

# **Genetische und funktionelle Analysen zu Ursachen und Pathogenese von erblichen Aortenerkrankungen**

**Dissertation**

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

*Dr. rer. nat.: Doctor rerum naturalium*

der Fakultät

Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Sina Renner**  
aus Göttingen

Hamburg, März 2019

**Dissertationsgutachter:**

PD Dr. rer. nat. Georg Rosenberger  
Prof. Dr. rer. nat. Susanne Dobler

**Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:**

Prof. Dr. rer. nat. Tim-Wolf Gilberger  
Dr. rer. nat. Dirk Becker

**Vorsitzender der Prüfungskommission:**

Prof. Dr. rer. nat. Tim-Wolf Gilberger

**Tag der Disputation:** 21. Juni 2019

Für meine Zeit in Hamburg

## Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	1
II.	Abstract .....	2
III.	Einleitung .....	4
	<b>1. Die Aorta .....</b>	<b>4</b>
	1.1 Struktur der Aorta.....	4
	1.2 Zelluläre und extrazelluläre Komponenten der Aortenwand .....	5
	<b>2. Hereditäre Bindegewebserkrankungen mit vaskulärer Beteiligung .....</b>	<b>8</b>
	2.1 Die zelluläre Pathophysiologie bei hereditären Aortopathien.....	9
	2.2 Die Genetik hereditärer Aortopathien .....	10
	2.3 Bekannte Pathomechanismen bei hereditären Aortopathien.....	17
	<b>3. Die Hochdurchsatzsequenzierung.....</b>	<b>20</b>
	3.1 Ablauf einer Hochdurchsatzsequenzierung.....	20
	3.2 Bioinformatische Auswertung von ES-Daten .....	22
	3.3 Filterung von ES-Daten und Priorisierung von Kandidatengenen.....	24
	3.4 Klassifizierung von Varianten nach ACMG/AMP-Richtlinien .....	25
	<b>4. NGS-basierte Analysen zu erblichen Aortenerkrankungen .....</b>	<b>28</b>
	4.1 Design eines NGS-Gen-Panels.....	28
	4.2 Studienkohorten für Hochdurchsatzsequenzierungen .....	29
IV.	Ziele der Arbeit .....	34
V.	Material und Methoden.....	35
	<b>1. Material .....</b>	<b>35</b>
	1.1 Material für molekularbiologische Methoden.....	35
	1.2 Material für proteinbiochemische Arbeitstechniken .....	36
	1.3 Materialien für zellbiologische Methoden .....	36
	1.4 Sonstige Chemikalien.....	37
	1.5 Bakterienstämme und Zelllinien .....	38
	1.6 Plasmide .....	38
	1.6.1 Ausgangsvektoren für Klonierungen .....	38
	1.6.2 Hergestellte Konstrukte.....	39
	1.7 Oligonukleotide .....	40
	1.7.1 Oligonukleotide für Klonierungen.....	40
	1.7.2 Oligonukleotide für QuikChange® II Site Directed Mutagenesis.....	41
	1.7.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen .....	41
	1.8 Antikörper .....	42
	<b>2. Methoden.....</b>	<b>43</b>
	2.1 Molekularbiologische Methoden.....	43
	2.1.1 Anzucht von E.coli.....	43

2.1.2	Herstellung kompetenter E.coli für chemische Transformation .....	43
2.1.3	Transformation kompetenter E.coli Zellen mit Plasmid DNA .....	44
2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA (Maxi/Mini-Präp) aus E.coli .....	44
2.1.5	Restriktion von DNA .....	45
2.1.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	45
2.1.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
2.1.8	Agarosegelelektrophorese .....	47
2.1.9	Aufreinigung von PCR Produkten vor einer DNA-Sequenzierung nach Sanger ..	47
2.1.10	DNA-Sequenzierung nach Sanger .....	47
2.1.11	Klonierung mittels Gateway® Technologie .....	48
2.1.12	In-Fusion® Klonierung.....	50
2.1.13	Klonierung mittels Restriktionsendonukleasen .....	50
2.1.14	QuikChange® II Site Directed Mutagenesis Kit .....	51
2.1.15	Isolierung von RNA .....	52
2.1.16	cDNA-Synthese .....	52
2.1.17	Detaillierte Transkriptanalysen .....	52
2.2	Genetische Analysen mittels Hochdurchsatz-Sequenzierungen .....	53
2.2.1	Filterung von ES-Daten .....	54
2.2.2	Klassifizierung von Sequenzvarianten.....	55
2.2.3	Identifizierung und Priorisierung von neuen Kandidatengen für hereditäre Aortopathien.....	57
2.2.4	Verifizierung von putativen Kandidatengen durch Mutationanalysen .....	58
2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	60
2.3.1	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) .....	60
2.3.2	Semi-Dry-Blot.....	61
2.3.3	Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf PVDF-Membranen .....	61
2.4	Zellbiologische Methoden.....	62
2.4.1	Zellkultur.....	62
2.4.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen .....	62
2.4.1.2	Passagieren von Zellen .....	62
2.4.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	63
2.4.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Turbofect.....	63
2.4.3	Stabile Transfektion mittels Elektroporation .....	64
2.4.4	Zelllysate.....	64
2.4.5	HA-Immunopräzipitation.....	65
2.4.6	EGFP-Trap.....	65
2.4.7	ADP-Glo™ Kinase Assay .....	65
2.4.8	Immunfluoreszenz-Analysen .....	66
2.4.9	Proliferationsassay .....	66
2.4.10	Synchronisation von eukaryotischen Zellen und Analyse von Regulatoren des Zellzyklus.....	67
2.5	Immunhistologie.....	67
2.5.1	Einbettung von humanem Aortengewebe in Paraffin .....	67
2.5.2	Immunhistochemische Analysen .....	68
2.6	PamGene® Technologie .....	69
2.6.1	Analyse des Kinase-Profiles von CDKL1 in HeLa-Zelllysaten .....	69
2.6.2	Analyse des Kinase-Profiles von rekombinantem CDKL1 und CDKL5 .....	70

2.7	Statistik.....	70
VI.	Ergebnisse .....	71
1.	<b>NGS-basierte Analyse von 32 Genen in 199 Patienten mit einer hereditären Aortopathie oder assoziierten Erkrankungen des Bindegewebes .....</b>	<b>71</b>
1.1	Identifizierung und Klassifizierung von Sequenzveränderungen .....	71
1.2	Retrospektive Analyse gesamtexomischer Daten und Identifizierung von Varianten in <i>LOX</i> .....	73
1.3	Transkriptanalyse der intronischen <i>FBNI</i> c.1589-14A>G Variante .....	74
1.4	Familiäre Segregationsanalysen ausgewählter Varianten .....	75
1.5	Reklassifizierung von Varianten .....	76
1.6	Analyse von einhergehenden Varianten.....	77
1.7	Diagnostische Ausbeute .....	81
2.	<b>Identifizierung neuer Kandidatengene mittels ES und funktionelle Mutationsanalysen zur Ursache erblicher Aortenerkrankungen.....</b>	<b>85</b>
2.1	Vorarbeiten zu dieser Studie .....	85
2.2	Identifizierung von Sequenzveränderungen mittels ES .....	85
2.3	Priorisierung von Kandidatengen .....	93
2.4	Verifizierung von <i>CDKL1</i> als Kandidatengen durch Mutationsanalysen .....	99
2.5	Interaktive Strukturmodellanalysen von <i>CDKL1</i> mittels UCSF Chimera.....	101
2.6	Funktionelle Mutationsanalysen zu <i>CDKL1</i> .....	104
2.6.1	Analyse der Funktion von <i>CDKL1</i> im TGF- $\beta$ -Signalweg.....	104
2.6.2	Analyse der Proliferation und von Regulatoren des Zellzyklus .....	106
2.6.3	Analyse der Kinase-Aktivität von <i>CDKL1</i> mit dem <i>in vitro</i> ADP-Glo™ Kinase System.....	109
2.6.4	Analyse des Phosphorylierungsmotifes von <i>CDKL1</i> .....	112
2.6.5	Immunhistologische Untersuchung der Aorta .....	117
2.6.6	Knockdown und Mutationsanalysen von <i>zcdkl1</i> in Zebraabärlingen .....	120
VII.	Diskussion.....	122
1.	<b>NGS-basierte Analyse von 32 Genen in 199 Patienten mit einer hereditären Aortopathie oder assoziierten Erkrankungen des Bindegewebes .....</b>	<b>122</b>
1.1	Diagnostische Ausbeute .....	122
1.2	Klinische Sensitivität und Klassifizierung von Varianten .....	124
1.3	Genotyp und Phänotyp .....	124
2.	<b>Identifizierung neuer Krankheitsgene für erbliche Aortenerkrankungen .....</b>	<b>127</b>
2.1	Sequenzvarianten in dem Kandidatengen <i>CDKL1</i> .....	127
2.2	Strukturelle Auswirkungen und veränderte Kinase-Aktivität von <i>CDKL1</i> -Mutanten .....	128
2.3	<i>CDKL1</i> und die Pathogenese von HCTDs mit vaskulärer Beteiligung .....	130
VIII.	Ausblick .....	133
IX.	Appendix.....	VIII
X.	Literaturverzeichnis .....	XXXVIII

XI. Abbildungsverzeichnis.....	LIII
XII. Tabellenverzeichnis .....	LIV
XIII. Abkürzungsverzeichnis.....	LV
XIV. Anteilserklärung.....	LVI
XV. Eidesstattliche Erklärung .....	LVIII
XVI. Datenpräsentation auf Kongressen .....	LIX
XVII.Danksagung.....	LX

