *MYO7A*. Die Variantensegregation bei vorliegender Trio-Konstellation zeigt, dass die beiden Strukturvarianten bei den Betroffenen in *trans* zueinander liegen. Demnach ist bei den drei Geschwistern der Familie eine zusammengesetzte Heterozygotie von zwei Varianten für das *MYO7A*-Gen gegeben (**Abbildung 15**).

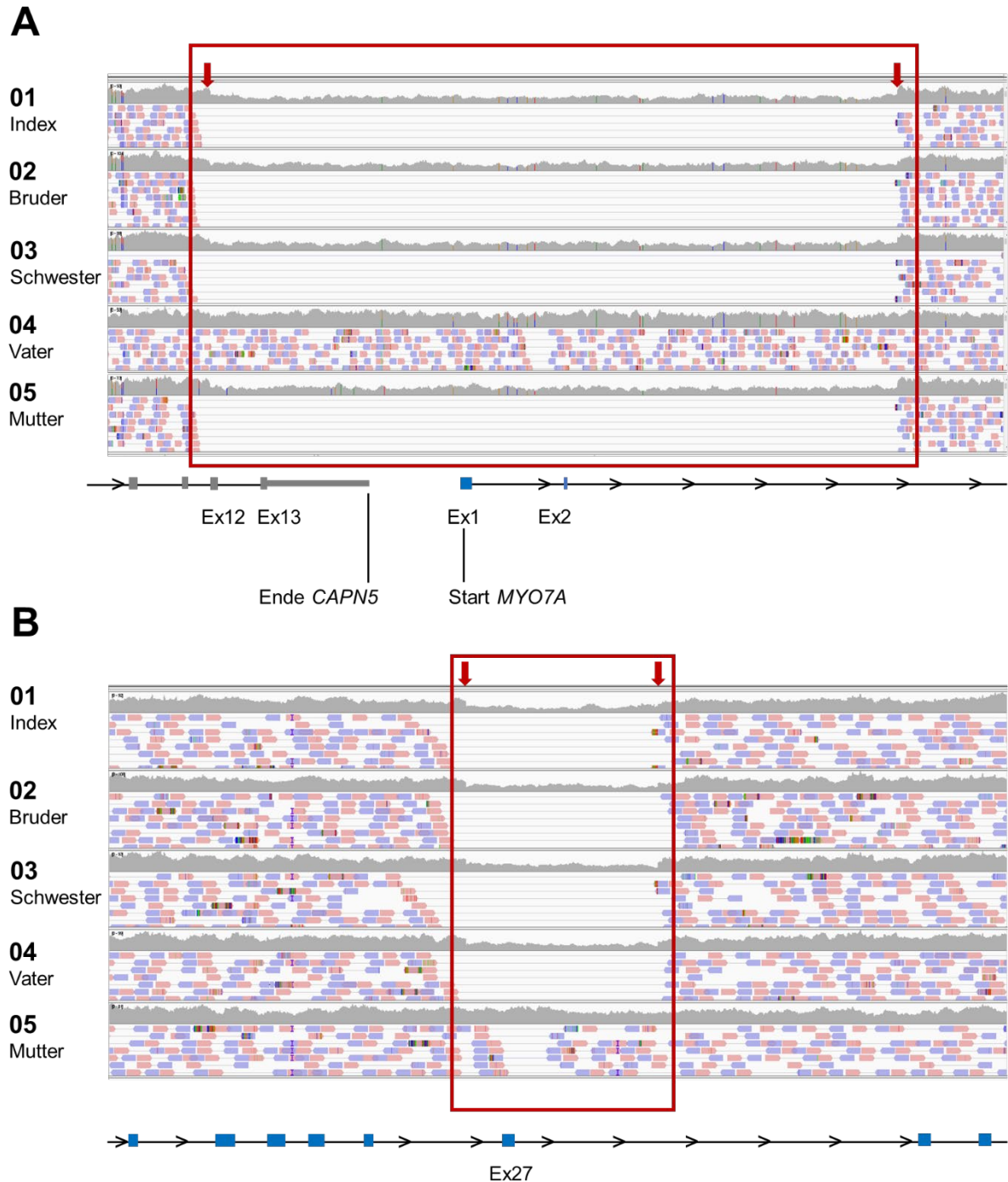


Abbildung 14: Darstellung der Strukturvarianten in *MYO7A* in IGV (BG007). **(A) Deletion 1 (maternal vererbt)**. Die Bildschirmaufnahme aus IGV bildet den chromosomalen Bereich chr11:76.831.263-76.851.603 in der Region q13.5 ab. Darin gezeigt ist eine ca. 15.600 bp große Deletion. Die roten Pfeile markieren die Bruchpunkte, welche die Strukturvariante begrenzen. Am ersten Bruchpunkt (links gelegen) sinkt die Abdeckung der *Reads*, einer heterozygoten Variante entsprechend, auf halbe Höhe, am zweiten Bruchpunkt steigt sie wieder auf Ausgangshöhe an. Der deletierte Bereich (rot umrandet) umfasst Exon 1 und 2 des *MYO7A*-Gens sowie Exon 12 und 13 von *CAPN5*. Diese Multiexon-Deletion wurde von der Mutter (05) an alle drei Kinder (01/02/03) vererbt. **(B) Deletion 2 (paternal vererbt)**. Die in IGV dargestellte Sequenz umfasst den chromosomalen Bereich chr11:76.891.229-76.901.399 im Bereich q13.5. Abgebildet ist eine ca. 2.100 bp große heterozygote Deletion (rot umrandet), die das Exon 27 von *MYO7A* einschließt. Die roten Pfeile markieren dabei die Bruchpunkte der Strukturvariante. Die vorliegende Exon-Deletion wurde vom Vater (04) an seine drei Kinder (01/02/03) vererbt. Ex = Exon

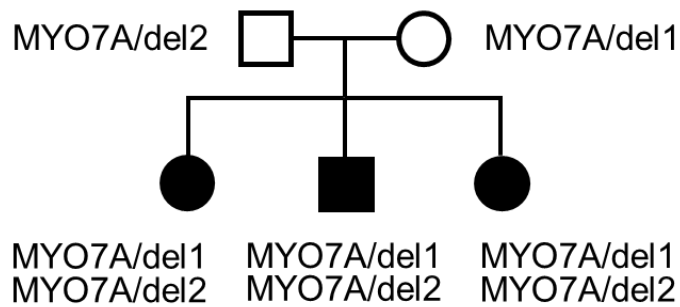


Abbildung 15: Segregation der Varianten in *MYO7A* (BG007). Deletion eins umfasst den Bereich NC_000011.9:g.76833599_76849204 (MYO7A/del1) wurde von der Mutter an die Erkrankten vererbt. Der Vater ist Träger der zweiten Deletion im Bereich NC_000011.9:g.76895250_76897426 (MYO7A/del2), welche er an seine drei Kinder weitergegeben hat. Im Genom der drei Betroffenen liegen somit beide Strukturvarianten vor, bei ihnen besteht eine zusammengesetzte Heterozygotie.

MYO7A ist auf Chromosom 11 in der Region q13.5 lokalisiert und umfasst insgesamt 49 Exons, von denen jedoch nur 48 eine kodierende Funktion haben. Das Startcodon befindet sich im zweiten Exon (**Abbildung 16**). Das Gen *CAPN5*, bei welchem durch die erste Strukturvariante zwei Exons deletiert wurden, ist mit der Erkrankung Neovaskuläre Inflammatorische Vitreoretinopathie (MIM # 193235) assoziiert, die nach autosomal-dominantem Erbgang segregiert. Aufgrund der nicht-betroffenen Mutter als Variantenträgerin sowie phänotypischer Diskrepanzen wurde in diesem Fall jedoch *MYO7A* und nicht *CAPN5* als krankheitskausal angesehen.

MYO7A-Gen

NM_000260.4, 94.977 bp

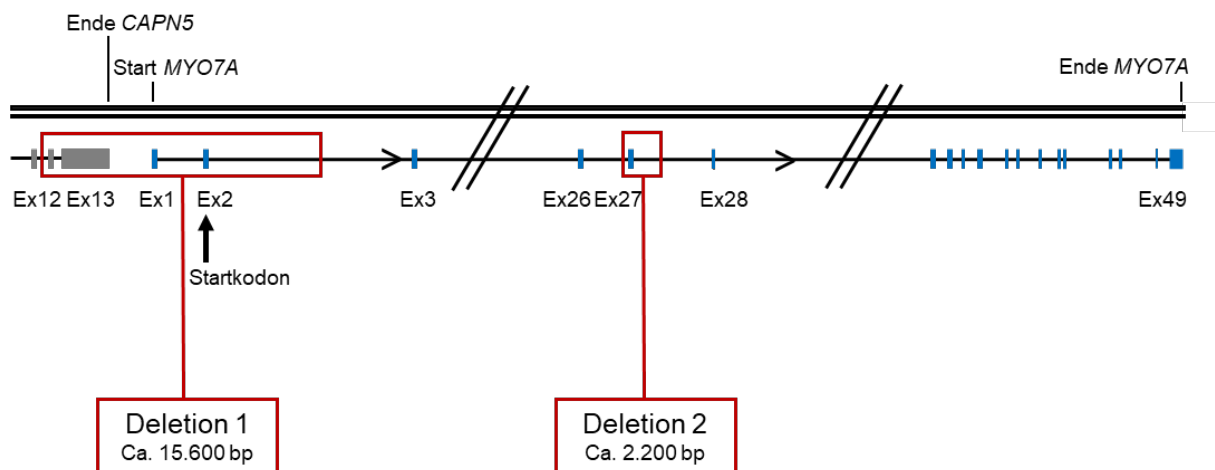


Abbildung 16: Schematische Darstellung des *MYO7A*-Gens mit Strukturvarianten (BG007). Zu sehen ist das Gen *MYO7A* (Ex 1-49, blau) sowie die letzten drei Exons (Ex 11-13, grau) des *CAPN5*-Gens. Das Transkript von *MYO7A* umfasst dabei einen Bereich von 94.977 bp. Die beiden Strukturvarianten sind rot markiert. Die erste Deletion schließt mit einer Länge von ca. 15.600 bp einen Teil von *MYO7A* (Ex 1-2) sowie einen Abschnitt des *CAPN5*-Gens (Ex 12-13) mit ein. Deletion Nummer zwei ist eine ca. 2.200 bp lange Exon-Deletion

(Ex 27) im *MYO7A*-Gen. Die Leserichtung von *MYO7A* ist entlang des Plus-Strangs von links nach rechts. Ex = Exon; bp = Basenpaare

Veränderungen in *MYO7A* sind Ursache der autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung Usher-Syndrom Typ 1B (USH1B, MIM # 276900). Beim Usher-Syndrom leiden Betroffene typischerweise an Retinitis Pigmentosa und Innenohrschwerhörigkeit sowie teilweise auch an einer gestörten Funktion des Gleichgewichtsorgans. Je nach Beginn und Ausprägung der Symptome werden dabei verschiedene Typen unterschieden. Typ 1 der Erkrankung gilt im Allgemeinen als die schwerste Form, dennoch kann auch hier das klinische Erscheinungsbild variieren (Atypisches Usher-Syndrom). So wurde in der Literatur bereits über Patienten berichtet, bei denen die klinische Diagnose Usher-Syndrom Typ 2 war, die genetische Ursache jedoch in einem der Gene für Typ 1, zu denen auch *MYO7A* zählt, detektiert wurde (89). Dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach auch in dieser Familie, bei der initial aufgrund des klinischen Befundes eher vom Typ 2 der Erkrankung ausgegangen wurde, der Fall.

Im *MYO7A*-Gen sind bereits zahlreiche pathogene Varianten bekannt (n = 532; LOVD, Stand 01. Sept. 2022) (70). Als pathogen eingestufte Veränderungen treten dabei über alle 49 Exons des Gens verteilt auf (90). Die im vorliegenden Fall gefundenen Strukturvarianten wurden im Rahmen der Auswertung mittels der ACMG-Kriterien (79) klassifiziert und jeweils als P bewertet (ACMG: PVS1, PP1, PP4). In Anbetracht zweier pathogener Varianten in einem IRD-Gen und adäquater Segregation der Varianten konnte dieser Fall mithilfe der Genomanalyse gelöst werden.

3.3.2 *BBS10* (BG047)

In Familie **BG047** ist der Indexpatient ein 15-jähriger Junge, bei dem die Erkrankung RP mit frühkindlichem Beginn festgestellt wurde. Zusätzlich zu seinen Genomdaten waren auch die der nicht-betroffenen Eltern für die Analyse vorhanden. Bei der jüngeren Schwester des Patienten waren bis zum Untersuchungszeitpunkt keine Anzeichen einer IRD aufgetreten. Eine genetische Untersuchung des Jungen hatte bereits 2017 stattgefunden, dabei konnte durch die Gen-Panel-Analyse keine Ursache für das Auftreten der IRD gefunden werden.

Aus der im Rahmen der *Bavarian Genomes* Studie durchgeführten Untersuchung mittels WGS ergaben sich zwei krankheitsrelevante Veränderungen im *BBS10*-Gen (OMIM * 610148). Beim Indexpatienten wurden dabei eine *missense* Variante sowie eine *frameshift* Variante, beide in heterozygoter Form, gefunden (**Abbildung 17**).

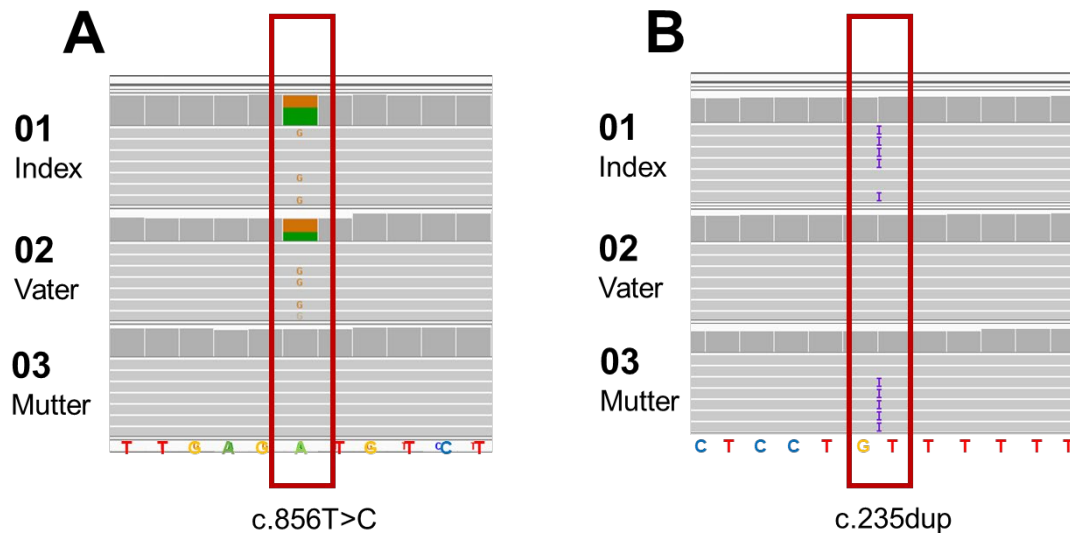


Abbildung 17: Darstellung der Varianten in *BBS10* in IGV (BG047). (A) **Missense Variante (paternal vererbt)**. Gezeigt ist der chromosomale Bereich Chr12:76.740.904-76.740.914 in IGV mit der *missense* Variante c.856T>C (rot umrandet). Diese ist im *BBS10*-Gen, in der Region q21.2 auf Chromosom 12 lokalisiert. Die Variante kommt heterozygot bei Indexperson (01) und Vater (02) vor, die Mutter (03) hingegen ist keine Trägerin der Variante. (B) **Frameshift Variante (maternal vererbt)**. Die Bildschirmaufnahme aus IGV zeigt den chromosomalen Bereich Chr12:76.741.525- 76.741.535 mit der heterozygoten *frameshift* Variante c.235dup (rot umrandet), welche bei Indexpatient (01) und Mutter (03), jedoch nicht beim Vater (02) vorliegt.