## I. Zusammenfassung

Genetische Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der Ätiologie von Erkrankungen des Bindegewebes (*connective tissue disorders*; CTD) mit vaskulärer Beteiligung. Eine molekulargenetische Diagnose ist im Hinblick auf eine genspezifische personalisierte Patientenbetreuung essenziell.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden 32 krankheitsassoziierte Gene mittels *targeted Next Generation Sequencing* (tNGS) bzw. Exom-Sequenzierung (ES) bei einer klinisch relevanten Studienkohorte aus 199 Patienten analysiert. Sequenzveränderungen wurden gemäß ihrer Pathogenität klassifiziert und präzisiert. Bei 15 Patienten (7,5%) wurde eine pathogene Variante (PV; in *FBN1* oder *SMAD3*) und bei 19 Individuen wurde  $\geq 1$  wahrscheinlich pathogene Variante (LPV; in *COL3A1*, *FBN1*, *FBN2*, *LOX*, *MYH11*, *SMAD3*, *TGFBR1* oder *TGFBR2*) identifiziert. Zusammengenommen entspricht dies einer diagnostischen Ausbeute von 17,1%. 13 PV/LPV waren nicht in den Datenbanken HGMD oder ClinVar verzeichnet. 47 PV/LPV-negative Patienten (23,6%) wiesen  $\geq 1$  Variante mit unklarer Signifikanz (VUS) auf. 25 Patienten wiesen einhergehende Varianten auf. Die detaillierte Reevaluierung von bekannten oder kalkulierten Variantenklassen resultierte in der Reklassifizierung von 19,8% der Varianten. Diese Daten verdeutlichen die Wichtigkeit der Variantenklassifizierung und –präzisierung, um das Mutationsspektrum von Krankheitsgenen zu erfassen und dadurch die klinische Sensitivität zu erhöhen. Zusammengefasst stellte sich die stringente Multigen-Analyse als geeignete Methode zur Identifikation der genetischen Ursachen von CTDs dar. Dennoch deutet die verhältnismäßig große Anzahl von PV/LPV/VUS-negativen Patienten auf die Existenz von bisher unbekanntem Krankheitsgenen und/oder auf eine oligogene bzw. polygene Vererbung von Erkrankungen des Bindegewebes.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zur Identifizierung neuer Krankheitsgene für CTDs mit vaskulärer Beteiligung familienbasierte ES-Analysen durchgeführt. Dabei wurde die Sequenzveränderung *CDKLI* c.430T>C p.(Cys144Arg) aufgedeckt. Mittels tNGS und Sanger-Sequenzierung wurden bei weiteren Patienten mit Verdacht auf eine Bindegewebserkrankung die Varianten *CDKLI* c.620C>T p.(Ser207Leu) und *CDKLI* c.407C>T p.(Thr136Met) identifiziert. *CDKLI* kodiert für eine bislang dürftig beschriebene Serin/Threonin-Proteinkinase. Die vorhergesagten Aminosäuresubstitutionen lokalisieren in räumlicher Nähe zur ATP-Bindedomäne [p.(Thr136Met) und p.(Cys144Arg)] oder zur Substrat-Bindedomäne [p.(Ser207Leu)] des *CDKLI* Proteins. Die mutanten Proteine *CDKLI*<sup>T136M</sup>, *CDKLI*<sup>C144R</sup> und *CDKLI*<sup>S207L</sup> in heterologen Zellen exprimiert, zeigten *in vitro* eine reduzierte Kinase-Aktivität im Vergleich zum *CDKLI*<sup>WT</sup>

Protein. Die Expression von endogenem CDKL1 wurde in humanem Aortengewebe innerhalb von abgegrenzten Zellinseln mit CD34- und STRO-1-exprimierenden Progenitorzellen nachgewiesen. Letztere gewährleisten die regenerative Kapazität von Geweben. Der Knockdown von *zcdkl1* in Zebrabärblingen führte zu Fehlbildungen der intersomatischen Vaskulatur (ISV). Koinjektion der *zCdkl1*<sup>WT</sup> RNA, nicht aber der *zCdkl1*<sup>C144R</sup> und *zCdkl1*<sup>S207L</sup> RNA, resultierte in einem Rückgang der Zebrabärbling-Embryonen mit ISV Fehlbildungen. Zusammengenommen sprechen die genetischen und klinischen Befunde, die beeinträchtigte Kinase-Aktivität, die Expression in humanem Aortengewebe und die abnorme Gefäßbildung in Zebrabärblingen stark für eine Beteiligung von *CDKLI* Varianten an der Pathogenese von CTDs.

## II. Abstract

Heritable factors play an important etiologic role in connective tissue disorders (CTD) with vascular involvement, and a genetic diagnosis is getting increasingly important for gene-tailored, personalized patient management.

In the first part of this study, we analyzed 32 disease-associated genes by using targeted next-generation sequencing (tNGS) and exome sequencing in a clinically relevant cohort of 199 individuals. We classified and refined sequence variants according to their likelihood for pathogenicity. We identified 1 pathogenic variant (PV; in *FBN1* or *SMAD3*) in 15 patients (7.5%) and  $\geq 1$  likely pathogenic variant (LPV; in *COL3A1*, *FBN1*, *FBN2*, *LOX*, *MYH11*, *SMAD3*, *TGFBR1* or *TGFBR2*) in 19 individuals (9.6%), together resulting in 17.1% diagnostic yield. 13 of PV/LPV were novel. Of PV/LPV-negative patients 47 (23.6%) showed  $\geq 1$  variant of uncertain significance (VUS). 25 patients had concomitant variants. In-depth evaluation of reported/calculated variant classes resulted in reclassification of 19.8% of variants. Variant classification and refinement are essential for shaping mutational spectra of disease genes, thereby improving clinical sensitivity. We conclude that obligate stringent multigene analysis is a powerful tool for identifying genetic causes of clinically related CTDs. Nonetheless, the relatively high rate of PV/LPV/VUS-negative patients underscores the existence of yet unknown disease loci and/or oligogenic/polygenic inheritance.

In the second part of this study, family-based ES analyses were performed to identify new disease genes for connective tissue disease with vascular involvement. This revealed the sequence variant *CDKLI* c.430T>C p.(Cys144Arg). By using tNGS and Sanger sequencing in a larger study cohort of patients with CTDs the variants *CDKLI* c.620C>T p.(Ser207Leu) and *CDKLI* c.407C>T

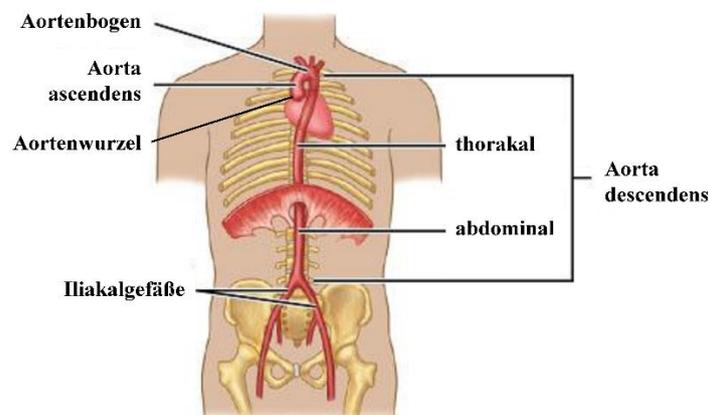
p.(Thr136Met) were identified. *CDKL1* encodes a barely investigated serine/threonine protein kinase. The predicted amino acid substitutions localize adjacent to the ATP binding domain [p.(Thr136Met) and p.(Cys144Arg)] or substrate-binding domain [p.(Ser207Leu)] of CDKL1 protein. Mutant proteins CDKL1<sup>T136M</sup>, CDKL1<sup>C144R</sup> and CDKL1<sup>S207L</sup> expressed in heterologous cells showed a reduced kinase activity compared to CDKL1<sup>WT</sup> protein. Expression of endogenous CDKL1 was demonstrated in human aortic tissue within cell islets positive for CD34 and STRO-1, which represent progenitor cells that ensure the regenerative capacity of tissues. Knockdown of *zcdkl1* in zebrafish lead to malformations of inter somatic vessels (ISV). Co-injection of *zCdk11*<sup>WT</sup> RNA, but not of *zCdk11*<sup>C144R</sup> and *zCdk11*<sup>S207L</sup> RNA rescued ISV malformations. Taken together, the genetic and clinical data, impaired kinase activity, expression in aortic tissue and abnormal ISV formation in zebrafish strongly suggest a role of *CDKL1* variants in the pathogenesis of CTDs.

### III. Einleitung

#### 1. Die Aorta

##### 1.1 Struktur der Aorta

Die Aorta ist ein Blutgefäß, welches aus der linken Herzkammer entspringt und Blut in den Körperkreislauf leitet. Es wird zwischen dem abdominalen, im Bauchraum gelegenen Aortenabschnitt und dem thorakalen Aortenabschnitt im Brustraum unterschieden (Abb. 1). Die thorakale Aorta gliedert sich in die Aortenwurzel (vertikale Ausdehnung der Aortenklappe), die aufsteigende Aorta (*Aorta ascendens*), den Aortenbogen (*Arcus aortae*) und den sich daran anschließenden thorakalen Bereich der absteigenden Aorta (*Aorta descendens*) (Abb. 1). Die abdominale Aorta teilt sich im Beckenraum in die Iliakalgefäße auf (Abb. 1). Während der frühen embryonalen Entwicklung gehen die aufsteigende Aorta, die Aortenklappe und der *Ductus arteriosus* (Gefäßverbindung zwischen Aorta und Lungenarterie im fetalen Blutkreislauf) aus Zellen der Neuralleiste hervor. Die *Aorta descendens* und die abdominale Aorta hingegen bestehen hauptsächlich aus Zellen des Mesoderms.<sup>1,2</sup>

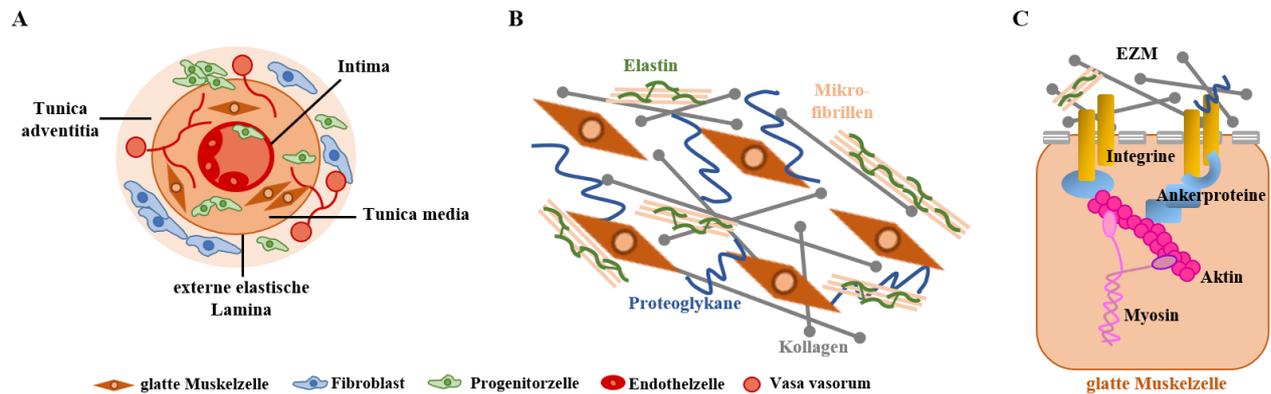


**Abb. 1: Abschnitte der humanen Aorta.** Die Aorta gliedert sich in die aufsteigende Aorta (*Aorta ascendens*), die aus dem linken Herzventrikel entspringt, den Aortenbogen (*Arcus Aortae*) und die absteigende Aorte (*Aorta descendens*). Die *Aorta descendens* ist in einen thorakalen (im Brustraum) und einen abdominalen (im Bauchraum) Bereich unterteilt. Die Iliakalgefäße sind die großen Arterien des Beckenraums, welche aus der abdominalen Aorta hervorgehen. (Abbildung verändert nach medizinkompakt.de., Zugriff Februar 2019)

## 1.2 Zelluläre und extrazelluläre Komponenten der Aortenwand

Die Funktion der thorakalen Aorta basiert auf einer dynamischen und hoch konservierten mikrostrukturellen Organisation der Aortenwand.<sup>3</sup> Diese setzt sich aus drei Schichten zusammen; der *Tunica intima*, der *Tunica media* und der *Tunica adventitia*.<sup>3</sup> Eine interne und eine externe elastische Lamina bestehend aus elastischen Fasern grenzen die mittlere Schicht (*Tunica media*) von der inneren (*Tunica intima*) und der äußeren (*Tunica adventitia*) Schicht der Aortenwand ab (Abb. 2A).<sup>3</sup> Jede Schicht weist spezifische histologische, biochemische und funktionelle Charakteristika auf, die dazu beitragen, dass die vaskuläre Homöostase aufrechterhalten und auf Stress oder Verletzungen reagiert werden kann.<sup>4</sup>

In der mittleren Schicht (*Tunica media*) der Aortenwand sind hauptsächlich glatte Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*; VSMCs) lokalisiert, die von elastischen Fasern der extrazellulären Matrix (EZM) umgeben sind (Abb. 2A und 2B). Die lammellenförmigen Einheiten aus glatten Muskelzellen und EZM verleihen der Aortenwand ihre Zugfestigkeit und Elastizität, wodurch die Aorta hohen Drücken standhalten und zu ihrem initialen Durchmesser während der Diastole (Entspannungsphase des Herzens) zurückkehren kann. Die aufsteigende Aorta besitzt im Vergleich zur absteigenden Aorta mehr solcher lammellenförmiger Einheiten.<sup>3</sup> VSMCs besitzen sowohl kontraktile als auch sekretorische (synthetische VSMC) Eigenschaften und können zwischen ruhenden, kontraktilen und proliferierenden Phasen wechseln.<sup>5-8</sup> Die Kontraktion von VSMCs beruht auf der Interaktion zwischen *smooth muscle  $\alpha$ -actin* (SMA) und der schweren Kette des  $\beta$ -Myosins ( $\beta$ MHC;  *$\beta$ -myosin heavy chain*). Aktin-Myosin Komplexe im Zytoplasma binden an Ankerproteine wie z.B. Talin, Vinculin,  $\alpha$ -Actinin und Filamin A, welche mit Integrinen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Discoidin-Domänen enthaltenden Rezeptoren an der Zellmembran interagieren (Abb. 2C).<sup>9-13</sup> Zellkontraktionen führen zu veränderter Zellgestalt und ermöglichen die Zellmigration. Im Rahmen der sekretorischen Eigenschaften von VSMCs, als Antwort auf biochemische Signale oder mechanische Belastungen, kommt es zur Synthese und Reparatur von verschiedenen Komponenten der EZM (Kollagen, Elastin, Fibrillin, Fibulin) (Abb. 2B).<sup>14</sup> VSMCs haben so die Möglichkeit, mechanische Stimuli (z.B. durch den Blutstrom bedingte Scherkräfte) in biologische Prozesse zu übersetzen. Dieser Vorgang wird auch als Mechanotransduktion bezeichnet und kann sowohl intrazelluläre Prozesse (Neuanordnung des Zytoskeletts and Ausrichtung von Stressfasern) als auch extrazelluläre Veränderungen (Synthese, Ausrichtung und Reparatur von EZM Komponenten) zur Folge haben.<sup>12,15</sup>



**Abb. 2: Zelluläre und extrazelluläre Komponenten der Aortenwand.** **A:** Die Aortenwand besteht aus einer äußeren (*Tunica adventitia*), einer mittleren (*Tunica media*) und einer inneren (*Tunica intima*) Schicht. Die *Tunica intima* umfasst eine interne elastische Lamina, eine einzellige Schicht aus Endothelzellen sowie das Lumen der Aorta. In der *Tunica media* sind hauptsächlich glatte Muskelzellen lokalisiert. Der häufigste Zelltyp in der *Tunica adventitia* sind Fibroblasten. Zudem enthält die *Tunica adventitia* Progenitorzellen, die z.B. in glatte Muskelzellen und Endothelzellen differenzieren können. **B:** Extrazelluläre Matrix (EZM) von glatten Muskelzellen in der Aortenwand. Komponenten der EZM sind Kollagene, Proteoglykane, Mikrofibrillen und Elastin, die untereinander Quervernetzungen bilden. **C:** Kontraktile Apparat von glatten Muskelzellen. Die Kontraktion von VSMCs beruht auf der Interaktion von *smooth muscle  $\alpha$ -actin* (Aktin) und der schweren Kette des  $\beta$ -Myosins (Myosin). Aktin-Myosin-Komplexe sind über Ankerproteine (z.B. Talin, Vinculin und Filamin A) und über Moleküle in der Zellmembran (z.B. Integrine) mit der Zellmembran verbunden. Die Interaktion von VSMCs mit Komponenten der EZM wird z.B. über Integrin-Transmembranrezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt.

Kollagene sorgen in der EZM der Aortenwand für mechanische Festigkeit sowie für die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden zur Adhäsion und Proliferation von Zellen (Abb. 2B).<sup>16</sup> Zudem sondern Kollagene lösliche Zytokine der EZM, wie z.B. Interleukin-2, ab.<sup>17</sup> Kollagen Typ I und Typ III sind die meist vertretenen Kollagenfasern in der Aortenwand. Diese sind in der EZM von Zellen der *Tunica media* und *Tunica adventitia* lokalisiert und verleihen der Aorta Zugfestigkeit und Gesamtstabilität.<sup>18</sup> Kollagen Typ IV ist eine Komponente der Basalmembran der *Tunica intima* zur Adhäsion von Endothelzellen.<sup>19</sup>

Elastin macht bis zu 50% der Trockenmasse der thorakalen Aorta aus und ist damit das häufigste Protein in der EZM der Aortenwand (Abb. 2B).<sup>20</sup> Es wird von VSMCs in der *Tunica media* in Folge eines mechanischen Stimulus synthetisiert und verleiht der Aorta Nachgiebigkeit sowie elastischen Rückstoß. Elastin kann zudem über Elastin-bindende Proteine und Integrin-Rezeptoren mit VSMCs interagieren und z.B. die Organisation des Aktin-Zytoskeletts modulieren sowie Zellproliferation und -migration beeinflussen.<sup>5,21,22</sup>

Neben Elastin und Kollagen erfüllen Mikrofibrillen eine wichtige strukturelle Funktion in der EZM der Aortenwand (Abb. 2B).<sup>23</sup> Zwei Hauptakteure des Mikrofibrillen Netzwerkes sind

Fibrillin und Fibulin. Fibrilline interagieren mit Elastin, Kollagen, Fibronectin und Vitronectin der EZM. Fibrillin 1 und 2 sind in Zusammenhang mit vaskulärer Physiologie beschrieben. Das Fibrillin 1 (FBN1) trägt zur mechanischen Festigkeit der Aortenwand bei; es formt ein Gitter, das elastische Fasern umgibt.<sup>24</sup> FBN1 spielt außerdem eine wesentliche Rolle bei der Regulation, insbesondere der Bereitstellung, von Wachstumsfaktoren und anderen mikrofibrillären Proteinen der EZM. Hierzu gehören z.B. TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor*  $\beta$ 1) und BMP (*bone morphogenic protein*).<sup>25,26</sup> Fibrillin 2 (FBN2) ist hauptsächlich an der Morphogenese der Aorta während der fetalen Entwicklung beteiligt.<sup>27</sup> Fibuline sind Gerüstproteine für die Anhaftung von elastischen Fasern in der EZM. Das Fibulin 5 (FBLN5) hat eine essenzielle Funktion bei der Verknüpfung von Elastin an VSMCs.<sup>28</sup> Fibulin 4 (FBLN4) reguliert die strukturelle Integrität der Aortenwand, indem es z.B. an der Bereitstellung von aktivem TGF- $\beta$ 1 der EZM beteiligt ist.<sup>19</sup>

Die *Tunica adventitia* enthält Fibroblasten, die dem Gewebe mechanische Festigkeit verleihen (Abb. 2A). Sie sind ebenfalls an der Produktion der EZM-Komponenten beteiligt.<sup>4</sup> Außerdem fungiert die *Tunica adventitia* sowohl in sich entwickelnden als auch in adulten Blutgefäßen als Nische für residente Stamm- und Progenitorzellen (Abb. 2A). Hierzu werden u. a. Vorläufer von Endothelzellen, mesenchymalen Zellen, glatten Muskelzellen und Perizyten gezählt<sup>29-33</sup>, die neben Fibroblasten, Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und Adipozyten in der äußersten Schicht der Aortenwand lokalisiert sind. Es wurde diskutiert, dass Progenitorzellen in der *Tunica adventitia* unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen sowohl an vorteilhaften als auch an schädlichen Prozessen beteiligt sind; so tragen sie z.B. zur Gefäßversorgung von Tumoren oder zu lokalen Immunantworten bei.<sup>33</sup> Eine wahrscheinlich andere Population von Vorläuferzellen in der *Tunica adventitia* kann hingegen in VSMCs oder Endothelzellen differenzieren und in die *Tunica media* bzw. *intima* migrieren.<sup>34,35</sup> Die *Tunica adventitia* beinhaltet zudem zirkulierende Vorläuferzellen, die in Folge einer vaskulären Verletzung aktiviert werden. Bei zahlreichen vaskulären Erkrankungen, wie z.B. Pulmonale Hypertonie und Atherosklerose, sind zirkulierende Progenitorzellen in die Pathophysiologie verwickelt.<sup>36-40</sup> Die *Aorta ascendens* enthält außerdem kleinere Blutgefäße (*Vasa vasorum*) in der *Tunica adventitia* (Abb. 2A). Die *Aorta descendens* hingegen ist weitestgehend frei von *Vasa vasorum*.<sup>41</sup>

## 2. Hereditäre Bindegewebserkrankungen mit vaskulärer Beteiligung

Erbliche Erkrankungen des Bindegewebes (*hereditary connective tissue disorders*, HCTD) umfassen eine große Gruppe von Erkrankungen, die sowohl die Haut, die Augen, innere Organe (z.B. die Lunge und den Darm) als auch das neurologische, kraniofaziale, muskuloskeletale und kardiovaskuläre System betreffen können.<sup>42</sup> Mehrere HCTDs gehen mit vaskulären Komplikationen wie z.B. Aortendilatationen, Aortenaneurysmen, Aortendissektionen oder arterieller Tortuosität einher.<sup>43</sup> Diese Erkrankungen werden unter dem Begriff hereditärer Aortopathien zusammengefasst.<sup>44</sup> Aortenaneurysmen machen 1-2% der Todesfälle in der westlichen Welt aus.<sup>45</sup> Sie können die thorakale oder abdominale Aorta betreffen. Häufig bleiben Aneurysmen der Aorta unerkannt bis eine lebensbedrohliche Aortendissektion auftritt. Die Aortendissektion ist die Aufspaltung der Wandschichten, meist verursacht durch einen Einriss der inneren Gefäßwand mit nachfolgender Einblutung zwischen den Gefäßwandschichten; sie ist lebensbedrohlich, weil sie unmittelbar zur Ruptur der Aorta führen kann.<sup>46</sup> Aneurysmatische Erkrankungen der thorakalen und abdominalen Aorta werden unter den Begriffen TAAD (Thorakale(s) Aortenaneurysma und -dissektion) bzw. AAA (Abdominales Aortenaneurysma) zusammengefasst. Ein Aneurysma der thorakalen Aorta mit Einriss der Gefäßwand bedingt eine Mortalität von nahezu 80%.<sup>47</sup> Da akute Aortendissektionen oft irrtümlich für Herzinfarkte gehalten werden, mag die genaue Inzidenz ggf. höher sein.<sup>48</sup> Aufgrund der hohen Mortalität und Morbidität ist eine Behandlung dieser Erkrankungen zwingend. Therapeutisch bzw. prophylaktisch werden die Einschränkung der physischen Aktivität, engmaschige Untersuchung der Aorta mittels Echokardiografie und Angiografie, die Gabe von Betablockern zur Aortenprotektion und der chirurgische Ersatz von betroffenen Aortenabschnitten (z.B. Aortenwurzel, Aortenbogen und *Aorta ascendens*) empfohlen.<sup>49,50</sup>