Die *missense* Variante c.856T>C / p.(Ser286Pro) kommt beim Indexpatienten und bei dessen Vater vor. Die Variante c.235dup / p.(Thr79fs), bei der die Duplikation einer Base zu einer Verschiebung des Leserasters führt, wurde maternal an den Erkrankten vererbt. Somit liegt beim Indexpatienten eine zusammengesetzte Heterozygotie vor (**Abbildung 18**).

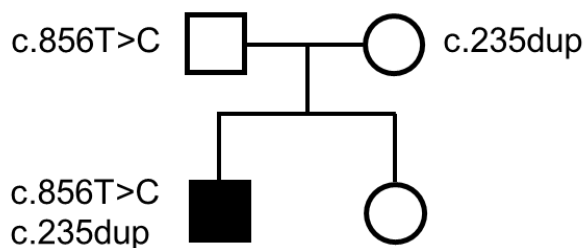


Abbildung 18: Segregation der Varianten in *BBS10* (BG047). Die Variante c.856T>C kommt beim Vater vor, die Variante c.235dup bei der Mutter. Der Indexpatient ist Träger beider Varianten des *BBS10*-Gens, bei ihm besteht somit eine zusammengesetzte Heterozygotie.

Das *BBS10*-Gen befindet sich auf Chromosom 12 in der Region q21.2. Es umfasst nur zwei Exons, wobei beide gefundenen Varianten im zweiten Exon lokalisiert sind (**Abbildung 19**). Aktuell sind bereits zahlreiche pathogene Veränderungen für das Gen beschrieben, wovon Substitutionen (55 %) den größten Anteil ausmachen und Duplikationen (12 %) nach Deletionen (29 %) an dritter Stelle stehen (n = 121; LOVD, Stand 02. Sept. 2022) (70).

BBS10-Gen

NM_024685.4, 3.942 bp

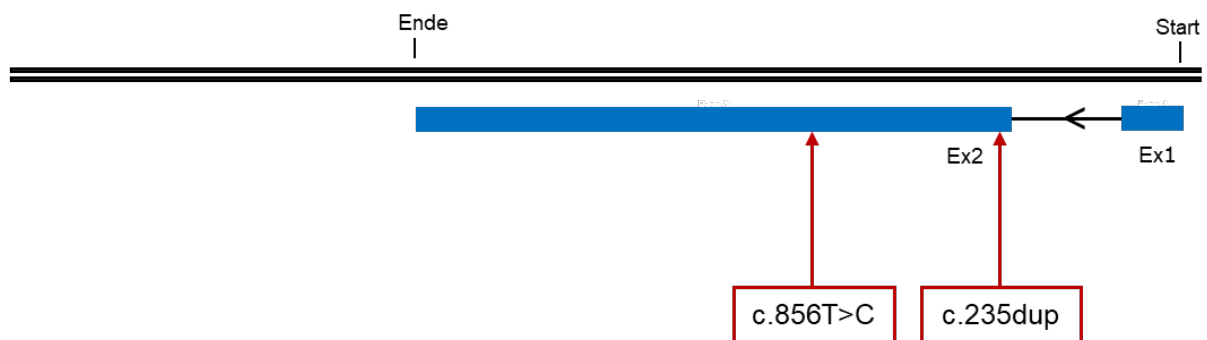


Abbildung 19: Schematische Darstellung des *BBS10*-Gens mit vorliegenden Varianten (BG047). Dargestellt ist das *BBS10*-Gen mit seinen Exons (Ex 1-2, blau) sowie den beiden bei der Indexperson der Familie vorkommenden Varianten (rot). Das Transkript umfasst dabei einen Bereich von 3.942 bp. Es liegt eine heterozygote *frameshift* Variante an Position c.235dup sowie eine heterozygote *missense* Variante an Position c.856T>C beim Indexpatienten vor. Die Leserichtung ist im *BBS10*-Gen entlang des Minus-Strangs von rechts nach links. Ex = Exon; bp = Basenpaare

Pathogene Varianten in *BBS10* sind als Ursache der autosomal-rezessiven Erkrankung Bardet-Biedl-Syndrom 10 (MIM # 615987) bekannt. Die *frameshift* Variante c.235dup war in den Datenbanken ClinVar und LOVD bereits als P hinterlegt und ihr Vorkommen bei Patienten mit Bardet-Biedl-Syndrom 10 wurde zudem in einer Studie durch Esposito et al. (2017) beschrieben (91). Die Variante c.856C>T fand in der Literatur keine Erwähnung, sie kam innerhalb der EVAdb nur in dieser einen Familie vor und gilt im Allgemeinen als sehr selten (keine AF in gnomAD hinterlegt, Stand 02. Sept. 2022) (51). Die Werte von zwei der drei Vorhersageprogrammen überschritten den Grenzwert für einen schädigenden Effekt dieser Variante, zudem zeigte sich, dass die Base an dieser Position hoch konserviert und innerhalb des Promotors lokalisiert ist. Unter Zuhilfenahme der ACMG-Kriterien (79) wurde c.235dup als P (ACMG: PVS1, PS4, PM2, PP5) und c.858C>T als LP (ACMG: PM2, PM3, PP2, PP3) eingestuft.

Das Bardet-Biedl-Syndrom 10 wird durch homozygote oder zusammengesetzt heterozygote Varianten im *BBS10*-Gen hervorgerufen. Neben *BBS10* können Mutationen in weiteren Genen zum Bardet-Biedl-Syndrom führen. Bei Vorliegen dieses seltenen Syndroms kann es zu Erkrankungen unterschiedlicher Organsysteme kommen. Neben einer retinalen Dystrophie (meist in Form einer RP) können z. B. Symptome wie Polydaktylie (das Vorhandensein überzähliger Finger und/oder Zehen), Hypogonadismus, Übergewicht oder geistige Beeinträchtigung auftreten. Besonders häufig liegen auch strukturelle sowie funktionelle

Abnormitäten der Nieren vor, deren Schweregrad von Symptomfreiheit bis zum terminalen Nierenversagen reichen kann. Die phänotypische Variabilität unter Betroffenen ist sehr ausgeprägt, wodurch Patienten häufig nicht alle klinischen Kriterien für die Diagnose erfüllen. Die Daten mehrerer Studien zeigten, dass die Korrelation von Genotyp zu Phänotyp von der Art der Varianten abhängig zu sein scheint. So ist der Phänotyp milder ausgeprägt, wenn eine *frameshift* mit einer zusätzlichen *missense* Variante vorliegt. Die Kombination zweier Funktionsverlustvarianten korreliert hingegen mit einem schwereren Krankheitsbild. Demnach scheinen einige *missense* Varianten in *BBS10* hypomorph zu sein (92). Beim Indexpatienten der Familie **BG047** liegen neben der RP keine weiteren bekannten Erkrankungen vor. Somit ist in diesem Fall von einem isolierten retinalen Phänotyp des Syndroms auszugehen. Die Abklärung einer bisher womöglich unbemerkten Nierenbeteiligung mittels Sonographie sowie einer Kontrolle der Nierenparameter wurde dem Patienten in Folge der molekulargenetischen Diagnose empfohlen.

3.3.3 *ALPK1* (BG057)

In Familie **BG057** wurden die Genomdaten der zwei erkrankten Brüder sowie deren Eltern untersucht. Die Indikation für den Studieneinschluss war das Vorliegen einer Optikusatrophy mit retinaler Beteiligung. Die Mutter ist wie auch ihre beiden Söhne von der Erkrankung betroffen, in der erweiterten Familie sind hingegen keine Fälle retinaler Erkrankung bekannt. Der 30-jährige Indexpatient weist ophthalmologischen Befunden zufolge eine chronische Papillitis sowie ein bilaterales zystoides Makulaödem mit progredientem Visusverlust auf. Ähnliche Befunde wurden auch bei Bruder und Mutter des Patienten erhoben. Bei der Mutter traten die Sehstörungen im Gegensatz zu ihren Söhnen erst im 48. Lebensjahr auf. Auffällig am Phänotyp der drei Betroffenen ist auch, dass sie alle an einer Hypohidrotischen Ektodermalen Hypoplasie (verminderte Schweißbildung und Schmelzdefekt der Zähne) leiden. Eine genetische Untersuchung diesbezüglich hatte in der Vergangenheit zu keinem Ergebnis geführt. Beim Indexpatienten sind zudem wiederkehrende Kopfschmerzepisoden bekannt und eine Untersuchung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) hatte zuvor sowohl bei ihm als auch bei der Mutter einen auffälligen, jedoch aus klinischer Sicht unklaren Befund ergeben. Untersuchungen im Zeitraum 2017-2018 konnten weder das Vorliegen der IRD noch der Ektodermalen Dysplasie genetisch begründen.

Bei der Analyse mittels WGS stellte sich heraus, dass sowohl die Mutter als auch ihre beiden Söhne heterozygot bezüglich einer Variante im *Alpha Kinase 1* Gen (*ALPK1*, OMIM * 607347)

sind (**Abbildung 20A**). Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine *missense* Variante an der Position c.710C>T / p.(Thr237Met), deren Vorliegen bei den drei erkrankten Familienmitgliedern, nicht aber beim Vater gezeigt werden konnte (**Abbildung 20B**).

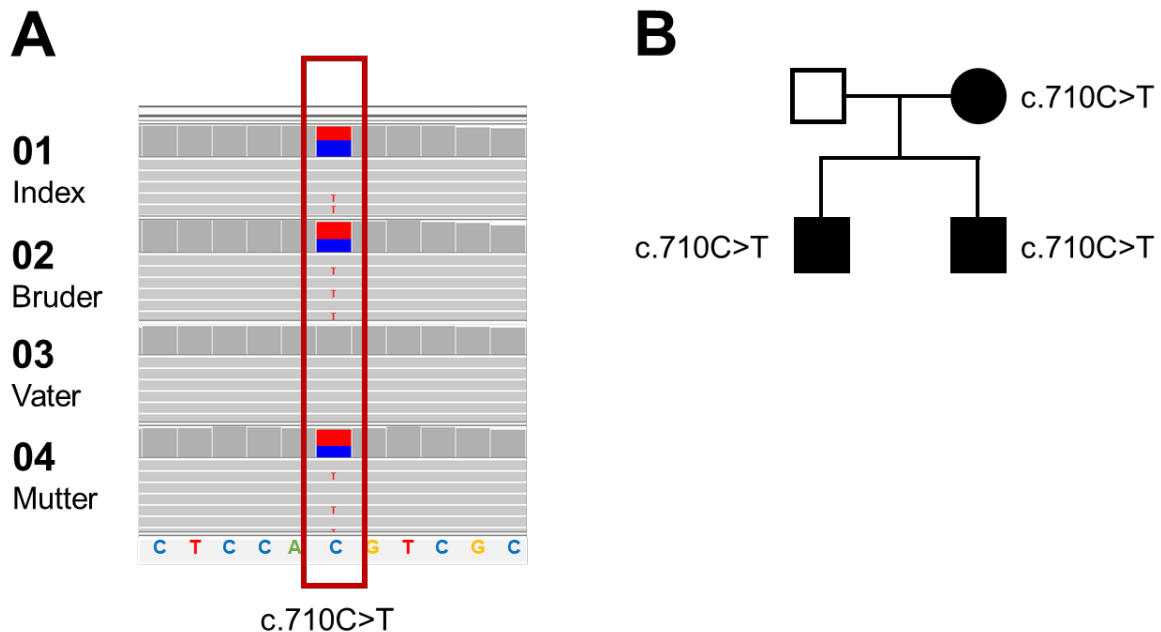


Abbildung 20: Darstellung der *missense* Variante in *ALPK1* in IGV und Segregation (BG057). **(A) Variante in IGV.** Die Bildschirmaufnahme umfasst den chromosomalen Bereich chr4:113.348.731-113.348.741, auf Chromosom 4 in der Region q25, in welcher sich das *ALPK1*-Gen befindet. Gezeigt ist die heterozygote *missense* Variante an Position c.710C>T (rot umrandet). Diese liegt beim Indexpatienten (01), bei dessen Bruder (02) sowie bei der Mutter (04) vor. **(B) Segregation der Variante mit der Erkrankung.** Die Variante c.710C>T wurde von der Mutter an beide Söhne vererbt. Beim Vater liegt sie hingegen nicht vor.

Das *ALPK1*-Gen befindet sich auf Chromosom 4 in der Region q25 und besteht im retinal exprimierten Transkript NM_001102406 aus insgesamt 15 Exons (**Abbildung 21**). Die Variante c.710C>T ist in Exon 8 lokalisiert und hat den Austausch der hoch-konservierten Aminosäure Threonin zu Methionin zur Folge. Alle Vorhersageprogramme wiesen bei dieser Veränderung auf einen schädigenden Effekt hin und auch die vorgenommene ACMG-Klassifikation ließ auf Pathogenität schließen (ACMG: PS1, PS3, PS4) (79).

ALPK1-Gen

NM_001102406.2, 145.253 bp

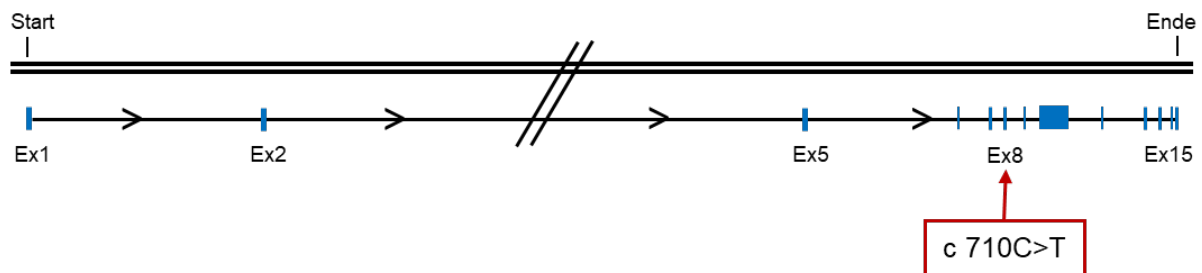


Abbildung 21: Schematische Darstellung des *ALPK1*-Gens mit *missense* Variante (BG057). Dargestellt ist das *ALPK1*-Gen mit seinen Exons (Ex 1-15), das Transkript umfasst hier 145.253 bp. Die in der Familie vorliegende *missense* Variante an Position c.710C>T ist rot gekennzeichnet. Die Leserichtung ist im *ALPK1*-Gen entlang des Plus-Strangs von links nach rechts. Ex = Exon; bp = Basenpaare

Bestimmte Veränderungen im *ALPK1*-Gen sind die Ursache des ROSAH-Syndroms (*Retinal Dystrophy, Optic Nerve Edema, Splenomegaly, Anhidrosis and Migraine Headache Syndrome*, MIM # 614979), einer sehr seltenen Erkrankung, die erstmals im Jahr 2019 in der Literatur beschrieben wurde. Der Name des Syndroms weist auf die dabei vorherrschenden Krankheitsmerkmale hin. Dies sind Retinale Dystrophie, Ödem des Sehnervs, Vergrößerung der Milz sowie Anhidrosis (die Unfähigkeit zur Schweißbildung) und Kopfschmerzen, meist vom Migräne-Typ. Bei der Erstbeschreibung des ROSAH-Syndroms durch Williams et al. (2019) wurde die auch in **BG057** vorliegende Variante c.710C>T bei fünf erkrankten Familien mit autosomal-dominantem Segregationsmuster gefunden. Die Pathogenität der Variante konnte in dieser Studie mithilfe funktioneller Tests belegt werden (93). Nach Bekanntwerden des ROSAH-Syndroms 2019 wurde im Jahr 2022 noch eine zweite pathogene Variante in derselben Domäne von *ALPK1* durch Kozycki et al. (2022) beschrieben. In dieser Veröffentlichung wurde zudem vom Auftreten cerebraler Veränderungen im MRT bei Patienten mit ROSAH-Syndrom berichtet (94) – dazu passende Befunde liegen auch bei Familienmitgliedern von **BG057** vor.

3.3.4 *PMM2* (BG026, BG048)

Die Ergebnisse der Familien **BG026** und **BG048** werden aufgrund der ähnlichen genetischen Befunde gemeinsam besprochen. Im Fall **BG026** nahm eine 48-jährige Patientin mit der Indikation RP als Einzelperson an der Studie teil. Die Eltern sind nicht retinal erkrankt, zudem hat sie keine Geschwister und war zum Zeitpunkt der Studienteilnahme kinderlos. Neben der

IRD-Diagnose liegt bei der Patientin eine geistige Beeinträchtigung unklarer Ätiologie vor. Bei Familie **BG048** wurden die an RP erkrankte Indexpatientin sowie deren Eltern mittels WGS analysiert. Außer der 50-jährigen Indexpatientin liegt bei keinem anderen Familienmitglied eine IRD vor. Die visuellen Probleme hatten bei der Patientin mit vorübergehendem Strabismus in der Kindheit begonnen, dem war ein progressiver Verlust der Sehkraft gefolgt. An relevanten Vorerkrankungen gab die Patientin eine Arthritis sowie einen unerfüllten Kinderwunsch an. Die Indexpersonen beider Familien waren in der Vergangenheit bereits molekulargenetisch untersucht worden, eine Diagnose konnte dabei jedoch nicht gestellt werden. Bei der Auswertung der Genomdaten wurden bei beiden Patientinnen pathogene Veränderungen im *Phosphomannomutase 2* Gen (*PMM2*, OMIM * 601785) festgestellt. Die Überprüfung der Varianten in IGV ergab das Vorliegen von drei verschiedenen *missense* Varianten innerhalb der zwei Familien (**Abbildung 22**). In **BG048** ist die Indexpatientin zusammengesetzt heterozygot mit der maternal vererbten Variante c.53C>G / p.(Thr18Ser) und der vom Vater vererbten Variante c.422G>A / p.(Arg141His) (**Abbildung 23A**). Im Genom der Patientin aus **BG026** trat die *missense* Veränderung c.422G>A ebenso auf, als zweite Variante wurde c.484C>T / p.(Arg162Trp) detektiert (**Abbildung 23B**).

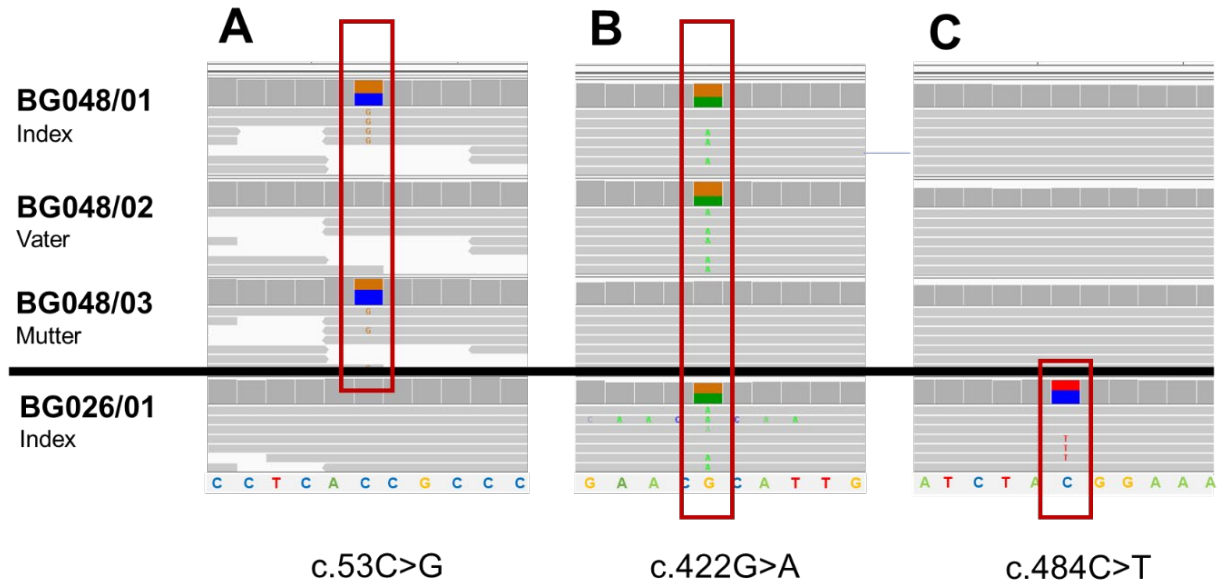


Abbildung 22: Darstellung der Varianten in *PMM2* in IGV (BG026, BG048). Dargestellt sind die Sequenzen der drei Familienmitglieder von BG048 in den oberen drei IGV-Spuren sowie die Sequenz der Einzelperson BG026 in der vierten, unteren Spur. Die schwarze Linie trennt die Familien, die heterozygoten *missense* Varianten sind rot umrandet. **(A) Variante c.53C>G in BG048.** In IGV abgebildet ist der Bereich chr16:8.891.787-8.891.797, in der Region p13.2 von Chromosom 16. Hier liegt in BG048 die Variante c.53C>G bei Indexpatientin (01) und Mutter (03) vor. **(B) Variante c.422G>A in BG048 und BG026.** Im gezeigten Bereich chr16:8.905.005-8.905.015 ist sowohl in BG048 (01/02) als auch in BG026 die Variante c.422G>A vorhanden.

(C) **Variante c.484C>T in BG026.** Im dargestellten Bereich chr16:8.905.526-8.905.536 wurde in BG026 die Variante c.484C>T gefunden. Bei der Indexpatientin aus BG048 liegt an dieser Stelle keine Veränderung der Sequenz vor.

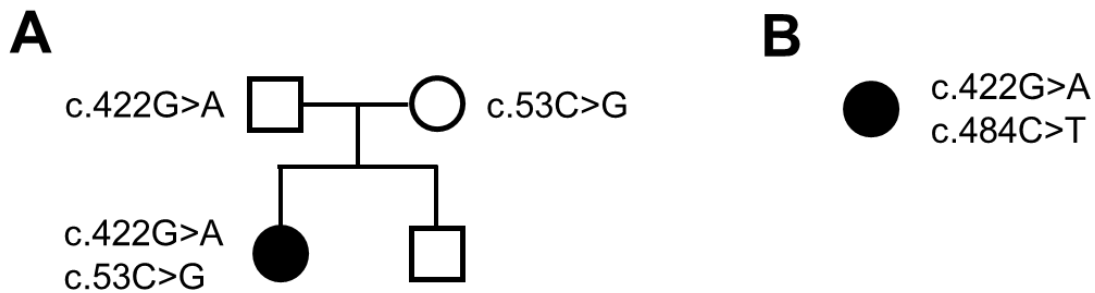


Abbildung 23: Segregation der Varianten in *PMM2* (BG026, BG048). **(A) Stammbaum BG048.** Die Variante c.422G>A kommt beim Vater vor, die Variante c.53C>G bei der Mutter. Die Indexpatientin ist heterozygot für beide Varianten, bei ihr besteht somit eine zusammengesetzte Heterozygotie. **(B) Stammbaum BG026.** Hier wurde nur die Indexpatientin untersucht, die Segregation der vorliegenden Varianten, c.422G>A und c.484C>T, konnte nicht überprüft werden.

Das *PMM2*-Gen ist auf Chromosom 16 in der Region p13.2 lokalisiert und besteht in seiner genomischen Struktur aus insgesamt acht Exons (**Abbildung 24**). Die detektierten Veränderungen sind in den Exons eins (c.53C>G), fünf (c.422G>A) und sechs (c.484C>T) des Gens gelegen.

***PMM2*-Gen**

NM_000303.3, 51.487 bp

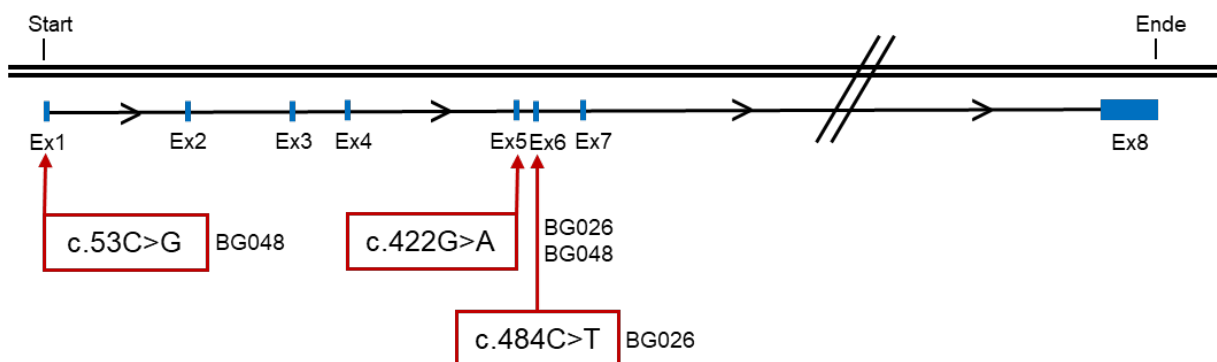


Abbildung 24: Schematische Darstellung des *PMM2*-Gens mit den vorkommenden *missense* Varianten (BG026, BG048). Dargestellt ist das *PMM2*-Gen mit seinen Exons (Ex 1-8, blau) sowie den drei in Familie BG026 und BG048 vorkommenden *missense* Varianten (rot). Die Variante an Position c.422G>A ist dabei in beiden Familien vorhanden. Die Variante c.53C>G kommt nur in BG048 und c.484C>T nur in Familie BG026 vor. Die Leserichtung ist im *PMM2*-Gen entlang des Plus-Strangs von links nach rechts. Ex = Exon; bp = Basenpaare

Zu allen drei Varianten existierten bereits zahlreiche Einträge in ClinVar und LOVD, in denen die Varianten als P eingestuft wurden. Diese Einstufung konnte durch eine Re-Klassifizierung bestätigt werden (ACMG: c.53C>G: PS1, PS3, PS4, PM1, PM2, PM3, PP2, PP3; c.422G>A: PS1, PS3, PM1, PM3, PP2, PP3; c.484C>T: PS1, PS4, PM2, PP2, PP3) (79).

Die mit Veränderungen in *PMM2* assoziierte Erkrankung ist die Kongenitale Glykosylierungsstörung Typ 1A (CDG1A, MIM # 212065). CDG1A basiert auf einer Defizienz des Enzyms Phosphomannomutase 2, für welches das *PMM2*-Gen kodiert (95). Diese Form von Glykosylierungsdefekt tritt bei autosomal-rezessivem Erbgang mit einer geschätzten Prävalenz von 1:20.000 in der Bevölkerung auf. Dabei gilt die Variante c.422G>A als die am häufigsten vorkommende pathogene Variante in *PMM2* (96). CDG1A ist eine Multisystemerkrankung, die nahezu alle Organe betreffen kann. Insbesondere frühkindliche Entwicklungsstörungen, neurologische Symptome mit Kleinhirnbeteiligung sowie das Vorliegen einer geistigen Beeinträchtigung sind dabei klinisch häufig apparent. Eine Augenbeteiligung ist ebenso Merkmal von CDG1A. Oft fällt bereits im Kleinkindalter Strabismus auf, im Verlauf entwickeln viele der Betroffenen eine RP. Endokrine Störungen, vor allem Hypogonadotroper Hypogonadismus in Kombination mit Ovarialinsuffizienz, treten bei Frauen gehäuft auf (97). Neben schwerwiegenden Krankheitsverläufen sind in der Literatur mittlerweile auch Fälle von CDG1A-Patienten mit besonders mildem Phänotyp beschrieben. Klinische Manifestationen und Schwere der Erkrankung sind bei CDG1A-Patienten demnach als variabel zu betrachten (98,99).

3.4 Zusatzbefunde

Bei einigen der untersuchten Personen ergab die Genomanalyse Zusatzbefunde – es wurden pathogene Varianten in Genen außerhalb der Untersuchungsindikation gefunden. In drei der 22 Familien (14 %) lag bei sieben der insgesamt 50 teilnehmenden Personen (14 %) nach Abschluss der Analysen ein solcher Befund vor (**Abbildung 25**).

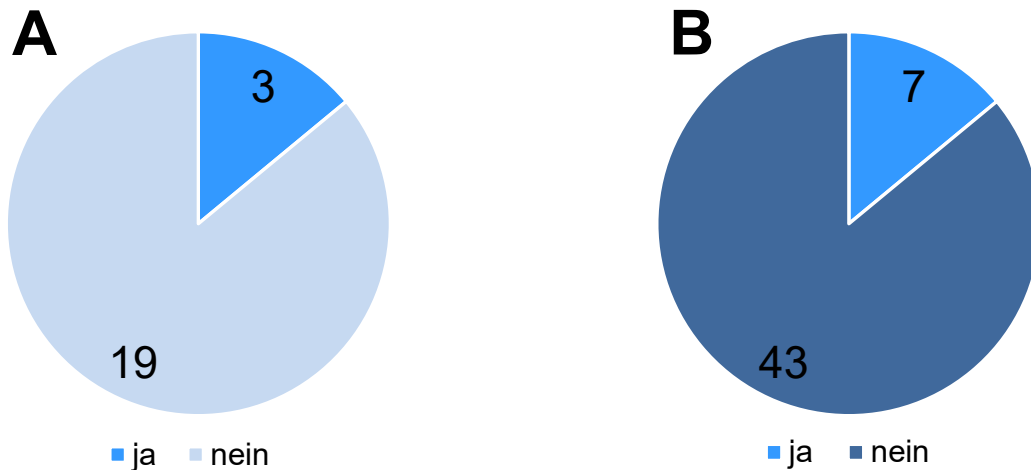


Abbildung 25: Häufigkeit von Zusatzbefunden innerhalb der Studienkohorte. (A) **Anteil der Familien mit Zusatzbefund an allen untersuchten Familien (n = 22)**. Das Kreisdiagramm zeigt den Anteil der Familien, bei denen die Genomanalyse einen Zusatzbefund ergab, an allen untersuchten Familien. (B) **Anteil der Personen mit Zusatzbefund an allen teilnehmenden Personen (n = 50)**. Dargestellt ist der Anteil an Personen mit molekulargenetischem Zusatzbefund bezogen auf die Gesamtzahl der Studienteilnehmer.

Dabei wurden relevante Varianten insbesondere bei der phänotypbasierten Suche in der EVAdb gefunden, da in diesem Filterschritt alle im Genom vorliegenden Varianten, für die bereits ClinVar-Einträge auf Pathogenität hinwiesen, detektiert wurden. Die Möglichkeit der Mitteilung von Zusatzbefunden war im Aufklärungsgespräch zur Studienteilnahme besprochen und die Entscheidung der teilnehmenden Personen, ob diese einen Erhalt solcher Befunde wünschen, in der Einverständniserklärung zur Studie dokumentiert worden (**Anhang 5**).

Die Stammbäume jener drei Familien mit genetischen Zusatzbefunden sind im Folgenden dargestellt (**Abbildung 26**). Insgesamt wurden in drei verschiedenen Genen krankheitsrelevante Veränderungen gefunden. Einen Überblick über die detektierten Zusatzbefunde mit den entsprechenden Varianten bietet **Tabelle 8**.

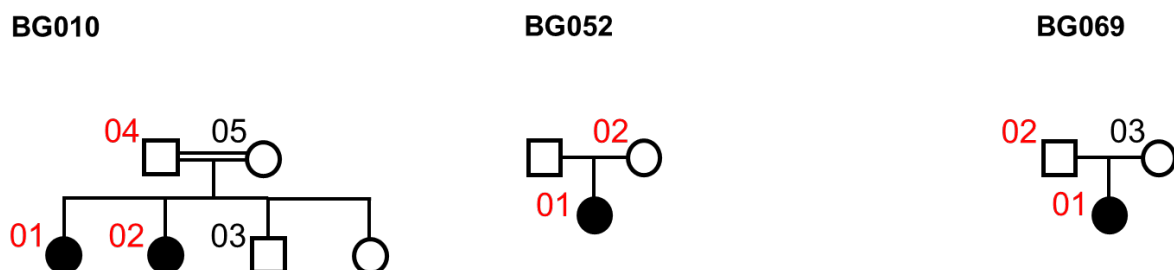


Abbildung 26: Stammbäume der Familien mit Zusatzbefunden. Dargestellt sind die Stammbäume der Familien, in denen genetische Zusatzbefunde auffällig waren. Die Kodierung für erkrankte/nicht-erkrankte Personen bezieht sich an dieser Stelle auf die ursprüngliche Untersuchungsindikation. Mit roter Schrift gekennzeichnet sind jene Personen, bei denen ein Zusatzbefund vorliegt.