AAA tritt im Vergleich zu TAAD häufiger auf (5% vs. 1%).<sup>51</sup> Für Personen über 65 Jahre, Männer und Individuen europäischer Herkunft ist das Risiko höher, an AAA zu erkranken.<sup>52</sup> Rauchen, Hyperlipidämie und Bluthochdruck sind ebenfalls Risikofaktoren für die Entwicklung von AAA.<sup>53,54</sup> Abgesehen von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS, *genome-wide association studies*) wurde die genetische Prädisposition für AAA wenig untersucht und krankheitsursächliche Genvarianten sind weitgehend unbekannt.<sup>55,56</sup> Die genetischen Ursachen von TAAD wurden hingegen in den letzten zwei Jahrzehnten intensiv erforscht. TAAD betrifft auch junge Menschen einschließlich Kinder, und hat eine höhere Erblichkeit als AAA.<sup>43</sup> Schätzungsweise 20-25% der Patienten mit TAAD weisen eine positive Familienhistorie auf.<sup>43</sup> Bislang sind etwa 20 Krankheitsgene für TAAD identifiziert<sup>57</sup>, die jedoch weniger als 30% aller familiär auftretenden TAAD Fälle erklären.<sup>58</sup>

## 2.1 Die zelluläre Pathophysiologie bei hereditären Aortopathien

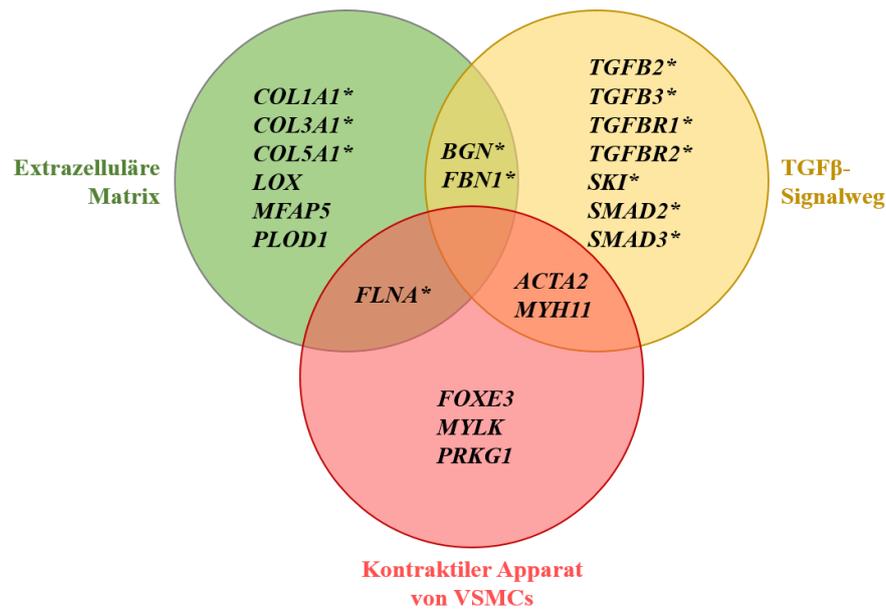
Die Degenerierung der Aorta aufgrund von Depletion von VSMCs<sup>59</sup>, Fragmentierung und Defizienz von elastischen Fasern sowie exzessiver Produktion und Desorganisation von Kollagenen<sup>60</sup> ausgelöst durch Alterungsprozesse, Bluthochdruck und/oder genetischer Prädisposition, ist die pathologische Ursache von TAAD.<sup>61</sup> Produkte aus der Degradierung von Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen akkumulieren in den zelldepletierten Bereichen der EZM, führen zu intramuralem Stress und schwächen die Struktur der Aortenwand zunehmend.<sup>62</sup> Unter normalen physiologischen Bedingungen steuern die VSMCs die mechanischen Eigenschaften der Aortenwand, indem sie die Zusammensetzung und Integrität der EZM regulieren.<sup>63</sup> VSMCs sekretieren z.B. Endopeptidasen und ihre Inhibitoren (MMPs, TIMPs) in streng kontrollierten Mengen, um den Umsatz von Proteinen der EZM zu regulieren.<sup>64</sup> Bei TAAD-Patienten wurde eine unausgewogene Expression von MMPs und TIMPs beobachtet; dies kann eine exzessive Sekretion von MMPs zur Folge haben und so zu einer unverhältnismäßigen EZM-Degradierung führen.<sup>65</sup> Histologisch äußert sich dieser Vorgang in der Reduktion und Fragmentierung von Elastin und der Quervernetzung von elastischen Fasern.<sup>66</sup> MMPs können zudem Kollagene in der Aorta proteolytisch spalten, was zu einer unorganisierten Ablagerung von Kollagenfasern in Aortengeweben von TAAD Patienten führt.<sup>66</sup> Ein weiteres pathophysiologisches Merkmal ist der Wechsel zu untypischen Kollagenen in der Aortenwand (von Typ I/Typ III zu Typ V/Typ XI). Auch dieser Prozess verändert die Struktur der Aortenwand erheblich.<sup>67</sup> Des Weiteren wurde bei TAAD Patienten beschrieben, dass eine erhöhte Expression des Typ 2 Angiotensin II Rezeptors zu einer exzessiven Apoptose von VSMCs führt.<sup>68</sup> Die verbliebenen VSMCs verlieren ihre kontraktile Eigenschaften; dies äußert sich in dem Verlust von Myofilamenten sowie durch eine geringere Expression von Proteinen des Zytoskeletts und der Myofibrillen. In Folge sind die VSMCs weniger motil, was die Struktur der Aortenwand verändert.<sup>43</sup> Degradierete Proteoglykane und Glykosaminoglykane akkumulieren in den Zelldepletierten Bereichen und verhindern normale Zell-Matrix-Interaktionen. Die geschichtete Mikrostruktur der Aortenwand wird zerstört und es kommt zu intramuralem Stress.<sup>69</sup> Zudem wurde beobachtet, dass verletzte oder gestresste VSMCs Chemokine sekretieren, wodurch inflammatorische Zellen rekrutiert werden. Die Beteiligung inflammatorischer Zellen an der Pathogenese von TAAD ist jedoch noch umstritten.<sup>43</sup>

## 2.2 Die Genetik hereditärer Aortopathien

Ätiologisch ist TAAD eine multifaktorielle Erkrankung mit einem hohen Anteil an genetischer Prädisposition.<sup>48,70</sup> TAAD wird aus genetischer Sicht grob in familiäre und sporadische Formen eingeteilt. Beide Formen können als syndromale oder nicht-syndromale Bindegewebserkrankung auftreten.<sup>71</sup> Bei den nicht-syndromalen Formen ist das Auftreten eines Aneurysmas oder einer Dissektion der Aorta das einzige klinische Merkmal. Familiäre Segregationsanalysen zeigten eine erhöhte Prävalenz bei Verwandten, und in den meisten Fällen wird ein autosomal-dominanter Erbgang mit variabler Expressivität und ggf. verminderter Penetranz vermutet.<sup>72</sup> Syndromale Formen sind hingegen durch das Auftreten von TAAD in Verbindung mit weiteren Anomalien unterschiedlicher Organsysteme definiert. Die Gruppe dieser phänotypisch ähnlichen Syndrome ist charakterisiert durch eine variable Kombination von Manifestationen im Herz-Kreislauf-System, im Auge, im Skelett, in der Haut, in der Lunge sowie in der Dura Mater und im ZNS.<sup>73,74</sup> Im Folgenden werden die bekannten Krankheitsgene für syndromale und nicht-syndromale TAAD vorgestellt, die ebenfalls in Tab. 1 beschrieben sind.

Zu den multisystemischen Erkrankungen des Bindegewebes mit kardiovaskulärer Beteiligung, die entweder durch autosomal-dominante, autosomal-rezessive oder X-chromosomale Vererbung charakterisiert sind, gehören u. a. das Marfan Syndrom (MFS), Loeys-Dietz Syndrom (LDS), Sphrintzen-Goldberg Syndrom (SGS) und das Ehlers-Danlos Syndrom (EDS). Das MFS ist eine Bindegewebserkrankung mit diversen Abnormalitäten des Skelettes (Gelenküberbeweglichkeit und Hochwuchs), der Augen (Ektopia lentis und Myopie), der Haut (Dehnungsstreifen), und des kardiovaskulären Systems (Aneurysma oder Dissektion der Aortenwurzel und Mitralklappenprolaps). Bereits im Jahr 1991 wurden Mutationen im Gen für Fibrillin 1 (*FBNI*) als Ursache für das MFS identifiziert.<sup>75</sup> Seitdem wurden mehr als 1.850 verschiedene kausative *FBNI* Varianten beschrieben<sup>76</sup>, die etwa 95% aller MFS Fälle erklären.<sup>77</sup> *FBNI* kodiert für ein Glykoprotein der EZM (Abb. 3). Typischerweise betrifft das Aortenaneurysma bei MFS Patienten den Bereich um die *Sinus valsalvae* (Räume, die von den drei Taschen der Aortenklappe eingefasst werden) der Aortenwurzel.<sup>43</sup> Die absteigende und abdominale Aorta sind bei 10-20% der MFS Patienten ebenfalls betroffen.<sup>43</sup> Phänotypisch weisen SGS und LDS Überlappungen zum MFS auf. Jedoch haben diese zwei Syndrome auch ihre eigenen distinkten klinischen Eigenschaften. LDS ist mit Hypertelorismus, Uvula bifida, Gaumenspalten und arterieller Tortuosität assoziiert. Aneurysmen beim LDS neigen bereits bei kleinen Aortendurchmessern zur Dissektion. Patienten mit SGS weisen eine Kraniosynostose, Lernschwierigkeiten und Hypotonie der Skelettmuskulatur auf. Derzeit sind 6 Gene mit LDS assoziiert: *TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD2*, *SMAD3*, *TGFB2* und *TGFB3*.<sup>78-83</sup> Diese Gene kodieren

für Zytokine, Rezeptoren und intrazelluläre Effektorproteine des TGF- $\beta$ -Signalweges (Abb. 3). Mutationen in *SMAD3*, *TGFBR1* und *TGFBR2* rufen die schwersten kardiovaskulären Phänotypen hervor, während Mutationen in den anderen Genen mit mildereren kardiovaskulären Manifestationen einhergehen. Im Jahr 2016 wurden *loss-of-function* Mutationen in *BGN* als Ursache für einen schweren X-chromosomal vererbten LDS/MFS-ähnlichen Phänotyp beschrieben.<sup>84</sup> *BGN* kodiert für ein Proteoglykan, das die Kollagen-Fibrillogenese organisiert und an der Homöostase der EZM beteiligt ist (Abb. 3).<sup>85,86</sup> Das SGS ist aus genetischer Sicht homogen. Bei 90% der SGS Patienten kann eine *de novo* Mutation in *SKI* identifiziert werden.<sup>87-89</sup> *SKI* kodiert für das Ski Onkogen, welches als negativer Regulator des SMAD-abhängigen kanonischen TGF- $\beta$ -Signalweges fungiert (Abb. 3). Klinische Überlappungen zum MFS und LDS sind auch für das EDS beschrieben. EDS ist charakterisiert durch überdehnbare oder durchscheinende Haut mit Neigung zu Hämatomen und Narben, Gewebsfragilität (Rupturen der Vaskulatur oder des Darmtraktes), Überbeweglichkeit und Luxationen der Gelenke. Etwa 25% der EDS Patienten haben ein Aortenaneurysma.<sup>90</sup> 95% der Patienten mit dem vaskulären Typ des EDS tragen eine Mutation in *COL3A1*.<sup>91</sup> Gelegentlich werden auch Veränderungen in den Genen *COL1A1* und *COL5A1* detektiert, die normalerweise mit dem klassischen EDS und Arthrochalasie assoziiert sind.<sup>92-97</sup> Die drei Gene kodieren für Kollagene, die Kollagenfibrillen der EZM von inneren Organen und der Haut bilden (Abb. 3). Bei dem kyphoskoliotischem EDS und dem EDS mit periventrikulärer nodulärer Heterotopie treten vaskuläre Rupturen sporadisch auf.<sup>98,99</sup> Die beiden Erkrankungen werden durch Veränderungen in *PLOD1* und *FLNA* verursacht.<sup>100,101</sup> Das Genprodukt von *PLOD1* ist in der intermolekularen Quervernetzung von Kollagen involviert (Abb. 3). Filamin A (Genprodukt von *FLNA*) ist eine Komponente des Zytoskeletts, die den kontraktilen Apparat in VSMCs mit der Zellmembran und/oder der EZM verbindet (Abb. 3). In Tab. 1 sind die bisher bekannten genetischen Ursachen weiterer Bindegewebserkrankungen mit teilweise kardiovaskulärer Beteiligung angegeben.