Tabelle 8: Zusatzbefunde mit Varianten und deren ACMG-Klassifikation in ClinVar (46).

<i>Familien-ID</i>	<i>Betroffene Personen</i>	<i>Gen</i>	<i>Erkrankung, Erbgang</i>	<i>Variante</i>	<i>ACMG</i>
BG010	01/02/04	<i>HBB</i>	Delta-Beta-Thalassämie, AD	c.92+1G>A p.?	P (23)
BG052	01/02	<i>CHEK2</i>	↑ Risiko für MammaCA, AD, SMu	c.1100del p.(Thr367fs)	P (59)
BG069	01/02	<i>TGM6</i>	Spinocerebelläre Ataxie 35, AD	c.1429_1430ins TCTCT p.(Gly477fs)	P (1) 2019: P
<i>n</i>	3	7			

Alle Erkrankungen und Erbgänge entstammen OMIM. Bei Genen, zu denen in OMIM mehrere Krankheitsassoziationen bestehen, ist nur die in diesem Fall am ehesten relevante Erkrankung angegeben. Sämtliche ACMG-Klassifikationen entstammen ClinVar. In Klammern ist die Häufigkeit angegeben, mit der eine Einstufung dort hinterlegt war (ClinVar, Stand 15. Febr 2023) (46). Bei Variante c.1429_1430insTCTCT lag eine zusätzliche Einstufung aus einer Untersuchung 2019 vor. Alle genannten Varianten liegen heterozygot vor. AD = autosomal-dominant; AR = autosomal-rezessiv; CA = Karzinom; SMu = Somatische Mutation

In Familie **BG010** ist bei beiden Schwestern (01/02) neben der vorliegenden IRD eine klinisch-diagnostisch gesicherte Thalassämie bekannt. Der Krankheitsstatus der restlichen Familienmitglieder bezüglich des Vorliegens dieser Erkrankung war zum Studienzeitpunkt nicht bekannt. Bei der Genomanalyse wurde die heterozygote Variante c.92+1G>A im *Hemoglobin-Beta Locus* Gen (*HBB*, OMIM * 141900) bei den zwei an Thalassämie erkrankten Schwestern sowie bei deren Vater (04) festgestellt. Veränderungen in diesem Gen stehen unter anderem mit autosomal-dominanter Delta-Beta-Thalassämie (MIM # 141749) in Verbindung. Die vorliegende Variante c.92+1G>A wurde in ClinVar als P bewertet und in einer Studie von Ghoti et al. (2017) wurde darüber hinaus über das gehäufte Auftreten dieser Variante bei Patienten mit Beta-Thalassämie berichtet (100).

In Familie **BG052** ergab die Genomuntersuchung der 35-jährigen Indexpatientin (01) und ihrer 61-jährigen Mutter (02) eine heterozygote Variante im *Checkpoint Kinase 2* Gen (*CHEK2*, OMIM * 604373), die bei beiden Frauen vorliegt. Zur gefundenen *frameshift* Variante c.1100del / p.(Thr367fs) existierten bereits zahlreiche Einträge in ClinVar, die auf Pathogenität in Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen hinweisen. Bei heterozygoten Trägern pathogener Veränderungen in *CHEK2* erhöht sich unter anderem das Risiko für eine

Brustkrebserkrankung (MIM # 114480). Diese in etwa zweifache Risikoerhöhung bei Vorliegen von c.1100del wurde zuvor in einer Studie durch Easton (2004) belegt (101).

Im Genom zweier Familienmitglieder von **BG069**, der 19-jährigen Indexpatientin (01) und deren Vater (02), wurde bei der Analyse eine Veränderung im *Transglutaminase 6* Gen (*TGM6*, OMIM * 613900) festgestellt. Hier liegt bei beiden Personen die *frameshift* Variante c.1429_1430insTCTCT / p.(Gly477fs) heterozygot vor. Pathogene Varianten in *TGM6* führen zur autosomal-dominant vererbten Spinocerebellären Ataxie 35 (MIM # 613908), einer Erkrankung mit variablem Manifestationsalter und langsam progressivem Verlauf (102). In ClinVar war die vorliegende Variante als P hinterlegt und ihr Auftreten wurde in einer Studie von Ghorbani et al. (2022) als krankheitskausal bei Patienten mit spinocerebellärer Ataxie beschrieben (103). Die genetische Veränderung wurde in diesem Fall auch in einer vorangegangenen WES-Analyse im Jahr 2020 bereits festgestellt und als pathogen gewertet.

4 Diskussion

Die Einführung von NGS hat in den vergangenen Jahren zu einer rapiden Erweiterung der Möglichkeiten zur Beantwortung molekulargenetischer Fragestellungen geführt. Dabei gewinnt die WGS-Methode, welche auch die nicht-kodierenden Bereiche des Genoms einer Analyse zugänglich macht, zunehmend an Bedeutung. In Anbetracht aktuell laufender Initiativen wie *I + Million Genomes* (37) und dem *Modellvorhaben § 64e SGB V* (40) erscheint die Möglichkeit einer zukünftigen Implementierung von WGS in den Diagnostikprozess genetischer Erkrankungen als wahrscheinlich. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, die Anwendbarkeit der Methode WGS für die molekulargenetische Diagnostik von Erbkrankheiten, insbesondere aus der Gruppe der IRD-Erkrankungen, zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden 22 Familien mit klinisch diagnostizierten IRDs untersucht, die mittels standardmäßiger Routinediagnostik bisher nicht gelöst werden konnten. Durch die Genomuntersuchung gelang in fünf Fällen eine molekulargenetische Diagnosestellung, die Fälle der übrigen 17 Familien konnten durch die Analyse nicht abschließend gelöst werden. Im Verlauf des Projekts wurden sowohl Vorteile als auch Herausforderungen und Limitationen der WGS-Methodik deutlich. Diese Aspekte sollen im Folgenden näher betrachtet werden, damit daraus folgend eine Einschätzung des aktuellen Stellenwerts von WGS in der Routinediagnostik von IRDs getroffen werden kann.

Die Diagnoserate, die in dieser Studie unter Anwendung von WGS erzielt werden konnte, betrug 23 % (5/22 Familien). Hierbei ist zu beachten, dass alle Patienten bereits zuvor molekulargenetisch untersucht worden waren, wobei Zeitpunkt und Umfang der erfolgten Diagnostik unter den Studienteilnehmern variierte. Im *U.K. 100,000 Genomes Project*, einer Studie, die ebenfalls den diagnostischen Mehrwert von WGS an einem breiten Spektrum seltener Erkrankungen untersuchte, ergab sich eine ähnlich hohe Diagnoserate von 25 %. In der Kategorie der ophthalmologischen Erkrankungen lag diese sogar bei etwa 40 % (35). In einer weiteren Studie untersuchten Ellingford et al. (2016) den Nutzen von WGS speziell für die Diagnostik von IRDs. Hierbei konnte – im Vergleich zur Diagnostik mittels Gen-Panel – eine mögliche Verbesserung der Diagnoserate um 29 % durch WGS festgestellt werden (32). Neuere Studien aus dem Jahr 2024 zur Anwendung von WGS bei IRDs ergaben eine Erhöhung der Diagnoserate im Bereich von etwa 13 % bis 46 % (104–107). An diesem Punkt gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass die im Rahmen des vorliegenden Projekts analysierte Studienkohorte mit nur 22 Familien vergleichsweise klein war (2.183 Familien im *U.K. 100,000 Genomes*

Project; 562 Patienten in der Studie von Ellingford et al.) (32,35). Zudem gab es unter den genannten Studien Abweichungen im Ausmaß genetischer Voruntersuchungen vor Durchführung der WGS-Analyse. Ein direkter Vergleich der Zahlenwerte erscheint demnach eher nicht sinnvoll.

Die molekulare Diagnosestellung durch WGS hat bei einem Teil der Patienten sofortige Auswirkungen auf das klinische Vorgehen – beim *U.K. 100,000 Genomes Project* waren es 25 % der Personen, die mittels WGS eine molekulare Diagnose erhielten. Dem gegenüber brachte die Diagnosestellung bei nur 0.2 % der Patienten keinerlei Nutzen (35). Die Vorteile einer genetisch gesicherten Diagnose für das Management der Erkrankung konnte in diesem Projekt am Beispiel des Falls **BG047** gezeigt werden. Der Indexpatient, ein 15-jähriger Junge, wurde hier mithilfe der Genomanalyse mit Bardet-Biedl-Syndrom 10 diagnostiziert. Mit der neu gewonnenen Erkenntnis über die vorliegende Erkrankung konnte ihm präventiv eine nephrologische Untersuchung empfohlen werden. Erkrankungen der Nieren, die zum Teil zunächst unerkannt bleiben, sind häufig Teil des Syndroms. Im schlimmsten Fall kann es bei Patienten mit dieser Erkrankung sogar bis zum Nierenversagen kommen (92).

Bei Betrachtung der fünf Familien mit abschließender molekularer Diagnose fällt auf, dass die hier kausalen Varianten allesamt in proteinkodierenden Bereichen gelegen sind. Aus technischer Sicht hätten die fünf detektierten *missense* Veränderungen sowie die *frameshift* Variante auch mit anderen Untersuchungsansätzen (z. B. Gen-Panel oder Exomanalysen) festgestellt werden können. Die beiden Strukturvarianten in *MYO7A*, im Fall der Familie **BG007**, konnten in der vorangegangenen Analyse 2016 trotz passender klinischer Diagnosestellung nicht gefunden werden. Das ist damit zu erklären, dass zu diesem Zeitpunkt die Suche nach Strukturvarianten innerhalb proteinkodierender Bereiche nicht im Leistungsspektrum des Instituts, an welchem die genetische Untersuchung durchgeführt wurde, angeboten wurde. Nach aktueller Vorgehensweise wären diese strukturellen Veränderungen jedoch mittels Gen-Panel inklusive Strukturvariantenanalyse der enthaltenen Gene ausfindig gemacht worden. In den weiteren vier gelösten Familienfällen (**BG026**, **BG047**, **BG048**, **BG057**) stimmte die klinische Diagnose – und damit die Indikation zur genetischen Untersuchung – nicht mit der tatsächlich vorliegenden Erkrankung überein. Die Gene *ALPK1* und *PMM2* waren aus diesem Grund nicht in den angewandten Gen-Panels enthalten, das *BBS10*-Gen wurde bei RP als alleinige Analyseindikation ebenfalls nicht untersucht. Diese aus der Genomanalyse gewonnenen Erkenntnisse weisen darauf hin, dass den hier kausalen Genen in der Diagnostik von IRDs mehr Beachtung geschenkt werden sollte. Auch unter dem

bekannten Aspekt eines möglichen Auftretens milder oder gar isoliert-retinaler Phänotypen bei syndromalen IRDs (2) erscheint es sinnvoll, diese Gene in Zukunft in die IRD-Panels aufzunehmen. Ebenso wäre WES ein geeigneter Ansatz, um auch pathogene Veränderungen in Genen wie *ALPK1*, *PMM2* oder *BBS10* bei der genetischen Untersuchung nicht-indikationsbezogen erfassen zu können. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Maggi et al. (2024) in ihrer Studie zur Anwendung von WGS an IRD-Patienten. Auch hier war der überwiegende Teil (66 %) der durch WGS zusätzlich gelösten Fälle auf Varianten zurückzuführen, die aus technischer Sicht grundsätzlich auch durch Routinediagnostikverfahren hätten erfasst werden können (107).

Die in den eben genannten Fällen gezeigte Diskrepanz zwischen klinischer Diagnose und molekulargenetischem Befund unterstreicht die Relevanz klinischer Informationen für den Erfolg bei der Durchführung genetischer Untersuchungen. Durch eine ausführliche klinische Untersuchung ergänzt um eine detaillierte Anamneseerhebung können wertvolle Hinweise auf das Vorliegen einer syndromalen Erkrankung gewonnen werden. Die zuvor genannten Gene stehen allesamt mit einer solchen Erkrankung, die neben der Retina üblicherweise weitere extraokuläre Manifestationen zeigt, in Verbindung (92,93,99). Eine präzise formulierte klinische Indikation ermöglicht die gezielte Auswahl einer zur genetischen Testung geeigneten Analysemethode. Im Prozess der Genomauswertung demonstrierte die Integration molekularer Diagnostikboards in das Analyseschema ebenso den Nutzen klinischer Informationen. Die enge Zusammenarbeit mit den klinischen Überweisenden ermöglichte es, genetische Verdachtsdiagnosen durch zusätzliche Informationen zu stützen oder in ihrer Priorität herabzusetzen. Auch Stephenson et al. (2022) konnten in ihrer Studie an IRD-Patienten den hohen Stellenwert detaillierter klinischer Informationen für eine adäquate Diagnosestellung zur Geltung bringen. Nach initial negativer Panel-basierter Diagnostik wurde dabei ein Stufenschema aus verschiedenen diagnostischen Schritten angewandt. Durch die frühzeitige Reevaluation klinischer Informationen mit erneuter klinischer Untersuchung der Patienten sowie durch Anwendung additiver Methoden wie WES und WGS konnten 56 % der zuvor ungelösten IRD-Fälle bei Stephenson et al. (2022) geklärt werden. Dadurch wurde in dieser Studie eine Diagnoserate von insgesamt 92 % erreicht (108). Diese Ergebnisse unterstreichen ausdrücklich den Stellenwert ausführlicher klinischer Informationen als Grundlage für eine erfolgreiche molekulargenetische Diagnostik.

Abgesehen von den klinischen Informationen erwies sich auch die Art der vorliegenden Familienkonstellation als überaus bedeutungsvoll für den Analyseerfolg. In der Kategorie

„gelöste Fälle“ überwog der Anteil an Trios (80 %) gegenüber den Einzelpersonen (20 %) – bei den Fällen, die als „ungelöst“ klassifiziert wurden, verhielt es sich hingegen umgekehrt (20 % Trios, 50 % Einzelpersonen, 30 % andere Konstellation). Bei den „wahrscheinlich gelösten“ Fällen war das Verhältnis von Trios zu Einzelpersonen mit jeweils 43 % ausgeglichen. Aus diesen Zahlen ergibt sich die Annahme, dass Fälle, in denen größere Familienstrukturen zur Analyse vorliegen, eher gelöst werden können als die von Einzelpersonen. Dies könnte darauf beruhen, dass bei Trio-Konstellationen die Möglichkeit einer detaillierten Segregationsanalyse besteht, was bei der Untersuchung von Einzelpersonen wiederum nicht möglich ist. Segregationsanalysen erleichtern zum einen die Priorisierung von Varianten, zum anderen kann bei Vorliegen eines Trios die Krankheitsrelevanz von Varianten anhand ihrer Lageverhältnisse in *cis* oder *trans* beurteilt werden. Bei Einzelpersonen, wie beispielsweise im Fall von **BG012**, einem 82-jährigen Patienten mit RP, war diese Möglichkeit bei Durchführung der WGS-Analyse nicht gegeben. Bei ihm wurden im *ABCA4*-Gen zwei *missense* Varianten und eine tief-intronische Variante detektiert, wobei zwei dieser Veränderungen – bei Lage in *cis* – als komplexes Allel bereits in einer Studie von Sangermano et al. (2019) an Betroffenen mit Morbus Stargardt beschrieben wurden (25). Trotz vorhandener Evidenzlage konnte dem Patienten keine sichere Diagnose gestellt werden. Grund dafür war neben dem Vorliegen phänotypischer Unstimmigkeiten sowie dem gleichzeitigen Vorhandensein möglicher kausaler Veränderungen in einem weiteren Gen, dass keine Möglichkeit zur Segregationsanalyse bestand, wodurch die Lageverhältnisse der Varianten ungewiss verblieben. Das Bestehen einer positiven Korrelation von Trio-Analysen mit der Diagnoserate zeigte auch das *U.K. 100,000 Genomes Project*. Hier war die Diagnoserate in der Kategorie „Trio“ im Vergleich zu anderen untersuchten Familienstrukturen am höchsten (ca. 31 %), während sich bei Einzelpersonen der geringste diagnostische Erfolg zeigte (ca. 16 %) (35). Auch eine aktuelle prospektive Studie von Kashta et al. (2025), in der Patienten aus dem gesamten Spektrum seltener Erkrankungen mittels Routinediagnostikverfahren sowie mittels WGS untersucht wurden, konnte bei WGS eine Überlegenheit von Trio-Analysen gegenüber der Untersuchung von Einzelpersonen hinsichtlich der Diagnoserate und der Interpretierbarkeit von Varianten zeigen (109).

Erst wenn die grundlegenden Voraussetzungen für eine erfolgreiche genetische Untersuchung, nämlich ausreichend klinische Informationen sowie die Rekrutierung weiterer Familienmitglieder, erfüllt sind, kann das volle Potenzial der Genomanalyse ausgeschöpft werden. So erlaubt WGS z. B. die Detektion von krankheitsverursachenden Strukturvarianten in nicht-kodierenden Bereichen. Dies zeigte auch der Fall von **BG051**, einer Familie über drei

Generationen, in der eine ca. 3.000 bp lange Deletion im *RPGR*-Gen gefunden wurde. Diese schließt Teile der 3' UTR ein und segregiert innerhalb der Familie mit der Erkrankung. Den klinischen Informationen zufolge zeigt die Indexpatientin zudem für eine *RPGR*-assoziierte Erkrankung charakteristische Merkmale. Die 3' UTR ist als Randbereich der mRNA, wie in einem Review von Mazumder et al. (2003) beschrieben, im Allgemeinen von regulatorischer Bedeutung und kann sowohl über Proteininteraktionen auf Stabilität und Lokalisation der mRNA einwirken als auch den Translationsprozess beeinflussen (110). Bisweilen stehen Veränderungen dieser nicht-translatierten Region mit dem Auftreten einiger weniger Erkrankungen, darunter z. B. das Tourette-Syndrom und die Phosphoglycerat-Kinase-1-Defizienz, in Verbindung (111,112). Die Relevanz der Erfassung der 3' UTR als nicht-kodierende Region im Zuge molekulargenetischer Diagnostik betonten auch bereits Behlmann et al. (2019) (112). Über die genauen Auswirkungen der in diesem Fall vorliegenden Deletion am *RPGR*-Genort könnten schlussendlich nur funktionelle Untersuchungen Gewissheit bringen, weshalb der Fall der Kategorie „wahrscheinlich gelöst“ zugeordnet wurde. Der methodische Vorteil von WGS gegenüber anderen genetischen Untersuchungsmethoden, Strukturvarianten auch in nicht-kodierenden Bereichen zu detektieren, konnte am Beispiel dieser Familie jedoch klar gezeigt werden.

Auch strukturelle Veränderungen in topologisch assoziierenden Domänen (*Topologically Associated Domains*, TADs), welche mit einer veränderten 3D-Chromatinstruktur einhergehen (113), konnten in der Vergangenheit mittels WGS detektiert werden (114,115). TADs sind genomische Chromatin-Domänen, die innerhalb der nuklearen Struktur Kontakte zwischen den regulatorischen Elementen von Genen, insbesondere Enhancern und Promotoren, herstellen (116,117). Unterbrechungen innerhalb dieser Regionen, wie im Fall von Strukturvarianten, können zum Kontaktverlust oder zur Bildung neuer aktiver Domänen führen und dadurch die Genexpression auf pathologische Weise beeinflussen (118). So wurde in einer Studie von de Bruijn et al. (2020) ein Genlokus auf Chromosom 17 entdeckt, der mit Fällen von autosomal-dominanter RP in Verbindung steht. Strukturvarianten innerhalb dieser genomischen Region führen hier, wie funktionelle Untersuchungen zeigten, zur Entstehung von Neo-TADs, die wiederum in den untersuchten Familien krankheitsverursachend für die RP waren (114). Neben dieser Entdeckung ist mittlerweile auch ein Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen in TAD-Regionen auf den Chromosomen fünf und sechs und der Erkrankung North-Carolina-Makuladystrophie (MIM # 136550) bekannt (115,119). Demnach könnten

einer Anzahl ungelöster IRD-Fälle durchaus Veränderungen derartiger Natur zugrunde liegen, welche durch Applikation von WGS feststellbar wären.

Das stetige Wachstum der Anzahl bekannter IRD-Gene in den vergangenen Jahren (6) sowie die Tatsache, dass nach wie vor mindestens 30 % der Fälle durch die molekulargenetische Diagnostik nicht geklärt werden können (4,28), lässt darauf schließen, dass aktuell noch nicht alle krankheitskausalen Gene für IRDs bekannt sind. Die Genomuntersuchung birgt das Potenzial, neue krankheitskausale Gene zu entdecken und Genotyp-Phänotyp-Assoziationen herzustellen. Dieser methodische Vorteil konnte auch im *U.K. 100,000 Genomes Project* gezeigt werden, in dem es Smedley et al. (2021) gelang, drei neue Krankheitsgene ausfindig zu machen und bei 19 weiteren Genen zumindest eine Assoziation zu gewissen Erkrankungen herzustellen. Dieser Befund resultierte aus der WGS-Untersuchung von insgesamt 2.183 Familien und bezog sich auf das gesamte Spektrum seltener Erkrankungen (35). Eine neuere Arbeit mit deutlich größeren Datensätzen konnte dieses Potenzial weiter verdeutlichen: Cipriani et al. (2025) berichteten auf Basis der Analyse von über 30.000 WGS-Datensätzen über 141 neue Genotyp-Phänotyp-Assoziationen bei seltenen Erkrankungen (120). Auf <https://retigene.erc.info> findet sich eine Datenbank, die die bislang mit IRDs assoziierten Gene zusammenfasst. Dieser Datenbank ist zu entnehmen, dass allein im Jahr 2025 zehn neue Gen-Assoziationen hinzugekommen sind, was die Annahme stützt, dass die genetischen Ursachen dieser Erkrankungsgruppe weiterhin nicht vollständig geklärt sind (121,122).

Auch im vorliegenden Projekt fiel im Fall von **BG034** ein bisher nicht für IRD bekanntes Gen aufgrund einer großen strukturellen Veränderung auf. Es handelt sich hierbei um eine ca. 13.600 bp große, heterozygote Multiexon-Deletion im *EHBPI*-Gen. Veränderungen in diesem Gen wurden in der Literatur bislang nicht mit dem Auftreten von IRDs in Verbindung gebracht. In einer Veröffentlichung von Nakamura et al. (2020) wurde jedoch ein regulatorischer Zusammenhang von *EHBPI* mit dem Transport der Na⁺/K⁺-ATPase in die basolaterale Membran von *Drosophila*-Photorezeptoren beschrieben (123). Die Na⁺/K⁺-ATPase ist essenziell für die Aufrechterhaltung zellulärer Ionengradienten und in weiterer Folge für die Funktionalität von Zellen (124). Ihr Funktionsverlust in Photorezeptoren kann, wie in einer Studie von Luan et al. (2014) beschrieben, zu einem Ausfall der visuellen Funktionen sowie auch zur altersabhängigen Degeneration der Sinneszellen führen (125). Die Ergebnisse aus dem *U.K. 100,000 Genomes Project* und der Familie **BG034** deuten also darauf hin, dass die Anwendung der WGS-Methode in Verbindung mit funktionellen Analysen die Entdeckung neuer Gene im Feld der seltenen Erkrankungen vorantreiben könnte. Bei Integration von neuen

krankheitskausalen Genen in die Gen-Panels der Diagnostik wäre wiederum auch ein Anstieg der Diagnoseraten zu erwarten.

Trotz der eben genannten Vorteile, die sich bei WGS aufgrund der Möglichkeit zur Untersuchung nicht-kodierender Bereiche ergeben, führt ebendiese Besonderheit mitunter zu erheblichen Herausforderungen bei der Anwendung der Methode. In Anbetracht der Tatsache, dass in jedem sequenzierten Genom ca. drei bis vier Millionen Veränderungen regulär auftreten (34), ist die mangelnde Interpretierbarkeit vieler dieser Varianten gut nachvollziehbar. Die eingeschränkte Bewertbarkeit spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Studie wider: Nahezu alle Fälle, bei denen eine oder mehrere der priorisierten Varianten tief-intronisch gelegen sind, wurden schlussendlich aufgrund mangelnder Evidenzen den Kategorien „ungelöst“ bzw. „wahrscheinlich gelöst“ zugeordnet.

Entgegen der in der Vergangenheit weit verbreiteten Annahme, Introns seien für die Genfunktion unbedeutend, ist die Relevanz intronischer Veränderungen in Bezug auf die Entstehung erblich bedingter Erkrankungen heute wohl bekannt. Als „tief-intronisch“ werden dabei im Allgemeinen jene Varianten definiert, die über 100 bp von einer Exon-Grenze entfernt in einem Intron lokalisiert liegen. Nach aktuellem Forschungsstand stehen tief-intronische Veränderungen bereits mit multiplen Erkrankungen in kausalem Zusammenhang. Dabei sind einige der erforschten Gene auch der Gruppe der IRDs zuzuordnen (126). Stellvertretend ist das *ABCA4*-Gen zu nennen, das unter anderem die Erkrankung Morbus Stargardt hervorrufen kann. Die funktionelle Bedeutung tief-intronischer Varianten für die Krankheitsentstehung konnte für dieses Gen bereits in mehreren Studien gezeigt werden (25,85). Ein weiteres Gen, das den Stellenwert tief-intronischer Veränderungen im Kontext mit IRDs aufzeigt, ist das *CEP290*-Gen. Bei 21 % aller in einer Studie untersuchten Patienten mit LCA war die Erkrankung den Hollander et al. (2006) zufolge auf eine bestimmte Veränderung in *CEP290* zurückzuführen (127). Dabei handelt es sich um die tief-intronische Variante c.2991+1655A-G, die im Allgemeinen häufigste LCA-assoziierte Variante in *CEP290*, deren Pathogenität durch die Inklusion eines Pseudo-Exons in die mRNA begründet ist (128).

Die molekularen Konsequenzen tief-intronischer Varianten, die Pathogenität für Gen- und Proteinfunktion zur Folge haben können, sind vielseitig. Vor allem die Beeinflussung des Spleiß-Prozesses der RNA spielt eine große Rolle und wird zunehmend mit der Entstehung diverser monogenetischer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Infolge genetischer Varianten kann es dabei z. B. zur Entstehung neuer Spleiß-Stellen und einer folglich abnormen Proteinstruktur kommen. Andererseits können sich auch genetische Veränderungen im Bereich

von Proteinbindestellen, die der Modulation des Spleiß-Vorgangs dienen, schädlich auswirken. Ein weiterer Krankheitsmechanismus liegt in der Inaktivierung intronisch gelegener RNA-Gene, denen regulatorische Funktionen zugeschrieben werden (126). Eine Veränderung des Spleiß-Prozesses der prä-mRNA liegt für monogenetische Erkrankungen Schätzungen zufolge bei 15-60 % aller krankheitskausalen Varianten vor. Die große Spannweite dieser Werte reflektiert, wie auch bereits von Wang et al. (2007) angemerkt, unsere bislang unvollständige Kenntnis des Spleiß-Codes sowie die Tatsache, dass nur ein geringer Anteil aller detektierten Varianten auf Spleiß-Effekte überprüft wird (129).

In Anbetracht des Kenntnisstands zur Bedeutung intronischer Veränderungen mag die Detektion dieser durch WGS als durchaus sinnvoll erscheinen. Im Zuge der Auswertung dieses Projekts zeigte sich jedoch, dass tief-intronische Varianten mit ausreichend guter Evidenzlage nur einen Bruchteil aller detektierten Varianten ausmachten. Zur Bedeutung der allermeisten detektierten tief-intronischen Varianten konnten der Literatur und den Datenbanken zum Analysezeitpunkt keine Informationen entnommen werden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, den nicht-kodierenden Bereichen in der genetischen Forschung und folglich auch in der Diagnostik mehr Beachtung zu schenken. Durch Anwendung von WGS ist ein erster Schritt, nämlich die Detektion und Katalogisierung entsprechender Varianten, getan. Deren ausreichende Interpretierbarkeit ist aber, wie auch Qian et al. (2021) feststellten, aktuell noch nicht gegeben. Einigen der verbreiteten *in silico* Vorhersageprogrammen, wie z. B. SpliceAI, ist es zwar möglich, auf das Vorhandensein etwaiger funktioneller Effekte hinzuweisen, deren Vorhersagekraft ist jedoch nicht ausreichend, um eine gesicherte Aussage treffen zu können (130). So liegt in SpliceAI bei einem festgelegten Grenzwert von ≥ 0.5 die Sensitivität für Varianten in Exon-Nähe bei 71 %, in tief-intronischen Bereichen sinkt sie auf 41 % (73). Dazu kommt, dass verschiedene Programme auch unterschiedliche Algorithmen nutzen und deshalb, wie sich auch in einer Studie von Wang et al. (2021) zeigte, mitunter widersprüchliche Vorhersagen zur Folge haben (131). Bei Anwendung von nur einem Programm können im Umkehrschluss auch vorhandene Spleiß-Effekte übersehen werden. Daraus folgt, dass neben einer Genomanalyse unter Zuhilfenahme von *in silico* Vorhersageprogrammen die zusätzliche Durchführung funktioneller Analysen essenziell ist. Denkbare Ansätze zur Überprüfung von Varianten stellen RNA-Analysen oder *in vitro* Spleiß-Tests dar. Die Kombination von WGS mit *in silico* Programmen und *in vitro* Spleiß-Tests als Strategie zur Untersuchung tief-intronischer Varianten hat sich auch in der Studie von Qian et al. (2021) bewährt. In einer Kohorte aus 571 IRD-Patienten gelang es, insgesamt fünf zuvor unbekannte tief-intronische

Varianten als krankheitskausal zu erkennen (130). Auch in aktuellen Studien zur Genomanalyse bei IRD-Patienten von Zeuli et al. (2024) und Weisschuh et al. (2024) wurden im Anschluss an die WGS-Analyse funktionelle RNA-Untersuchungen zur Klärung möglicher Auswirkungen priorisierter Varianten eingesetzt (105,106).

Neben der methodischen Limitation aufgrund der eingeschränkten Bewertbarkeit von Varianten stellen mögliche genetische Zusatzbefunde im Rahmen von Genomanalysen eine weitere Herausforderung dar. Im Gegensatz zur Gen-Panel-Untersuchung, bei der sich die Analyse auf ausgewählte Gene im Zusammenhang mit dem vorliegenden Phänotyp beschränkt, ist bei WGS die Möglichkeit von Zusatzbefunden immer gegeben. So haben auch die Untersuchungen im Zuge dieses Projekts bei sieben der insgesamt 50 sequenzierten Studienteilnehmer (14 %) relevante Nebenergebnisse offenbart. Für zwei weibliche Personen der Familie **BG052** ergab die WGS-Analyse eine pathogene Variante im *CHEK2*-Gen. Aufgrund der für diese Veränderung bekannten klinisch relevanten Erhöhung des Brustkrebsrisikos (101) kann in diesem Fall das gewonnene Wissen zur Sekundärprävention durch Maßnahmen der intensivierten Früherkennung beitragen. Durch Kenntnis dieses Zusatzbefundes ergibt sich für die Patientinnen daher ein möglicher Vorteil. Weniger eindeutig war die Bedeutung eines in **BG069** erhobenen Nebenergebnisses. Hier wurde bei einer 19-jährigen Patientin und bei deren Vater eine pathogene Variante im *TGM6*-Gen gefunden, welches eine Form der autosomal-dominanten spinocerebellären Ataxie verursacht. Der Manifestationszeitpunkt dieser Erkrankung kann Untersuchungen von Guo et al. (2014) zufolge sowohl in der Adoleszenz als auch im höheren Erwachsenenalter liegen (102). In diesem Fall sind durch Mitteilung des Befundes, insbesondere aufgrund des schwer vorhersehbaren zeitlichen Aspekts, erhebliche psychische Belastungen bei den Betroffenen zu erwarten. Erschwerend kommt hinzu, dass für Erkrankungen aus der Gruppe der spinocerebellären Ataxien zum aktuellen Zeitpunkt weder präventive Ansätze noch etablierte krankheitsmodifizierende Therapiemöglichkeiten bestehen (132). Dennoch gilt es zu beachten, dass das Wissen um die Trägerschaft solcher pathogenen Varianten womöglich Einfluss auf Zukunfts- und Familienplanung der betroffenen Personen hat und eine Mitteilung des erhobenen Zusatzbefundes insofern einen Vorteil bringen kann.