**Abb. 3: Funktionelle Klassifizierung von Krankheitsgenen für syndromale und nicht-syndromale TAAD.** Gene, welche mit syndromaler (markiert mit \*) und nicht-syndromaler TAAD assoziiert sind, sind je nach Funktion des Genproduktes in eine von drei Gruppen eingeteilt. Die Genprodukte von *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, *LOX*, *MFAP5* und *PLOD1* sind an der Homöostase der EZM beteiligt (grün). Die Genprodukte von *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBRI*, *TGFBR2*, *SKI*, *SMAD2* und *SMAD3* spielen eine Rolle im TGF-β-Signalweg (gelb). Die Genprodukte von *FOXE3*, *MYLK* und *PRKG1* regulieren die Kontraktion von VSMCs (rot). Die Genprodukte von *BGN* und *FBNI* spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der EZM und im TGF-β-Signalweg. Filamin A (Genprodukt von *FLNA*) ist an der Homöostase der EZM beteiligt und ist Teil des kontraktilen Apparates, indem es Aktin-Myosin-Komplexe mit der Zellmembran verbindet. Die Genprodukte von *ACTA2* und *MYH11* erfüllen eine Funktion im TGF-β-Signalweg und der Kontraktion von VSMCs. Abbildung verändert nach Verstraeten, A., Luyckx, I., und Loeys, B., 2017.<sup>43</sup>

Bei 12-21% der nicht-syndromalen TAAD Patienten ist die Erkrankung durch eine Mutation im *ACTA2* Gen zu erklären.<sup>102-104</sup> *ACTA2* kodiert für *aortic smooth muscle actin* (SMA), das an der Bildung von kontraktilen Filamenten und an der Aufrechterhaltung der normalen Aortenstruktur beteiligt ist (Abb. 3). Neben TAAD wurden bei Betroffenen mit kausativer Veränderung in *ACTA2* Herzinfarkte, koronare Herzkrankheiten, AAA, bikuspidale Aortenklappen, persistierender Ductus arteriosus, *Livedo reticularis* und *Iris flocculi* beschrieben.<sup>105</sup> Ein weiteres Krankheitsgen für nicht-syndromale TAAD ist *MYH11*<sup>106</sup>, welches für das Protein Myosin 11 (*smooth muscle myosin heavy chain*) kodiert und Hauptbestandteil der dicken kontraktilen Filamente in VSMCs ist (Abb. 3). *MYH11* Mutationen wurden überwiegend bei Familien identifiziert, in denen TAAD und persistierender Ductus arteriosus auftraten.<sup>107</sup> Mutationen in *MYLK* sind eine weitere, seltene Ursache von nicht-syndromaler familiärer TAAD.<sup>108,109</sup> Derzeit sind lediglich drei Familien mit einer *loss-of-function* Mutation in *MYLK* bekannt. Bei Patienten mit einer *MYLK* Mutation wurde von keiner oder einer geringen Erweiterung der Aorta vor einer eintretenden Dissektion berichtet.<sup>108,109</sup> In etwa 1% der Patienten mit familiärer nicht-syndromaler

TAAD wurde eine hochpenetrante *PRKGI* Variante (p.Arg177Gln) identifiziert.<sup>110</sup> Individuen mit dieser Mutation weisen bereits in jungen Jahren (15-51 Jahre) eine Aortendissektion mit einem Aortendurchmesser zwischen 4,3 cm und 5,7 cm auf.<sup>110,111</sup> Darüber hinaus wurden arterielle Tortuosität und Bluthochdruck bei Betroffenen mit dieser *PRKGI* Mutation beschrieben.<sup>110</sup> Pathogene *loss-of-function* Sequenzveränderungen in *MFAP5* wurden als weitere genetische Ursache von nicht-syndromaler TAAD beschrieben.<sup>112</sup> *MFAP5* kodiert für eine EZM-Komponente, die im Umfeld von FBN1-haltigen Mikrofibrillen lokalisiert ist und an TGF- $\beta$  und BMP binden kann (Abb. 3). Lediglich 60% der Träger einer *MFAP5* Mutation sind erkrankt, was auf eine unvollständige Penetranz hindeutet.<sup>112</sup> Als weitere genetische Ursache für TAA gelten *loss-of-function* Mutationen in *MAT2A*.<sup>113</sup> Das Genprodukt von *MAT2A* hat eine zentrale Rolle bei der DNA-, RNA- und Proteinmethylierung. Bis jetzt wurde nur eine Familie mit einer *MAT2A* Mutation beschrieben.<sup>113</sup> Die betroffenen Familienmitglieder waren durchschnittlich 50 Jahre alt; nur 7 von 15 Angehörigen mit einer Mutation in *MAT2A* waren betroffen.<sup>113</sup> In zwei Studien aus dem Jahr 2016 wurden die Gene *LOX* und *FOXE3* mit TAAD assoziiert.<sup>114,115</sup> Wenngleich noch wenig über die Rolle von *FOXE3* im kardiovaskulären System bekannt ist, weisen Studien in Mäusen darauf hin, dass dieser Transkriptionsfaktor essenziell für die Regulation der Quantität, der Dichte und der Differenzierung von VSCMs in der aufsteigenden Aorta ist (Abb. 3).<sup>115</sup> *LOX* (*lysine-6-oxidase*) kodiert für ein Protein, das die Quervernetzung von Kollagen und Elastin initiiert (Abb. 3). Bisher identifizierte Mutationen in *LOX* führen entweder zur Haploinsuffizienz oder zum Funktionsverlust; letzteres, da sie Aminosäuren in der hochkonservierten katalytischen Domäne des *LOX* Proteins betreffen.<sup>114,116</sup> Individuen mit einer *LOX* Mutation weisen gelegentlich auch eine bikuspidale Aortenklappe auf (ca. 15% der Fälle).<sup>114</sup> Eine geringe Anzahl von Patienten mit nicht-syndromaler TAAD tragen eine Mutation in den bekannten syndromalen TAAD Genen, wie z. B. *FBN1*<sup>117-119</sup>, *SMAD3*<sup>120</sup>, *TGFB2*<sup>121</sup> und *TGFBR2*<sup>122,123</sup>. Demnach können Mutationen in zuletzt genannten Genen ein breites Erkrankungsspektrum verursachen, d. h. milde Phänotypen wie familiäre nicht-syndromale TAAD, aber auch schwerwiegende Erkrankungen wie das Marfan Syndrom oder Loeys-Dietz Syndrom.

**Tab. 1: Klassifizierung, Prävalenz und Penetranz von hereditären Bindegewebserkrankungen mit/ohne kardiovaskulärer Beteiligung.**

	OMIM Phänotyp (Erbgang)	Gen	Detektionsrate	Prävalenz* Penetranz†	Kardiovaskuläre Beteiligung
nicht-syndromale TAAD	Aortenaneurysma, familiär thorakal 6 (AD)	<i>ACTA2</i>	12%-21%	ca. 1/1.000 <sup>43,50</sup> 50% <sup>43</sup>	AA, AD
	Aortenaneurysma, familiär thorakal n.g. (AD)	<i>COL3A1</i>	selten		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal n.g. (AD)	<i>FBN1</i>	3%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal 10 (AD)	<i>LOX</i>	1.5%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal n.g. (AD)	<i>MAT2A</i>	1%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal 9 (AD)	<i>MFAP5</i>	0,25%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal 4 (AD)	<i>MYH11</i>	1%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal 7 (AD)	<i>MYLK</i>	1%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal 8 (AD)	<i>PRKG1</i>	1%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal n.g. (AD)	<i>SMAD3</i>	2%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal n.g. (AD)	<i>TGFB2</i>	1%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal n.g. (AD)	<i>TGFB3</i>	selten		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal n.g. (AD)	<i>TGFBR1</i>	3%		
	Aortenaneurysma, familiär thorakal n.g. (AD)	<i>TGFBR2</i>	5%		
Ehlers-Danlos Syndrome	Ehlers-Danlos Syndrom, Arthrochalasie Typ, 1 (AD)	<i>COL1A1</i>	5%-70%	unbekannt (ca. 1:1.000.000) unbekannt (ca. 50%)	n.b.
	Ehlers-Danlos Syndrom, vaskulärer Typ (AD)	<i>COL3A1</i>	>96% <sup>124</sup>	1:50.000 <sup>124</sup> 100% <sup>124</sup>	MKP, IA
	Ehlers-Danlos Syndrom, klassischer Typ (AD)	<i>COL5A1</i> <i>COL5A2</i>	78% <sup>125</sup> 14% <sup>125</sup>	1:20.000 <sup>125</sup> unbekannt (ca. 50%) <sup>125</sup>	MKP, AWD
	Ehlers-Danlos Syndrom, kyphoskoliotischer Typ, 1 (AR)	<i>PLOD1</i>	100%	unbekannt (ca. 1:100.000) 100%	ARUP
Loeys-Dietz Syndrome	Loeys-Dietz Syndrom 4 (AD)	<i>TGFB2</i>	5%-10% <sup>126</sup>	unbekannt <sup>126</sup> (ca. 1:40.000) 100%	MKP, AWA, AD, AT
	Loeys-Dietz Syndrom 5 (AD)	<i>TGFB3</i>	1%-5% <sup>126</sup>		MI, AWD, AD, AAbd
	Loeys-Dietz Syndrom 1 (AD)	<i>TGFBR1</i>	20%-25% <sup>126</sup>		AT, AAsc, DAsc, PDA
	Loeys-Dietz Syndrom 2 (AD)	<i>TGFBR2</i>	55%-60% <sup>126</sup>		AT, AAsc, DAsc, PDA
	Loeys-Dietz Syndrom 3 (AD)	<i>SMAD3</i>	5%-10% <sup>126</sup>		MKP, AA, AD, AT