Die Bewertung genetischer Veränderungen bezüglich ihrer Mitteilungsrelevanz als Zusatzbefund ist, wie am Beispiel von **BG069** gezeigt, oft schwierig und bedarf einer Abwägung verschiedener Variablen. Als Entscheidungshilfe können hierzu die ACMG-Empfehlungen zu Sekundärbefunden in der jeweils aktuellen Version herangezogen werden, welche den Umgang mit Zusatzbefunden im Rahmen von WES oder WGS aufgreifen. Anhand

von Kriterien wie z. B. Penetranz und Schweregrad der jeweiligen Erkrankung, Präventions- und Therapiemöglichkeiten sowie Auswirkungen des Befundes auf das klinische Vorgehen wurde hier eine Liste von Genen selektiert, in denen pathogene Varianten auf jeden Fall als Zusatzbefund mitzuteilen sind. Dabei wird jedoch ausdrücklich betont, dass diese Liste nur als Orientierungshilfe bei der Bewertung von genetischen Befunden dienen soll und die klinischen Merkmale Betroffener dabei ebenso einer gewissen Beachtung bedürfen (133). Das weitere Vorgehen beim Auftreten von Nebenfunden verbleibt schlussendlich also eine Einzelfallentscheidung. Diese Entscheidung erfordert primär die Berücksichtigung des Patientenwillens und zudem eine gewissenhafte Überprüfung von Nutzen und Risiken des genetischen Befundes für die jeweilige Person.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Methode der Ganzgenomuntersuchung in den vergangenen Jahren großes Potenzial für die Erzielung von Fortschritten im Bereich der Genetik gezeigt hat. Die Entdeckung neuer krankheitsverursachender Gene im Feld der IRDs, aber auch im gesamten Spektrum seltener Erkrankungen, ist nur eine von vielen Möglichkeiten, die WGS bietet. Ebenso sind die Vorteile, die Patienten aus dem Erhalt einer molekularen Diagnose ziehen können, weitreichend und unumstritten. Dennoch wurde in diesem Projekt eine Limitation der Genomanalyse, nämlich die derzeit noch mangelhafte Evidenzlage zu Varianten nicht-kodierender Bereiche, sehr deutlich. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache sowie in Anbetracht eines bioinformatischen und zeitlichen Mehraufwands erscheint der Einsatz von WGS in der molekulargenetischen Routinediagnostik von IRDs – zum aktuellen Zeitpunkt – als verfrüht. Neben Gen-Panels stellt in ausgewählten Fällen WES eine sinnvolle Vorgehensweise dar, bei negativem genetischem Befund ist zudem eine klinische Reevaluation vor Durchführung erweiterter genetischer Diagnostik anzudenken. Allem voran ist eine ausführliche klinisch-diagnostische Untersuchung mit korrekter Indikationsstellung für den Erfolg der genetischen Diagnostik essenziell. Es besteht Hoffnung, dass durch die weitere Anwendung von WGS in der Forschung, ergänzt durch funktionelle Analysen, die Methode zukünftig auch in den Diagnostikbereich von IRDs Einzug findet.

5 Zusammenfassung

Erbliche Netzhautdystrophien (IRDs) umfassen ein Spektrum klinisch und genetisch heterogener seltener Erkrankungen, weshalb sich die korrekte molekulargenetische Diagnosestellung in vielen Fällen schwierig gestaltet. Für Betroffene zieht das oftmals jahrelange „diagnostische Odysseen“ nach sich und erschwert zudem den Zugang zu bestehenden Therapien oder klinischen Studien. Einen potenziellen Lösungsansatz für diese Problematik bietet die Genomsequenzierung (WGS). WGS ermöglicht eine Untersuchung des Erbguts, die über die kodierenden Bereiche hinausreicht und dadurch sämtliche genetische Veränderungen erfasst. Im Bereich der Forschung hat sich WGS bereits als für die Genommedizin vielversprechend bewiesen – in der molekulargenetischen Diagnostik ist die Methode bis dato dennoch nicht als Standarduntersuchung etabliert.

Im Fokus dieser Arbeit steht die Evaluierung von WGS speziell für eine Nutzung in der molekulargenetischen Diagnostik von IRDs. Hierfür wurden im Rahmen der *Bavarian Genomes* Studie 22 Familien mit klinisch festgestellten IRDs einbezogen, deren genetische Ursache durch eine vorangegangene diagnostische Analyse nicht geklärt werden konnte.

Die Genomdaten der Patienten sowie auch nicht-betroffener Familienmitglieder wurden anhand eines strukturierten Analyseschemas ausgewertet und interpretiert. Auf diese Weise konnte in fünf der 22 Familien der Studienkohorte (23 %) eine molekulare Diagnosestellung erzielt werden – die übrigen 17 Fälle verblieben als „wahrscheinlich gelöst“ (32 %) oder „ungelöst“ (45 %). Darüber hinaus wurden im Rahmen der Genomuntersuchung in drei Familien (14 %) bei sieben von 50 untersuchten Personen (14 %) relevante Zusatzbefunde detektiert.

Die Ergebnisse dieses Projekts zeigen, dass die Anwendung von WGS in der Diagnostik von IRDs in einigen Fällen zur Diagnosesicherung beitragen kann. Hierbei ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Korrelation zwischen der zu untersuchenden Familienkonstellation und dem Analyseerfolg. Auffallend war zudem, dass die kausalen Varianten in den fünf gelösten Fällen aus technischer Sicht auch mit anderen in der Diagnostik seit längerem etablierten Methoden (z. B. Exomsequenzierung) detektierbar wären. In diesem Zusammenhang stellte sich heraus, dass negative Befunde nach Abschluss der diagnostischen Untersuchung in einigen Fällen durch inkorrekte oder unvollständige klinische Diagnosen als Untersuchungsindikation begründet waren. Diese Tatsache weist auf die Wichtigkeit einer engen Zusammenarbeit zwischen Klinikern und Genetikern für den Analyseerfolg hin. Eine aktuelle Limitation der

WGS-Methode ergab sich durch die eingeschränkte Bewertbarkeit vieler Varianten, insbesondere in nicht-kodierenden Regionen. Um deren funktionelle Bedeutung zu verstehen, bedarf es umfangreicher weitergehender Analysen im Labor.

Abschließend sei festgehalten, dass die Methode WGS sowohl für die Erforschung als auch Diagnostik von IRDs großes Potenzial bereithält. Die Implementierung von WGS in den Diagnostikprozess erscheint jedoch erst dann sinnvoll, wenn eine ausreichende Evidenzlage zur Interpretation genetischer Varianten außerhalb der bereits bekannten kodierenden Bereiche gegeben ist.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<i>ABCA4</i>	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4
ACMG	American College of Medical Genetics
AF	Allelfrequenz
<i>AIRE</i>	Autoimmune Regulator
<i>ALMS1</i>	Centrosome and Basal Body Associated Protein
<i>ALPK1</i>	Alpha Kinase 1
B	benign
<i>BBS10</i>	BBS10 Gene
bp	Basenpaare (engl. base pairs)
<i>CACNA2D4</i>	Calcium Channel, Voltage-Dependent, Alpha-2/Delta Subunit 4
CADD	Combined Annotation Dependent Depletion
CDG1A	Kongenitale Glykosylierungsstörung Typ 1A (eng. Congenital Disorder of Glycosylation, Type 1A)
<i>CDH23</i>	Cadherin 23
<i>CEP290</i>	Centrosomal Protein, 290-KD
<i>CHEK2</i>	Checkpoint Kinase 2
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
<i>EHBP1</i>	EH Domain-Binding Protein 1
EVAdb	Exome Variant Analysis Database
frameshift Variante	Variante, die zu einer Verschiebung des Leserasters führt
gnomAD	Genome Aggregation Database
<i>HBB</i>	Hemoglobin-Beta Locus
HGMD	Human Gene Mutation Database
<i>HGSNAT</i>	Heparan-Alpha-Glucosaminide N-Acetyltransferase

HGVS	Human Genome Variation Society
HPO-Terms	Human Phenotype Ontology Terms
IGV	Integrative Genomics Viewer
<i>IMPG2</i>	Interphotoreceptor Matrix Proteoglykan 2
IRD	Erbliche Netzhautdystrophie (engl. Inherited Retinal Dystrophy)
<i>KIAA1549</i>	KIAA1549 Gene
LB	likely benign
LCA	Leber'sche Kongenitale Amaurose
LOVD	Leiden Open Variation Database
LP	likely pathogenic
MGI	Mouse Genome Informatics
Missense Variante	Variante, die zum Aminosäureaustausch führt
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure (engl. Messenger ribonucleic acid)
MRT	Magnetresonanztomographie
<i>MYO7A</i>	Myosin VIIA
<i>NCAPG2</i>	Non-SMC Condensin II Complex Subunit G2
NGS	Hochdurchsatz-Sequenzierung (engl. Next Generation Sequencing)
<i>NMNAT1</i>	Nicotinamide Nucleotide Adenylyltransferase 1
<i>NR2E3</i>	Nuclear Receptor Subfamily 2, Group E, Member 3
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
P	pathogenic
<i>PDE6B</i>	Phosphodiesterase 6B
pLI	Probability of Loss-of-function Intolerance
PM	moderate evidence of pathogenicity
<i>PMM2</i>	Phosphomannomutase 2
PP	supporting evidence of pathogenicity
pph2	PolyPhen-2

<i>PRPF6</i>	Pre-mRNA-Processing Factor 6
PS	strong evidence of pathogenicity
PVS	very strong evidence of pathogenicity
<i>RAB28</i>	RAS-Associated Protein 28
<i>RCC1</i>	RCC1 Domain- and BTB Domain-Containing Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
ROSAH-Syndrom	Retinal Dystrophy, Optic Nerve Edema, Splenomegaly, Anhidrosis and Migraine Headache Syndrome
RP	Retinitis Pigmentosa
<i>RPE65</i>	Retinoid Isomerohydrolase RPE65
<i>RPGR</i>	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator
<i>RPGRIP1</i>	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-Interacting Protein
<i>SAMD11</i>	Sterile Alpha Motif Domain-Containing Protein 11
SCRA	Sveinsson`sche Chorioretinale Atrophie
SIFT	Sorting Intolerant from Tolerant
<i>SNRNP200</i>	Small Nuclear Ribonucleoprotein, 200-KD
<i>SPP2</i>	Secreted Phosphoprotein 2
TADs	Topologisch assoziierende Domänen (engl. Topologically Associated Domains)
<i>TEAD1</i>	Tea Domain Family Member 1
<i>TGM6</i>	Transglutaminase 6
UCSC	UCSC Genome Browser
UTR	Untranslatierte Region
USH1B	Usher-Syndrom Typ 1B
<i>USH2A</i>	Usherin
WES	Exomsequenzierung (engl. Whole Exome Sequencing)
WGS	Ganzgenomsequenzierung (engl. Whole Genome Sequencing)

Die Schreibweise der in der Tabelle aufgeführten Genbezeichnungen wurde der OMIM-Datenbank (49) entnommen.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Studienkohorte (n Familien = 22).	17
Tabelle 2: Grenzwerte für akzeptierte Frequenzen von Varianten innerhalb von gnomAD und EVAdb.....	23
Tabelle 3: Grenzwerte und Interpretation für die Vorhersageprogramme pph2, SIFT und CADD.....	23
Tabelle 4: Einteilung in Klassen nach den ACMG-Kriterien.	25
Tabelle 5: Ungelöste Fälle mit priorisierten Varianten und deren ACMG-Klassifikation in ClinVar (46).	29
Tabelle 6: Wahrscheinlich gelöste Fälle mit priorisierten Varianten und deren ACMG-Klassifikation in ClinVar (46).....	36
Tabelle 7: Gelöste Fälle mit kausalen Varianten und deren ACMG-Klassifikation.....	45
Tabelle 8: Zusatzbefunde mit Varianten und deren ACMG-Klassifikation in ClinVar (46)...	59

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinische und genetische Heterogenität der IRDs.	6
Abbildung 2: Mögliche Lageverhältnisse von Varianten.	7
Abbildung 3: Aktuelle Initiativen und Projekte in Zusammenhang mit der Genomsequenzierung.	14
Abbildung 4: Familienkonstellationen innerhalb der Studienkohorte (n = 22).	18
Abbildung 5: Indikation der Indexpatienten (n = 22).	19
Abbildung 6: Strukturiertes Analyseschema.	20
Abbildung 7: Anteil von gelösten, wahrscheinlich gelösten und ungelösten Fällen an der Studienkohorte und Verteilung der Familienkonstellationen (n = 22).	26
Abbildung 8: Stammbäume der ungelösten Fälle.	27
Abbildung 9: Stammbäume der wahrscheinlich gelösten Fälle.	34
Abbildung 10: Darstellung der Strukturvariante in <i>RPGR</i> in IGV (BG051).	41
Abbildung 11: Schematische Darstellung des <i>RPGR</i> -Gens mit Strukturvariante (BG051). ...	42
Abbildung 12: Diagnosen und Varianten innerhalb der gelösten Fälle.	43
Abbildung 13: Stammbäume der gelösten Fälle.	44
Abbildung 14: Darstellung der Strukturvarianten in <i>MYO7A</i> in IGV (BG007).	47
Abbildung 15: Segregation der Varianten in <i>MYO7A</i> (BG007).	48
Abbildung 16: Schematische Darstellung des <i>MYO7A</i> -Gens mit Strukturvarianten (BG007).	48
Abbildung 17: Darstellung der Varianten in <i>BBS10</i> in IGV (BG047).	50
Abbildung 18: Segregation der Varianten in <i>BBS10</i> (BG047).	50
Abbildung 19: Schematische Darstellung des <i>BBS10</i> -Gens mit vorliegenden Varianten (BG047).	51

Abbildung 20: Darstellung der <i>missense</i> Variante in <i>ALPK1</i> in IGV und Segregation (BG057).	53
Abbildung 21: Schematische Darstellung des <i>ALPK1</i> -Gens mit <i>missense</i> Variante (BG057).	54
Abbildung 22: Darstellung der Varianten in <i>PMM2</i> in IGV (BG026, BG048).	55
Abbildung 23: Segregation der Varianten in <i>PMM2</i> (BG026, BG048).....	56
Abbildung 24: Schematische Darstellung des <i>PMM2</i> -Gens mit den vorkommenden <i>missense</i> Varianten (BG026, BG048).	56
Abbildung 25: Häufigkeit von Zusatzbefunden innerhalb der Studienkohorte.	58
Abbildung 26: Stammbäume der Familien mit Zusatzbefunden.	58

9 Anhangsverzeichnis

Anhang 1: NM-Nummern und NP-Nummern der Gene	80
Anhang 2: Sieben mögliche intronische Varianten in <i>CDH23</i> (BG022)	81
Anhang 3: 18 mögliche intronische Varianten in <i>USH2A</i> (BG034)	81
Anhang 4: Vier mögliche Varianten in <i>USH2A</i> (BG052)	82
Anhang 5: Auszug aus der Einwilligungserklärung zum Bavarian Genomes Projekt	83

10 Anhang

Anhang 1: NM-Nummern und NP-Nummern der Gene

Gen	NM-Nummer	NP-Nummer	Familien-ID
<i>ABCA4</i>	NM_000350.3	NP_000341.2	BG002 BG012 BG018
<i>AIRE</i>	NM_000383.4	NP_000374.1	BG069
<i>ALMS1</i>	NM_015120.4	NP_055935.4	BG038
<i>ALPK1</i>	NM_001102406.2	NP_001095876.1	BG057
<i>ATP7B</i>	NM_000053.4	NP_000044.2	BG057
<i>BBS10</i>	NM_024685.4	NP_078961.3	BG047
<i>CACNA2D4</i>	NM_172364.5	NP_758952.4	BG018
<i>CDH23</i>	NM_022124.6	NP_071407.4	BG022
<i>CHEK2</i>	NM_007194.4	NP_009125.1	BG052
<i>CNGB1</i>	NM_001297.5	NP_001288.3	BG012
<i>EHBP1</i>	NM_001142615.3		BG034
<i>HBB</i>	NM_000518.5		BG0010
<i>HGSNAT</i>	NM_152419.3	NP_689632.2	BG008
<i>IMPG2</i>	NM_016247.4	NP_057331.2	BG031
<i>KIAA1549</i>	NM_001164665.2	NP_001158137.1	BG042
<i>MYO7A</i>	NM_000260.4		BG007
<i>NCAPG2</i>	NM_001281932.2	NP_001268861.1	BG069
<i>NMNAT1</i>	NM_022787.4	NP_073624.2	BG011
<i>NR2E3</i>	NM_014249.4	NP_055064.1	BG008
<i>PDE6B</i>	NM_000283.3	NP_000274.2	BG010
<i>PMM2</i>	NM_000303.3		BG026 BG048
<i>PRPF6</i>	NM_012469.4	NP_036601.2	BG018
<i>RAB28</i>	NM_001017979.3	NP_001017979.1	BG004
<i>RCBTB1</i>	NM_018191.4	NP_060661.3	BG031
<i>RPGR</i>	NM_001034853		BG051

<i>RPGRIP1</i>	NM_020366.3:	NP_065099.3	BG042
<i>SAMD11</i>	NM_152486.3	NP_689699.2	BG052
<i>SNRNP200</i>	NM_014014.5	NP_054733.2	BG020
<i>SPP2</i>	NM_006944.3	NP_008875.1	BG011
<i>TEAD1</i>	NM_021961.6	NP_068780.2	BG016
<i>TGM6</i>	NM_001254734.2:	NP_945345.2	BG069
<i>USH2A</i>	NM_206933.3	NP_996816.2	BG034 BG038 BG052

Anhang 2: Sieben mögliche intronische Varianten in *CDH23* (BG022)

NM-Nummer	C-Position
NM_022124.6	c.68-2061T>C
NM_022124.6	c.145+18913A>C
NM_022124.6	c.146-28401A>G
NM_022124.6	c.753+2263C>A
NM_022124.6	c.832+7074T>G
NM_022124.6	c.833-672A>G
NM_022124.6	c.6254-345_6254-325del

Die in dieser Tabelle angeführten Varianten liegen in der Indexpatientin heterozygot vor.

Anhang 3: 18 mögliche intronische Varianten in *USH2A* (BG034)

NM-Nummer	C-Position
NM_206933.3	c.14133+6434T>G
NM_206933.3	c.12067-22849G>C
NM_206933.3	c.12066+5936G>A
NM_206933.3	c.11389+2289T>G
NM_206933.3	c.11048-870T>C
NM_206933.3	c.7301-15145dup
NM_206933.3	c.7300+5207A>T
NM_206933.3	c.6050-1977_6050-1976del
NM_206933.3	c.4628-11750A>G

NM_206933.3	c.4627+2523T>G
NM_007123.5	c.3157+4592G>A
NM_007123.5	c.2809+2551C>G
NM_007123.5	c.1972-6408A>G
NM_007123.5	c.1972-18417T>G
NM_007123.5	c.651+19799C>T
NM_007123.5	c.651+19204G>C
NM_007123.5	c.651+13846G>A
NM_007123.5	c.486-1094T>C

Die in dieser Tabelle angeführten Varianten liegen in der Indexpatientin heterozygot vor.

Anhang 4: Vier mögliche Varianten in *USH2A* (BG052)

NM-Nummer	C-Position
NM_206933.3	c.12066+9942G>T
NM_206933.3	c.15520-443_15520-440dup
NM_206933.3	c.6806-189G>A
NM_206933.3	c.652-15682_652-15678del

Die in dieser Tabelle angeführten Varianten liegen in der Indexpatientin heterozygot vor.

Anhang 5: Auszug aus der Einwilligungserklärung zum Bavarian Genomes Projekt

Mitteilung von medizinisch relevanten Analyseergebnissen aus der Studie „Bavarian Genomes“

Ich wünsche, dass

- ☐ sich aus der Studie ergebende Hinweise für die mögliche Ursache meiner Seltenen Erkrankung* **und/oder**
- ☐ Zusatzfunde, aus denen sich **für mich oder meine Nachkommen** ein sehr hohes Risiko für eine Erkrankung ergibt, für die eine wirksame Therapie oder sinnvolle Vorbeugemaßnahmen zur Verfügung stehen,

mir und/oder folgender Ärztin / folgendem Arzt:

Name: Vorname:

Adresse:

mitgeteilt werden.

- ☐ für mich relevante Analyseergebnisse aus der Studie „Bavarian Genomes“ nicht mitgeteilt werden.

* gilt nicht für Teilnehmer, die selbst nicht erkrankt sind

Rekontaktierung

Mit einer erneuten Kontaktaufnahme durch den Studienleiter hier am UKR, bzw. einem Studienmitarbeiter bin ich einverstanden. Eine solche Kontaktaufnahme kann beispielsweise erfolgen, um sich über zusätzliche Aspekte meiner Krankengeschichte auszutauschen und/oder weitere Informationen oder Bioproben von mir zu erbitten.

Ja ☐

Nein ☐

11 Literaturverzeichnis

1. Georgiou M, Fujinami K, Michaelides M. Inherited retinal diseases: Therapeutics, clinical trials and end points - A review. *Clin Experiment Ophthalmol* [Internet]. 2021 Apr 20;49(3):270–88. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ceo.13917>
2. Tatour Y, Ben-Yosef T. Syndromic Inherited Retinal Diseases: Genetic, Clinical and Diagnostic Aspects. *Diagnostics* [Internet]. 2020 Oct 2;10(10):779. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/10/10/779>
3. Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2018 Sep;66(March):157–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.005>
4. Dockery A, Whelan L, Humphries P, Farrar GJ. Next-Generation Sequencing Applications for Inherited Retinal Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 May 26;22(11):5684. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/5684>
5. Sangermano R, Scott H, Wagner N, Place E, Bujakowska KM. Genetic testing of various eye disorders. In: *Genetics and Genomics of Eye Disease* [Internet]. Elsevier; 2020. p. 239–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816222-4.00014-9>
6. RetNet: Retinal Information Network [Internet]. Laboratory for the Molecular Diagnosis of Inherited Eye Diseases, The University of Texas Health Science Center at Houston. [cited 2026 Jan 26]. Available from: <https://retnet.org/>
7. Schaaf CP, Zschocke J. Basiswissen Humangenetik [Internet]. 3rd ed. Basiswissen Humangenetik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. 67, 71, 210–211 p. (Springer-Lehrbuch). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-56147-8>
8. Lunenburg CATC, Henricks LM, van Kuilenburg ABP, Mathijssen RHJ, Schellens JHM, Gelderblom H, et al. Diagnostic and therapeutic strategies for fluoropyrimidine treatment of patients carrying multiple DPYD variants. *Genes (Basel)*. 2018;9(12):1–13.
9. Ferreira CR. The burden of rare diseases. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2019 Jun 18;179(6):885–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.a.61124>
10. Orphanet: Quality charter about rare diseases [Internet]. [cited 2026 Jan 26]. Available from: <https://www.orpha.net/en/other-information/about-rare-diseases>
11. Sahel J-A, Marazova K, Audo I. Clinical Characteristics and Current Therapies for Inherited Retinal Degenerations. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2015 Feb 1;5(2):a017111–a017111. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a017111>
12. Holtan JP, Selmer KK, Heimdal KR, Bragadóttir R. Inherited retinal disease in Norway – a characterization of current clinical and genetic knowledge. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 2020 May 19;98(3):286–95. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aos.14218>

13. Weisschuh N, Obermaier CD, Battke F, Bernd A, Kuehlewein L, Nasser F, et al. Genetic architecture of inherited retinal degeneration in Germany: A large cohort study from a single diagnostic center over a 9-year period. *Hum Mutat* [Internet]. 2020 Sep 29;41(9):1514–27. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.24064>
14. Heath Jeffery RC, Mukhtar SA, McAllister IL, Morgan WH, Mackey DA, Chen FK. Inherited retinal diseases are the most common cause of blindness in the working-age population in Australia. *Ophthalmic Genet* [Internet]. 2021 Jul 4;42(4):431–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13816810.2021.1913610>
15. Liew G, Michaelides M, Bunce C. A comparison of the causes of blindness certifications in England and Wales in working age adults (16–64 years), 1999–2000 with 2009–2010. *BMJ Open* [Internet]. 2014 Feb;4(2):e004015. Available from: <https://bmjopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjopen-2013-004015>
16. Nuzbrokh Y, Ragi SD, Tsang SH. Gene therapy for inherited retinal diseases. *Ann Transl Med* [Internet]. 2021 Aug;9(15):1278–1278. Available from: <https://atm.amegroups.com/article/view/57369/html>
17. Kang C, Scott LJ. Voretigene Neparvovec: A Review in RPE65 Mutation-Associated Inherited Retinal Dystrophy. *Mol Diagn Ther* [Internet]. 2020 Aug 13;24(4):487–95. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00475-6>
18. NIH U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2026 Jan 26]. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/>
19. Pierce EA, Aleman TS, Jayasundera KT, Ashimatey BS, Kim K, Rashid A, et al. Gene Editing for CEP290 -Associated Retinal Degeneration. *N Engl J Med* [Internet]. 2024 Jun 6;390(21):1972–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38709228>
20. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2010 Jan 8;11(1):31–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2626>
21. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2011 Nov 27;12(11):745–55. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrg3031>
22. Broadgate S, Yu J, Downes SM, Halford S. Unravelling the genetics of inherited retinal dystrophies: Past, present and future. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2017 Jul;59:53–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.03.003>
23. Petersen B-S, Fredrich B, Hoeppner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet* [Internet]. 2017 Dec 14;18(1):14. Available from: <http://bmcbgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-017-0479-5>
24. Stöhr H, Weber BHF. Genetics and diagnostics of inherited retinal diseases in the era of whole genome sequencing. *Medizinische Genet* [Internet]. 2025 Feb 6;37(1):3–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39963373>

25. Sangermano R, Garanto A, Khan M, Runhart EH, Bauwens M, Bax NM, et al. Deep-intronic ABCA4 variants explain missing heritability in Stargardt disease and allow correction of splice defects by antisense oligonucleotides. *Genet Med* [Internet]. 2019 Aug;21(8):1751–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021016191>
26. Chiang J (Pei-W, Lamey T, McLaren T, Thompson JA, Montgomery H, De Roach J. Progress and prospects of next-generation sequencing testing for inherited retinal dystrophy. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2015 Oct 3;15(10):1269–75. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.2015.1081057>
27. Consugar MB, Navarro-Gomez D, Place EM, Bujakowska KM, Sousa ME, Fonseca-Kelly ZD, et al. Panel-based genetic diagnostic testing for inherited eye diseases is highly accurate and reproducible, and more sensitive for variant detection, than exome sequencing. *Genet Med* [Internet]. 2015 Apr;17(4):253–61. Available from: <https://doi.org/10.1038/gim.2014.172>
28. Britten-Jones AC, Gocuk SA, Goh KL, Huq A, Edwards TL, Ayton LN. The Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Inherited Retinal Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2023 May;249:57–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36592879>
29. Shah M, Shanks M, Packham E, Williams J, Haysmoore J, MacLaren RE, et al. Next generation sequencing using phenotype-based panels for genetic testing in inherited retinal diseases. *Ophthalmic Genet* [Internet]. 2020 Jul 3;41(4):331–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/13816810.2020.1778736>
30. Inaba A, Yoshida A, Maeda A, Kawai K, Kosugi S, Takahashi M. Perception of genetic testing among patients with inherited retinal disease: Benefits and challenges in a Japanese population. *J Genet Couns* [Internet]. 2022 Aug;31(4):860–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jgc4.1556>
31. Farrar GJ, Carrigan M, Dockery A, Millington-Ward S, Palfi A, Chadderton N, et al. Toward an elucidation of the molecular genetics of inherited retinal degenerations. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2017 Aug 1;26(R1):R2–11. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/26/R1/R2/3828555>
32. Ellingford JM, Barton S, Bhaskar S, Williams SG, Sergouniotis PI, O’Sullivan J, et al. Whole Genome Sequencing Increases Molecular Diagnostic Yield Compared with Current Diagnostic Testing for Inherited Retinal Disease. *Ophthalmology* [Internet]. 2016 May;123(5):1143–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642016000300>
33. Carss KJ, Arno G, Erwood M, Stephens J, Sanchis-Juan A, Hull S, et al. Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2017 Jan;100(1):75–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929716305274>
34. Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, Hall IM. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. *Cell* [Internet]. 2019 Mar;177(1):70–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.032>

35. Smedley D, Smith KR, Martin A, Thomas EA, McDonagh EM, Cipriani V, et al. 100,000 Genomes Pilot on Rare-Disease Diagnosis in Health Care — Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2021;385(20):1868–80.
36. Stranneheim H, Lagerstedt-Robinson K, Magnusson M, Kvarnung M, Nilsson D, Lesko N, et al. Integration of whole genome sequencing into a healthcare setting: high diagnostic rates across multiple clinical entities in 3219 rare disease patients. *Genome Med* [Internet]. 2021 Dec 17;13(1):40. Available from: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-021-00855-5>
37. European Commission. European “1+ Million Genomes” Initiative [Internet]. European Commission. [cited 2026 Jan 28]. Available from: <https://digital-strategy.ec.europa.eu/en/policies/1-million-genomes>
38. genomDE- Nationale Strategie für Genommedizin. [cited 2026 Jan 28]; Available from: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/gesundheitswesen/personalisierte-medizin/genomde-de.html>
39. Till A, Siddiqui RA, Altbürger C, Schwarz R, Huebner T, Wolf J, et al. Germany’s national genomDE strategy. *Nat Med* [Internet]. 2025 Dec 15;31(12):3981–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-025-03991-2>
40. Sozialgesetzbuch Fünftes Buch Gesetzliche Krankenversicherung (SGB V). § 64e SGB V Modellvorhaben zur umfassenden Diagnostik und Therapiefindung mittels Genomsequenzierung bei seltenen und bei onkologischen Erkrankungen, Verordnungsermächtigung. Stand: Zuletzt geändert durch Art. 14 Nr. 2 G v. 10.12.2021 I 5162 [Internet]. 2021 [cited 2026 Jan 28]. Available from: <https://www.sozialgesetzbuch-sgb.de/sgbv/64e.html>
41. Bavarian Genomes: 1000 Klinische Genome für Seltene Erkrankungen in Bayern [Internet]. [cited 2026 Jan 29]. Available from: <https://www.bavarian-genomes.de/>
42. EVAdb: Exome Variant Annotation Database [Internet]. [cited 2023 Feb 11]. Available from: <https://github.com/mri-ihg/EVAdb>
43. Köhler S, Gargano M, Matentzoglou N, Carmody LC, Lewis-Smith D, Vasilevsky NA, et al. The Human Phenotype Ontology in 2021. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jan 8;49(D1):D1207–17. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D1207/6017351>
44. The Human Phenotype Ontology [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://hpo.jax.org/app/>
45. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jan 4;46(D1):D1062–7. Available from: <http://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D1062/4641904>
46. ClinVar [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
47. Stenson PD, Ball E V., Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD ®): 2003 update. *Hum Mutat* [Internet]. 2003