Tab. 1: Fortsetzung

OMIM Phänotyp (Erbgang)	Gen	Detektionsrate	Prävalenz* Penetranz†	Kardiovaskuläre Beteiligung
Marfan Syndrom (AD)	<i>FBN1</i>	>95%	1:7.500 <sup>127</sup> 100% <sup>127</sup>	AAsc
Weill-Marchesani Syndrom 2 (AD)		in einer Familie <sup>128</sup>	1:100.000 <sup>128</sup> 100% <sup>128</sup>	MKI, AKS, VSD
Weill-Marchesani Syndrom 1 (AR)	<i>ADAMTS10</i>	nahezu 100% <sup>128</sup>	1:100.000 <sup>128</sup> 100% <sup>128</sup>	MKI, AKS, VSD
Stickler Syndrom, Typ I (AD)	<i>COL2A1</i>	80%-90% <sup>129</sup>	1:7.500-1:9.000 <sup>129</sup> 100% <sup>129</sup>	MKP
Alport Syndrom (XLD)	<i>COL4A5</i>	65% <sup>130</sup>	1:50.000 <sup>130</sup>	Bluthochdruck
Mitralklappenprolaps 2 (AD)	<i>DCHS1</i>	25% <sup>131</sup>	1/40 <sup>131</sup> unbekannt (ca. 50%)	MVP, MKR
Cutis laxa, Typ IB (AR)	<i>EFEMP2</i>	>95% <sup>132</sup>	1:4.000.000 <sup>132</sup> unvollständig <sup>132</sup> (ca. 50%)	AA, AT, PAA
Cutis laxa (AD)	<i>ELN</i>	unbekannt	selten <sup>133</sup> (1:1.000.000) unvollständig	MKR, AKR
Supravalvuläre Aortenstenose (AD)		unbekannt	1:20.000 <sup>134</sup> unvollständig	PAS
Kontrakturale Arachnodaktylie, kongenitale (AD)	<i>FBN2</i>	ca. 50% <sup>135</sup>	unbekannt <sup>135</sup> (ca. 1:20.000) 100%	PDA, AWD
Frontometaphyseale Dysplasie 1 (XLR)	<i>FLNA</i>	68% <sup>136</sup>	selten, unbekannt <sup>136</sup> 100% <sup>136</sup>	MKP
Heterotopie, periventrikulär (XLD)		unbekannt		BAK, PDA, TAD
Melnick-Needles Syndrom (XLD)		100% <sup>136</sup>	unbekannt <sup>136</sup> 100% <sup>136</sup>	MKP
Otopalatodigitales Syndrom , Typ 1 (XLD)		94% <sup>136</sup>	unbekannt <sup>136</sup> 100% <sup>136</sup>	n.b.
Otopalatodigitales Syndrom, Typ 2 (XLD)		100% <sup>136</sup>	unbekannt <sup>136</sup> 100% <sup>136</sup>	n.b.
Terminale Osseous Dysplasie (n.b.)		100% <sup>136</sup>	unbekannt <sup>136</sup> 100% <sup>136</sup>	n.b.

Tab. 1: Fortsetzung

OMIM Phänotyp (Erbgang)	Gen	Detektionsrate	Prävalenz* Penetranz†	Kardiovaskuläre Beteiligung
Kongenitale Herzfehler, multiple Typen, 5 (AD, AR)	<i>GATA5</i>	2% <sup>137-140</sup>	1:100 (CHD allgemein) <sup>141</sup> unvollständig (ca. 50%)	ASD, BAK, AS, VF
?Weill-Marchesani Syndrom 3 (AR)	<i>LTBP2</i>	in einer Familie <sup>128</sup>	1:100.000 <sup>128</sup> 100% <sup>128</sup>	PKS, AKS
Adams-Oliver Syndrom 5 (AD)	<i>NOTCH1</i>	23%	1:230.000 (Inzidenz) <sup>142</sup> unvollständig <sup>142</sup> (ca. 50%)	PKS, MKH
Kongenitale Herzerkrankung (mit thorakalem Aortenaneurysma)		ca. 3.3% <sup>143</sup>	1:500 <sup>143</sup> unvollständig <sup>143</sup> (ca. 50%)	BAK
Sphrintzen-Goldberg Syndrom (AD)	<i>SKI</i>	100% <sup>144</sup>	selten <sup>144</sup> (1:1.000.000) unbekannt <sup>144</sup> (ca. 50%)	MKP, AWD,
Arteriell Tortuositäts-Syndrom (AR)	<i>SLC2A10</i>	100%	<1:1.000.000 unbekannt (ca. 50%)	AT, AS, PAS, ArA
Juvenile Polyposis/erbliche Blutungen, Telangiektasie Syndrom (AD)	<i>SMAD4</i>	1%-2% <sup>145</sup>	1:10.000 <sup>145</sup> Alters-abhängig <sup>145</sup> (50%)	MKP, MKR
Myhre Syndrom (AD)		100% <sup>146</sup>	selten <sup>146</sup> (1:1.000.000) 100% <sup>146</sup>	CHD, AS, PDA
Polyposis, juvenile intestinale (AD)		27% <sup>147</sup>	1:50.000 <sup>147</sup> 97% <sup>147</sup>	n.b.

Bezeichnung, Prävalenz und Penetranz der Erkrankungen sowie die Detektionsrate für krankheitsursächliche Veränderungen sind aufgelistet. Nicht-syndromale Formen von TAAD und Loeys-Dietz Syndrome wurden aufgrund limitierter Daten hinsichtlich Prävalenz und Penetranz in einer Gruppe kombiniert. Das Stickler Syndrom Typ I wurde ausgewählt, da es die häufigste Erkrankung ist, die mit pathogenen *COL2A1* Varianten assoziiert ist. Für jede Erkrankung sind ggf. häufig auftretende Manifestationen des kardiovaskulären Systems beschrieben. \*, Für Erkrankungen mit unbekannter Prävalenz wurden Informationen von anderen Erkrankungen übernommen. †, Für Erkrankungen mit unbekannter, unvollständiger oder altersabhängiger Penetranz wurde ein Wert von 50% angenommen.

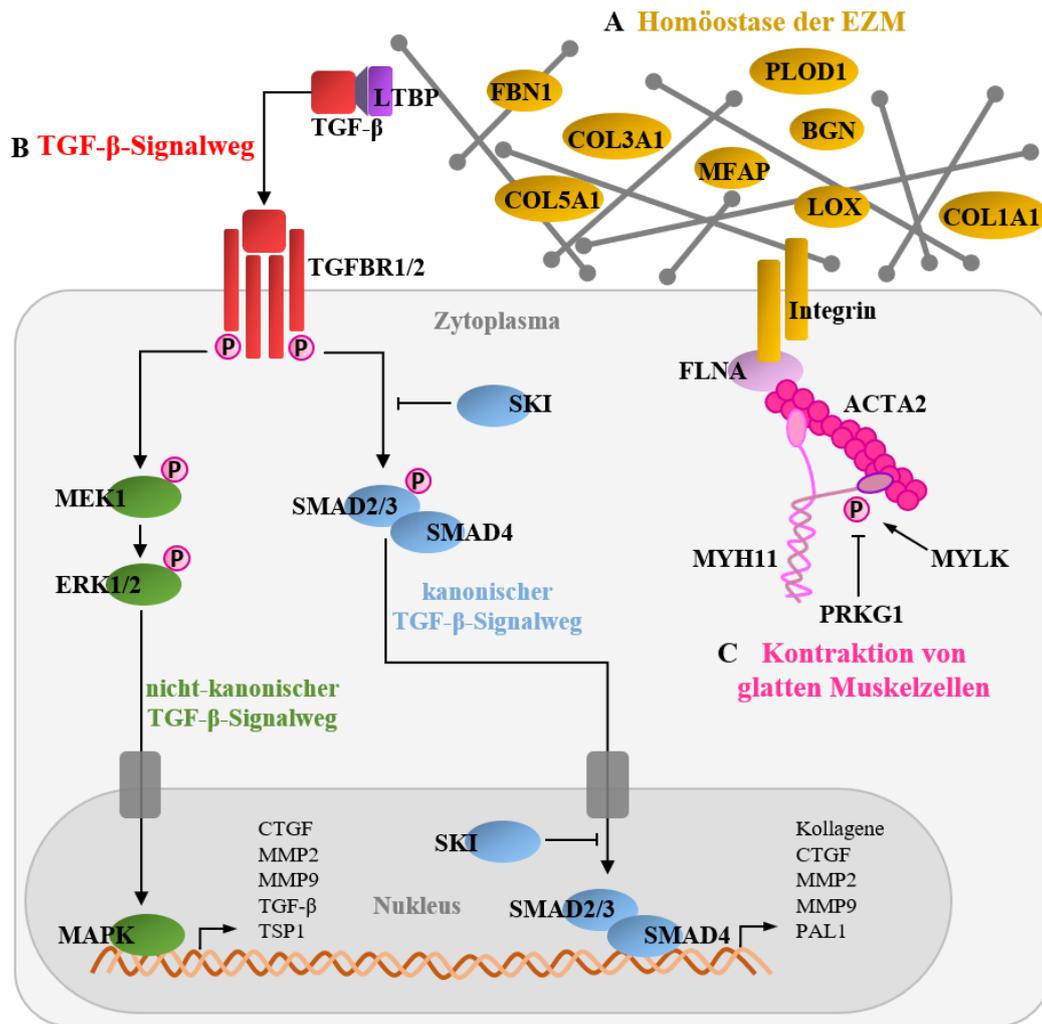
AD, autosomal dominant; AR, autosomal rezessiv; XLD (X-linked dominant), X-chromosomal dominant; XLR (X-linked recessive), X-chromosomal rezessiv; n.b. nicht beschrieben; n.g. nicht geklärt. AA/AD, Aortenaneurysma/-dissektion; AAsc/AAbd, Aneurysma der *Aorta ascendens/Aorta abdominalis*; VF, Vorhofflimmern; ArA, Arterienaneurysma; AWD/AWA, Dissektion/Aneurysma der Aortenwurzel; AT; Arterielle Tortuosität; AKR, Aortenklappen Regurgitation; A(K)S, Aorten(klappen)stenose; BAK, Bikuspidale Aortenklappe; CHD, Kongenitale Herzfehler; DAsc, Dissektion der *Aorta ascendens*; M(K)I, Mitral(klappen)insuffizienz; MKP/MKH, Mitralklappenprolaps/-hypoplasie; MKR, Mitralklappen Regurgitation; PAA, Aneurysma der Pulmonalarterie; PAS, Periphere Arterienstenose; PDA, Persistierender *Ductus arteriosus*; PKS, Stenose der Pulmonalklappe; TAD, Dilatation der thorakalen Aorta; VSD, Ventrikulärer Septumdefekt; ARUP, Aortenruptur.

### 2.3 Bekannte Pathomechanismen bei hereditären Aortopathien

Krankheitsgene syndromaler/nicht-syndromaler TAAD kodieren für Proteine, die bei der Regulation der Homöostase der EZM, der Steuerung des TGF- $\beta$ -Signalweges sowie der Kontrolle von Metabolismus und kontraktile Funktion von glatten Muskelzellen (VSMC) involviert sind (Abb. 4).