- Jun;21(6):577–81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.10212>
48. HGMD® [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
 49. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM® [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://omim.org/>
 50. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* [Internet]. 2020 May 28;581(7809):434–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2308-7>
 51. gnomAD: Genome Aggregation Database [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>
 52. Bult CJ, Blake JA, Smith CL, Kadin JA, Richardson JE, Anagnostopoulos A, et al. Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8;47(D1):D801–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky1056>
 53. MGI-Mouse Genome Informatics-The international database resource for the laboratory mouse [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <http://www.informatics.jax.org/>
 54. GeneCards - The Human Gene Database [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://www.genecards.org/>
 55. Safran M, Rosen N, Twik M, BarShir R, Stein TI, Dahary D, et al. The GeneCards Suite. In: *Practical Guide to Life Science Databases* [Internet]. Singapore: Springer Nature Singapore; 2021. p. 27–56. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-5812-9_2
 56. Bryan JM, Fufa TD, Bharti K, Brooks BP, Hufnagel RB, McGaughey DM. Identifying core biological processes distinguishing human eye tissues with precise systems-level gene expression analyses and weighted correlation networks. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2018 Oct 1;27(19):3325–39. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/27/19/3325/5042913>
 57. eyeIntegration [Internet]. [cited 2022 Aug 29]. Available from: <https://eyeintegration.nei.nih.gov/>
 58. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res* [Internet]. 2002 Jun 1;12(6):996–1006. Available from: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.229102>
 59. UCSC Genome Browser [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://genome.ucsc.edu/>
 60. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2011 Jan 1;29(1):24–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.1754>
 61. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan

- J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* [Internet]. 2016 Jun;37(6):564–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.22981>
62. Sequence Variant Nomenclature [Internet]. [cited 2022 Aug 30]. Available from: <https://varnomen.hgvs.org/>
 63. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* [Internet]. 2010 Apr;7(4):248–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nmeth0410-248>
 64. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
 65. Ng PC, Henikoff S. Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. *Genome Res* [Internet]. 2001 May 1;11(5):863–74. Available from: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.176601>
 66. SIFT - Sorting Intolerant From Tolerant [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>
 67. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* [Internet]. 2014 Mar 2;46(3):310–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.2892>
 68. CADD - Combined Annotation Dependent Depletion [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://cadd.gs.washington.edu/score>
 69. Fokkema IFAC, Taschner PEM, Schaafsma GCP, Celli J, Laros JFJ, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat* [Internet]. 2011 May;32(5):557–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.21438>
 70. LOVD - An Open Source DNA variation database system [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://www.lovd.nl/>
 71. Firth H V., Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2009 Apr;84(4):524–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010>
 72. DECIPHER v11.13: Mapping the clinical genome [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://www.deciphergenomics.org/>
 73. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell* [Internet]. 2019 Jan;176(3):535-548.e24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418316295>
 74. SpliceAI Lookup [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://spliceailookup.broadinstitute.org/>

75. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1987;15(17):7155–74. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/15.17.7155>
76. Yeo G, Burge CB. Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals. *J Comput Biol* [Internet]. 2004 Mar;11(2–3):377–94. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/1066527041410418>
77. Pertea M. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001 Mar 1;29(5):1185–90. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.5.1185>
78. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved Splice Site Detection in Genie. *J Comput Biol* [Internet]. 1997 Jan;4(3):311–23. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cmb.1997.4.311>
79. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* [Internet]. 2015 May 8;17(5):405–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021030318>
80. NIH National Library of Medicine. PubMed [Internet]. [cited 2023 Feb 12]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
81. Google Scholar [Internet]. [cited 2023 Feb 12]. Available from: <https://scholar.google.de/>
82. Sveinsson K. Helicoidal peripapillary chorioretinal degeneration. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 2009 May 27;57(1):69–75. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-3768.1979.tb06661.x>
83. Roy Choudhury A, Munonye I, Sanu KP, Islam N, Gadaga C. A review of Alström syndrome: a rare monogenic ciliopathy. *Intractable Rare Dis Res* [Internet]. 2021 Nov 30;10(4):2021.01113. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/irdr/10/4/10_2021.01113/_article
84. Saqib MAN, Nikopoulos K, Ullah E, Sher Khan F, Iqbal J, Bibi R, et al. Homozygosity mapping reveals novel and known mutations in Pakistani families with inherited retinal dystrophies. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Sep 6;5(1):9965. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep09965>
85. Schulz HL, Grassmann F, Kellner U, Spital G, Rüther K, Jägle H, et al. Mutation Spectrum of the ABCA4 Gene in 335 Stargardt Disease Patients From a Multicenter German Cohort—Impact of Selected Deep Intronic Variants and Common SNPs. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2017 Jan 24;58(1):394. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.16-19936>
86. Yusuf IH, Birtel J, Shanks ME, Clouston P, Downes SM, Charbel Issa P, et al. Clinical Characterization of Retinitis Pigmentosa Associated With Variants in SNRNP200.

- JAMA Ophthalmol [Internet]. 2019 Nov 1;137(11):1295. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/fullarticle/2749088>
87. Jin Z-B, Gu F, Matsuda H, Yukawa N, Ma X, Nao-i N. Somatic and gonadal mosaicism in X-linked retinitis pigmentosa. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2007 Nov 1;143A(21):2544–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.a.31984>
 88. Comander J, Weigel-DiFranco C, Sandberg MA, Berson EL. Visual Function in Carriers of X-Linked Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology* [Internet]. 2015 Sep;122(9):1899–906. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2015.05.039>
 89. Fuster-García C, García-Bohórquez B, Rodríguez-Muñoz A, Aller E, Jaijo T, Millán JM, et al. Usher Syndrome: Genetics of a Human Ciliopathy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jun 23;22(13):6723. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/6723>
 90. Mansard L, Baux D, Vaché C, Blanchet C, Meunier I, Willems M, et al. The Study of a 231 French Patient Cohort Significantly Extends the Mutational Spectrum of the Two Major Usher Genes MYO7A and USH2A. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Dec 10;22(24):13294. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/24/13294>
 91. Esposito G, Testa F, Zacchia M, Crispo AA, Di Iorio V, Capolongo G, et al. Genetic characterization of Italian patients with Bardet-Biedl syndrome and correlation to ocular, renal and audio-vestibular phenotype: identification of eleven novel pathogenic sequence variants. *BMC Med Genet* [Internet]. 2017 Dec 1;18(1):10. Available from: <http://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12881-017-0372-0>
 92. Niederlova V, Modrak M, Tsyklauri O, Huranova M, Stepanek O. Meta-analysis of genotype-phenotype associations in Bardet-Biedl syndrome uncovers differences among causative genes. *Hum Mutat* [Internet]. 2019 Nov 29;40(11):2068–87. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.23862>
 93. Williams LB, Javed A, Sabri A, Morgan DJ, Huff CD, Grigg JR, et al. ALPK1 missense pathogenic variant in five families leads to ROSAH syndrome, an ocular multisystem autosomal dominant disorder. *Genet Med* [Internet]. 2019 Sep;21(9):2103–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-019-0476-3>
 94. Kozycki CT, Kodati S, Huryn L, Wang H, Warner BM, Jani P, et al. Gain-of-function mutations in ALPK1 cause an NF-κB-mediated autoinflammatory disease: functional assessment, clinical phenotyping and disease course of patients with ROSAH syndrome. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2022 Oct 22;81(10):1453–64. Available from: <https://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2022-222629>
 95. Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman J, et al. Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13 in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nat Genet* [Internet]. 1997 May 1;16(1):88–92. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng0597-88>
 96. Schollen E, Kjaergaard S, Legius E, Schwartz M, Matthijs G. Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2000 May 15;8(5):367–71. Available

from: <http://www.nature.com/articles/5200470>

97. Chang IJ, He M, Lam CT. Congenital disorders of glycosylation. *Ann Transl Med* [Internet]. 2018 Dec;6(24):477–477. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2018.10.45>
98. Monin M-L, Mignot C, De Lonlay P, Héron B, Masurel A, Mathieu-Dramard M, et al. 29 French adult patients with PMM2-congenital disorder of glycosylation: outcome of the classical pediatric phenotype and depiction of a late-onset phenotype. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2014 Dec 11;9(1):207. Available from: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-014-0207-4>
99. Lam C, Krasnewich DM. PMM2-CDG [Internet]. *GeneReviews®*. 1993. 1–28 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301289>
100. Ghoti H, Fibach E, Rachmilewitz EA, Jead H, Filon D. New Insights on β -Thalassemia in the Palestinian Population of Gaza: High Frequency and Milder Phenotype Among Homozygous IVS-I-1 (HBB: c.92+1G>A) Patients with High Levels of Hb F. *Hemoglobin* [Internet]. 2017 Mar 4;41(2):144–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/03630269.2017.1339611>
101. Easton D. CHEK2*1100delC and Susceptibility to Breast Cancer: A Collaborative Analysis Involving 10,860 Breast Cancer Cases and 9,065 Controls from 10 Studies. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2004 Jun;74(6):1175–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707627049>
102. Guo Y-C, Lin J-J, Liao Y-C, Tsai P-C, Lee Y-C, Soong B-W. Spinocerebellar ataxia 35: Novel mutations in TGM6 with clinical and genetic characterization. *Neurology* [Internet]. 2014 Oct 21;83(17):1554–61. Available from: <https://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000000909>
103. Ghorbani F, Alimohamed MZ, Vilacha JF, Van Dijk KK, De Boer-Bergsma J, Fokkens MR, et al. Feasibility of Follow-Up Studies and Reclassification in Spinocerebellar Ataxia Gene Variants of Unknown Significance. *Front Genet* [Internet]. 2022 Mar 25;13(March):1–13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2022.782685/full>
104. Liu X, Hu F, Zhang D, Li Z, He J, Zhang S, et al. Whole genome sequencing enables new genetic diagnosis for inherited retinal diseases by identifying pathogenic variants. *NPJ genomic Med* [Internet]. 2024 Jan 20;9(1):6. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41525-024-00391-2>
105. Weisschuh N, Mazzola P, Zuleger T, Schaeferhoff K, Kühlewein L, Kortüm F, et al. Diagnostic genome sequencing improves diagnostic yield: a prospective single-centre study in 1000 patients with inherited eye diseases. *J Med Genet* [Internet]. 2024 Jan 19;61(2):186–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37734845>
106. Zeuli R, Karali M, de Bruijn SE, Rodenburg K, Scarpato M, Capasso D, et al. Whole genome sequencing identifies elusive variants in genetically unsolved Italian inherited retinal disease patients. *HGG Adv* [Internet]. 2024 Jul 18;5(3):100314. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38816995>

107. Maggi J, Koller S, Feil S, Bachmann-Gagescu R, Gerth-Kahlert C, Berger W. Limited Added Diagnostic Value of Whole Genome Sequencing in Genetic Testing of Inherited Retinal Diseases in a Swiss Patient Cohort. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024 Jun 13;25(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38928247>
108. Stephenson KAJ, Zhu J, Dockery A, Whelan L, Burke T, Turner J, et al. Clinical and Genetic Re-Evaluation of Inherited Retinal Degeneration Pedigrees following Initial Negative Findings on Panel-Based Next Generation Sequencing. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jan 17;23(2):995. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/2/995>
109. Kaschta D, Post C, Gaass F, Al-Tawil M, Arriens V, Balachandran S, et al. Evaluating genome sequencing strategies: trio, singleton, and standard testing in rare disease diagnosis. *Genome Med* [Internet]. 2025 Sep 18;17(1):100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/40963120>
110. Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2003 Feb;28(2):91–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000403000021>
111. Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, et al. Sequence Variants in SLITRK1 Are Associated with Tourette's Syndrome. *Science* (80-) [Internet]. 2005 Oct 14;310(5746):317–20. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1116502>
112. Behlmann AM, Goyal NA, Yang X, Chen PH, Ankala A. A Hemizygous Deletion Within the PGK1 Gene in Males with PGK1 Deficiency. [Internet]. Vol. 45, *JIMD reports*. 2019. Available from: http://link.springer.com/10.1007/8904_2018_147
113. Spielmann M, Lupiáñez DG, Mundlos S. Structural variation in the 3D genome. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2018 Jul 24;19(7):453–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-018-0007-0>
114. de Bruijn SE, Fiorentino A, Ottaviani D, Fanucchi S, Melo US, Corral-Serrano JC, et al. Structural Variants Create New Topological-Associated Domains and Ectopic Retinal Enhancer-Gene Contact in Dominant Retinitis Pigmentosa. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2020 Nov;107(5):802–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929720303220>
115. Van de Sompele S, Small KW, Cicekdağ MB, Soriano VL, D'haene E, Shaya FS, et al. Multi-omics approach dissects cis-regulatory mechanisms underlying North Carolina macular dystrophy, a retinal enhanceropathy. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2022 Nov;109(11):2029–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929722004463>
116. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* [Internet]. 2012 May 11;485(7398):376–80. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature11082>
117. Rao SSP, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, et al. A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping. *Cell* [Internet]. 2014 Dec;159(7):1665–80. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>

118. Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, et al. Disruptions of Topological Chromatin Domains Cause Pathogenic Rewiring of Gene-Enhancer Interactions. *Cell* [Internet]. 2015 May;161(5):1012–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415003773>
119. Small KW, DeLuca AP, Whitmore SS, Rosenberg T, Silva-Garcia R, Udar N, et al. North Carolina Macular Dystrophy Is Caused by Dysregulation of the Retinal Transcription Factor PRDM13. *Ophthalmology* [Internet]. 2016 Jan;123(1):9–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642015011537>
120. Cipriani V, Vestito L, Magavern EF, Jacobsen JOB, Arno G, Behr ER, et al. Rare disease gene association discovery in the 100,000 Genomes Project. *Nature* [Internet]. 2025 Feb 26;(December 2023). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-025-08623-w>
121. Rivolta C, Celik E, Kamdar D, Cancellieri F, Kaminska K, Ullah M, et al. RetiGene, a comprehensive gene atlas for inherited retinal diseases. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2025 Oct 2;112(10):2253–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2025.08.017>
122. RetiGene Consortium. RetiGene: IRD Gene Atlas [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: <https://retigene.ercd.info/>
123. Nakamura Y, Ochi Y, Satoh T, Satoh AK. Crag/Rab10/Ehbp1 regulate the basolateral transport of Na⁺K⁺ATPase in Drosophila photoreceptors. *J Cell Sci* [Internet]. 2020 Jan 1;133(7):1–14. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/doi/10.1242/jcs.238790/266318/Crag-Rab10-Ehbp1-regulate-the-basolateral>
124. Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* [Internet]. 1992 Jun;24(3):249–61. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/BF00768846>
125. Luan Z, Reddig K, Li H-S. Loss of Na⁺/K⁺-ATPase in Drosophila photoreceptors leads to blindness and age-dependent neurodegeneration. *Exp Neurol* [Internet]. 2014 Nov;261:791–801. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488614002799>
126. Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet* [Internet]. 2017 Sep 12;136(9):1093–111. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-017-1809-4>
127. den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KEJ, et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2006 Sep;79(3):556–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707627554>
128. Leroy BP, Birch DG, Duncan JL, Lam BL, Koenekoop RK, Porto FBO, et al. Leber congenital amaurosis due to CEP290 mutations - Severe vision impairment with a high unmet medical need. *Retina* [Internet]. 2021 May;41(5):898–907. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/IAE.0000000000003133>

129. Wang G-S, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2007 Oct 29;8(10):749–61. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrg2164>
130. Qian X, Wang J, Wang M, Igelman AD, Jones KD, Li Y, et al. Identification of Deep-Intronic Splice Mutations in a Large Cohort of Patients With Inherited Retinal Diseases. *Front Genet* [Internet]. 2021 Mar 2;12(March):647400. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.647400/full>
131. Wang X, Zhang Y, Ding J, Wang F. mRNA analysis identifies deep intronic variants causing Alport syndrome and overcomes the problem of negative results of exome sequencing. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Sep 10;11(1):18097. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97414-0>
132. Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H. Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol* [Internet]. 2019 Feb 3;266(2):533–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-018-9076-4>
133. Lee K, Abul-Husn NS, Amendola LM, Brothers KB, Chung WK, Gollob MH, et al. ACMG SF v3.3 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* [Internet]. 2025 Aug;27(8):101454. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gim.2025.101454>

12 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberatern oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.