Die Aorta ist ständigem arteriellem Druck ausgesetzt. Kollagene und elastische Fasern verhindern mechanisches Versagen und sorgen für die Erholung der Aortenwandstruktur nach systolischer Erweiterung. Die intra- und intermolekulare Quervernetzung von Kollagenen und elastischen Fasern ist dabei unabdingbar für den Zusammenhalt der Aortenwand. Genetische Defekte in Kollagenen (*COL1A1*, *COL3A1* und *COL5A1*)<sup>91-97</sup>, in mit Mikrofibrillen assoziierten Proteinen und in Bestandteilen von Glykoproteinen (*FBN1* und *MFAP5*)<sup>75,112</sup> sowie in Proteinen, die an der Kollagen-Kollagen und der Kollagen-Proteoglykan Quervernetzung beteiligt sind (*BGN*, *LOX*, *PLOD1*)<sup>84,101,114</sup>, beeinträchtigen die Bildung und/oder Integrität der EZM (Abb. 4A).

Aufgrund der bekannten strukturellen Rolle von Fibulin 1 (FBN1) in der EZM, wurde die bei Betroffenen festgestellte Fragmentierung von Bindegewebsfasern pathogenen *FBN1* Mutationen zugeschrieben. Allerdings erklärte diese Beobachtung bestimmte klinische Merkmale beim Marfan Syndrom wie z. B. Hochwuchs oder Mitralklappenprolaps nicht. Erst die Beschreibung einer Dysregulierung des TGF- $\beta$ -Signalweges als pathogenetische Eigenschaft bei der TAAD im Kontext mit dem Marfan Syndrom ermöglichte eine breitere pathogenetische Begründung für die beobachteten klinischen Kennzeichen.<sup>148-151</sup> Tiermodelle erbrachten den Nachweis: FBN1-defiziente Mäuse zeigten einen Anstieg des zirkulierenden Zytokins TGF- $\beta$  und eine fehlerhafte Septierung der Alveolen in sich entwickelnden Lungen.<sup>150</sup> Die *in vivo* Anwendung von neutralisierenden Antikörpern gegen TGF- $\beta$  stellten den normalen Lungenphänotypen wieder her.<sup>150</sup> Ebenso wurde für Myopathie, Mitralklappenprolaps und TAAD gezeigt, dass sie durch einen aberranten TGF- $\beta$ -Signalweg verursacht werden.<sup>148,149,151</sup> FBN1-enthaltende Mikrofibrillen regulieren die Bioverfügbarkeit von TGF- $\beta$ , indem sie in der EZM an den LLC (*large latent complex*), bestehend aus reifem TGF- $\beta$ , LAP (*latency associated peptide*) und LTBP (*latent TGF- $\beta$ -binding protein*), binden und somit die Interaktion zwischen TGF- $\beta$  und TGF- $\beta$ -Rezeptor verhindern (Abb. 4B). Mutationen in *FBN1* führen zu einer disproportionalen Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges inklusive der stromabwärts liegenden Signalmoleküle (Abb. 4B).<sup>150,152</sup> Hierzu gehören u. a. SMAD2 und SMAD3 im kanonischen sowie ERK1 und ERK2 im nicht-kanonischen TGF- $\beta$ -Signalweg (Abb. 4B).



**Abb. 4: Signalwege in der Pathogenese von TAAD.** Proteine, kodiert von bekannten TAAD-Krankheitsgenen, sind bei bekannten Signalwegen und zellulären Prozessen beteiligt. **A:** Mutationen in Genen für EZM-Proteine (gelb), wie z.B. Biglykan (*BGN*), Kollagene (*COL1A1*, *COL3A1* und *COL5A1*), Fibrillin 1 (*FBN1*), Mikrofibrillen-assoziierte Proteine (*MFAP5*), Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 2-Dioxygenase (*PLOD1*) und Protein-Lysin 6-Oxidase (*LOX*) beeinträchtigen die Elastizität und Festigkeit der Aorta. **B:** Der kanonische und nicht-kanonische TGF- $\beta$ -Signalweg. Im kanonischen Signalweg (blau) phosphorylieren TGF- $\beta$ -Rezeptoren die Transkriptionsfaktoren SMAD2/3, die einen trimeren Komplex mit SMAD4 bilden und im Zellkern die Transkription von Zielgenen des TGF- $\beta$ -Signalweges (z.B. Kollagene und MMPs) initiieren. Ein negativer Regulator des TGF- $\beta$ -Signalweges ist SKI, welches an den SMAD Komplex bindet und dessen Translokation in den Zellkern verhindert. Komponenten des nicht-kanonischen TGF- $\beta$ -Signalweges (grün) werden ebenfalls durch TGFBR1/2-abhängige Phosphorylierung aktiviert und initiieren die Transkription von Zielgenen über *mitogen-activated* Proteinkinasen (MAPK). Mutationen in Proteinen des TGF- $\beta$ -Signalweges führen zu einer verstärkten Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges und in Folge zu einer Überexpression von TGF- $\beta$ -Zielgenen. **C:** Mechanische Stimuli aktivieren den kontraktile Apparat von glatten Muskelzellen (magenta). Die *smooth muscle myosin light chain* Kinase (MYLK) phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosin-Komplexes. Sodann erfolgt die Aktivierung des Myosin-Kopfes durch *aortic smooth muscle* Aktin (ACTA2, auch SMA genannt), wodurch die Kontraktion von VSMCs ermöglicht wird. Die Dephosphorylierung von Myosin führt hingegen zur Relaxation von VSMCs. CTGF, *connective tissue growth factor*; MMP, Matrix-Metalloproteinase; TSP1, Thrombospondin; PAL1, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1. Abbildung verändert nach Verstraeten, A., Luyckx, I., und Loeys, B., 2017.<sup>43</sup>

In den letzten 10 Jahren untermauerte die Identifizierung von Mutationen in Genen, die für TGF- $\beta$ -Rezeptoren (*TGFBR1* und *TGFBR2*), TGF- $\beta$ -Liganden (*TGFB2* und *TGFB3*), stromabwärts gelegene Effektoren (*SMAD2* und *SMAD3*) und TGF- $\beta$ -Inhibitoren (*SKI*) kodieren, die zentrale Rolle des TGF- $\beta$ -Signalweges in der Pathogenese von syndromaler TAAD (Abb. 4B).<sup>153</sup> Der TGF- $\beta$ -Signalweg wird durch *loss-of-function* Mutationen in *SMAD2*, *SMAD3*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBR1* und *TGFBR2* paradoxerweise hyperaktiviert, was sich in einer gesteigerten Menge von phosphoryliertem SMAD2, phosphoryliertem MAPK1 (ERK-2) und MAPK3 (ERK-1), TGF- $\beta$ , Kollagen und CTGF (*connective tissue growth factor*) auswirkt.<sup>78-83</sup> Eine Erklärung für dieses Paradoxon basiert darauf, dass pathogene Varianten primär zu einer Hypoaktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges führen, wodurch es sekundär zu einer Unterbrechung eines im Normalzustand funktionierenden autoinhibitorischen Feedbacks innerhalb des Signalweges kommt. In Folge wird TGF- $\beta$  exzessiv sekretiert und der nicht-kanonische TGF- $\beta$ -Signalweg hyperaktiviert.<sup>154</sup> Die Beobachtung, dass LDS und SGS Patienten eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$ 1 aufweisen, deutet überdies auf einen *crossstalk* zwischen TGF- $\beta$ 2/TGF- $\beta$ 3- und TGF- $\beta$ 1-gesteuerter Signalweiterleitung hin.<sup>80,88</sup> Außerdem wurde ein verstärkt aktivierter TGF- $\beta$ -Signalweg in Patienten mit nicht-syndromaler TAAD und Mutationen in *MYH11* oder *ACTA2* beobachtet.<sup>155</sup> Es wurde spekuliert, dass durch defizientes MYH11 oder ACTA2 die korrekte Anordnung von Myosin- und Aktinfilamenten sowie die Fibrillogenese beeinträchtigt wird.<sup>155</sup> Als Folge von letzterem wird latent vorhandenes TGF- $\beta$  aus der EZM freigesetzt und der TGF- $\beta$ -Signalweg aktiviert.

Ätiologisch für die nicht-syndromale TAAD gilt zudem eine Störung des kontraktilen Apparates von VSMCs (Abb. 4C). Bei Patienten mit familiärer TAAD wurden Mutationen in *ACTA2*<sup>103</sup>, *MYH11*<sup>106</sup>, *MYLK*<sup>109</sup> und *PRKG1*<sup>110</sup> identifiziert, welche vermutlich negativ auf die Kontraktionsfähigkeit von VSMCs wirkt. Die Hauptkomponenten des kontraktilen Apparates in VSMCs sind die dicken Myosin- und die dünnen Aktinfilamente.<sup>156</sup> Bei mechanischem Stimulus wird unter normalen physiologischen Bedingungen MYLK (*smooth muscle myosin light chain kinase*) aktiviert, das die regulatorischen leichten Ketten des Myosins 11 phosphoryliert. Dies führt zur Aktivierung des Myosinkopfes und zur Spaltung von ATP durch Myosin 11. Der Myosinkopf klappt um und die daran befindlichen Aktinfilamente (*ACTA2*; auch bekannt als SMA; *aortic smooth muscle actin*) werden verschoben. Dadurch verkürzt sich die Länge der Aktin-Myosin-Komplexe; die Zelle kontrahiert.<sup>157</sup> PRKG1 (*cGMP-dependent protein kinase I*) phosphoryliert die MLPC (*myosin light chain phosphatase*), welche die leichte Kette des Myosins dephosphoryliert und somit die Entspannung von VSMCs vermittelt (Abb. 4C).<sup>158,159</sup>

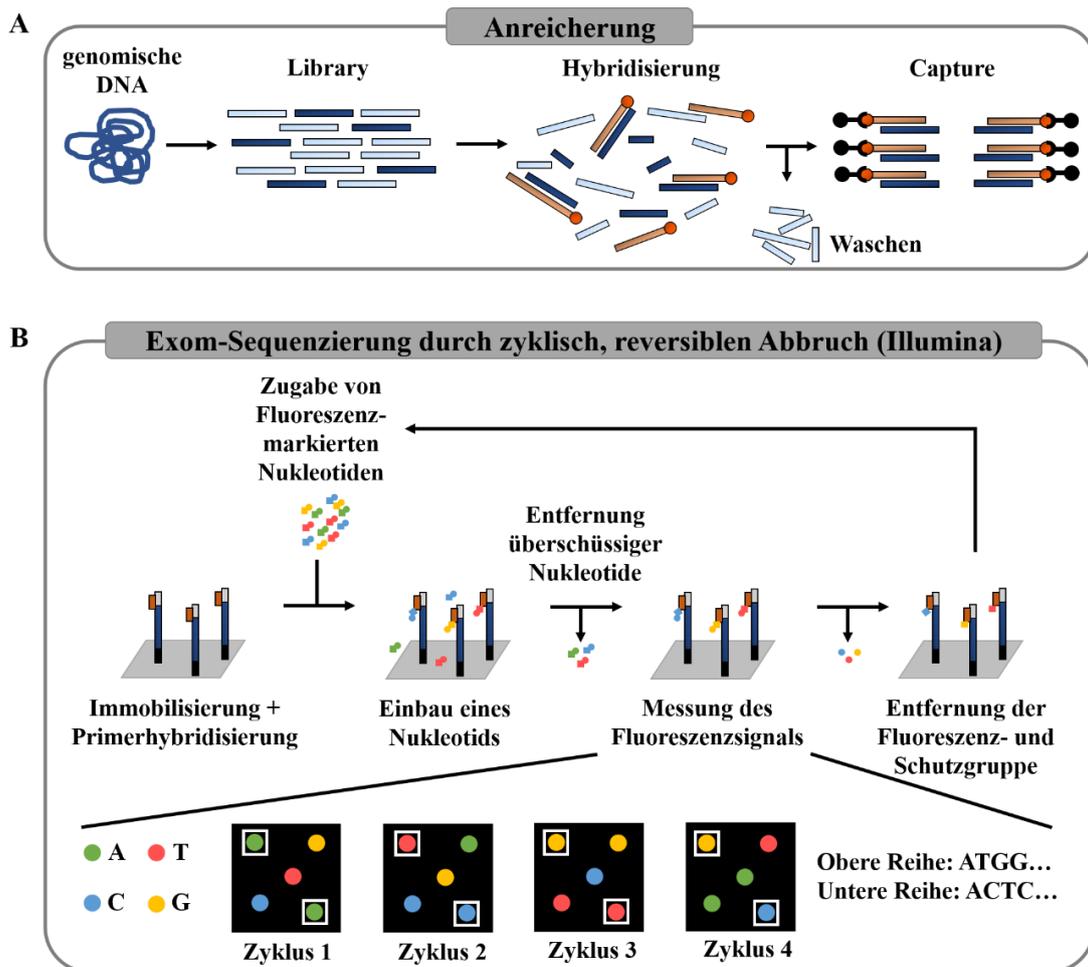
### 3. Die Hochdurchsatzsequenzierung

Die Identifizierung von schädlichen Sequenzvarianten in bekannten und neuen Krankheitsgenen ist ein zentrales Thema der Humangenetik. Die moderne Hochdurchsatzsequenzierung ist eine schnelle, effektive und kostengünstige Methodik zur Identifizierung von Sequenzveränderungen. Sie stellt eine Alternative zu konventionellen, teils veralteten Techniken zur Aufklärung der Ätiologie von erblichen Erkrankungen dar. Kandidatengen-basierte Sequenzanalysen durch Sanger-Sequenzierung sind weitestgehend durch Gen-Panel und gesamtexomische Analysen ersetzt worden.<sup>160</sup> Exom-Sequenzierungen ermöglichen darüber hinaus eine hypothesenfreie Auswertung von Sequenzvarianten. Dies bedeutet, dass nicht der Phänotyp die genetische Testung (d.h. die Auswahl der Gene) bestimmt, sondern eine/mehrere der mittels gesamtexomischer Analyse eruierten Varianten sollen den vorliegenden Phänotyp erklären. Diese reverse Phänotypisierung eignet sich besonders für Erkrankungen mit einem sehr heterogenen phänotypischen Spektrum und einer sehr heterogenen Ätiologie.<sup>161</sup> Neben der DNA-Sequenzierung sind mit dieser Technik auch RNA-, ChIP (*chromatin immunoprecipitation*)- und Methylomsequenzierungen möglich.<sup>162</sup> Unter DNA-Sequenzierungen werden Methoden zur Sequenzierung des gesamten Genoms (*genome sequencing*, GS), zielgerichtete Sequenzierung einer bestimmten Auswahl an Genen (Gen-Panel) sowie die Sequenzierung aller kodierender Sequenzabschnitte (*exome sequencing*, ES) zusammengefasst. Bei allen drei Methoden werden die Zielsequenzen in einem einzigen Sequenzierungsansatz untersucht.

#### 3.1 Ablauf einer Hochdurchsatzsequenzierung

Für eine Gen-Panel-Analyse (tNGS) und eine Exom-Sequenzierung (ES) wird die genomische DNA mittels Schallwellen oder den Einsatz von Enzymen zuerst in doppelsträngige Fragmente mit einer maximalen Länge von 1 kb zerstückelt. Diese Ansammlung von DNA-Fragmenten wird als Library bezeichnet.<sup>163</sup> Durch Hinzufügen von Proben, die komplementär zu den DNA-Zielsequenzen sind, werden die gewünschten Fragmente von den restlichen Fragmenten getrennt. Bei einer Exom-Sequenzierung fallen hierunter alle Exons und ihre angrenzenden intronischen Bereiche; bei der Gen-Panel-Analyse sind damit die Exons und ihre angrenzenden intronischen Bereiche der zu untersuchenden Gene gemeint. Bei dieser Anreicherung erfolgt zuerst eine Hybridisierung, wobei die Proben zur Hybridisierung je nach Hersteller beispielsweise an Magnetkügelchen gekoppelt sind (Abb. 5A). Als nächstes erfolgt die Isolierung (*capture*) der Fragmente (Abb. 5A).<sup>164</sup> Die aufgereinigten Fragmente werden amplifiziert und mit Linker-Oligos

zur Immobilisierung ligiert. Gegebenenfalls werden zusätzlich spezielle Adaptoren angefügt, wodurch mehrerer Proben (z.B. von verschiedenen Patienten) in einem Ansatz parallel sequenziert werden können (Abb. 5A). Die DNA-Fragmente werden über die ligierten Linker auf einer Flusszelle immobilisiert und erneut amplifiziert. Auf diese Weise entstehen Bereiche (Cluster) aus klonal amplifizierten DNA-Templates, die später eine gute Detektion aufgrund des additiven Effektes für gleiche Fragmente ermöglichen. Im nächsten Schritt erfolgt die eigentliche Sequenzierreaktion (Abb. 5B).



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Ablaufes einer Exom-Sequenzierung.** **A:** Anreicherung der exonischen Bereiche. Die mittels Schallwellen oder enzymatischer Reaktionen hergestellten exonischen DNA-Fragmente sind in dunkelblau, die intronischen DNA-Fragmente sind in hellblau dargestellt. Die magnetischen Proben zur Anreicherung von komplementären exonischen und angrenzenden intronischen Bereichen sind in orange dargestellt. **B:** Sequenzierung durch zyklisch, reversiblen Abbruch von angereicherten Template-Clustern. Es ist jeweils ein Template repräsentativ für ein Template-Cluster gezeigt, die auf einer Flusszelle (hellgraue Fläche) immobilisiert sind. Linker zur Immobilisierung auf der Oberfläche und zur Bindung der Primer (braun) sind durch schwarze und graue Kästchen an den Enden des DNA-Templates (dunkelblau) dargestellt. A, Adenin (grün), C, Cytosin (blau); G, Guanin (gelb), T, Thymin (rot). Abbildung verändert nach Bamschad et al., 2009<sup>165</sup> und Metzker, 2010<sup>163</sup>.

Je nach Hersteller werden verschiedene Technologien angewandt. Die gebräuchlichste Methode wurde von Illumina entwickelt. Hierbei fügt eine DNA-Polymerase pro Zyklus nur ein Fluoreszenz-markiertes Nukleotid ein, welches komplementär zum DNA-Template ist. Die Fluoreszenz-markierten Nukleotide tragen eine Schutzgruppe am 3'-Sauerstoff des 2'-Desoxyribosezuckers. Durch diese Modifikation ist der Einbau weiterer Nukleotide neben einem Fluoreszenz-markierten Nukleotid nicht mehr möglich. Nicht gebundene Nukleotide werden anschließend gewaschen und das Fluoreszenzsignal des DNA-Clusters wird detektiert (Abb. 5B). Die vier unterschiedlichen Nukleotide Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin tragen dabei unterschiedliche Fluoreszenzmoleküle und können somit gleichzeitig analysiert werden. Nach Entfernen des Fluoreszenzfarbstoffes und der Schutzgruppe von den Nukleotiden, beginnt ein neuer Zyklus kann.<sup>163</sup> Aus den Fluoreszenzsignalen aufeinanderfolgender Zyklen wird eine Sequenzabfolge erstellt, die spezifisch für jedes DNA-Cluster ist (Abb. 5B). Jede dieser Sequenzabfolgen wird als Read bezeichnet und durchläuft später eine bioinformatische Auswertung, einschließlich dem Abgleich mit dem humanen Referenzgenom zur Identifizierung von Sequenzvarianten.

### 3.2 Bioinformatische Auswertung von ES-Daten

Bei einer Hochdurchsatzsequenzierung werden Gigabytes an Sequenz-Rohdaten produziert, die im ersten Schritt bioinformatisch bearbeitet und analysiert werden müssen. Sowohl die Qualität der Rohdaten als auch die bioinformatische Aufbereitung der Daten sind maßgebend für die Güte der NGS-basierten Definierung von Varianten und Kandidatengenomen. Die bioinformatische Pipeline setzt sich aus der Qualitätskontrolle der Rohdaten, Vorverarbeitung (z.B. Entfernung von Adaptoren und Linkern), Alignment an das Referenzgenom und Varianten-Detektion, -Annotation, -Filterung und -Priorisierung zusammen. Die im Folgenden beschriebenen Programme zur Prozessierung der Rohdaten wurden in der bioinformatischen *in-house*-Pipeline der Bioinformatik Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) von Herrn Malik Alawi angewendet.

Die Rohdaten einer Hochdurchsatzsequenzierung werden zu meist in einer FASTQ-Datei gespeichert. Dieses Text-basierte Dateiformat beinhaltet die Sequenz und Informationen zur Qualität eines jeden Reads, ausgedrückt in einer Phred-skalierten Kennzahl.<sup>166</sup> Das Programm Phred wurde ursprünglich beim *Human Genome Project* zur automatisierten Basenerkennung verwendet. Der Phred-Score gibt die Genauigkeit an, mit der eine Base als richtig erkannt wurde.<sup>167,168</sup> Unter Anwendung verschiedener Programme (u. a. FastQC;

<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) zur Darstellung der Qualität entlang eines Reads (Phred-Kennzahl), der Read-Länge und eventueller Kontaminationen durch Primer oder Adaptoren, werden Reads, die den Qualitätsanforderungen nicht entsprechen, aussortiert. Die Aufbereitung aller anderen Reads beinhaltet im nächsten Schritt das *in silico* Entfernen von Adaptoren und Linkern, die etwa der Immobilisierung auf einer Flusszelle während der Hochdurchsatzsequenzierung dienen. Zudem werden Basen mit geringer Phred-Kennzahl an den Enden der Reads entfernt [u. a. mittels Trimmomatic].<sup>169</sup> Anschließend erfolgt das Alignment der Read-Sequenzen an das Referenzgenom mittels Programmen wie BWA<sup>170</sup> und Bowtie2<sup>171</sup>. Hierbei werden die mittels NGS generierten Sequenzen mit dem Referenzgenom hg19 verglichen und Sequenzabweichungen von einer Base bis hin zu mehreren Basenpaaren detektiert.<sup>172</sup> Im Anschluss werden die Reads weiter prozessiert: (i) Read-Duplikate, die bei der Herstellung der *Library* entstanden sind, werden u. a. mittels Picard (v.2.8.3; <http://broadinstitute.github.io/picard>) entfernt. (ii) Indels und alle in der betreffenden Region benachbarten Reads werden zur Verbesserung der Sequenzqualität realigniert. (iii) die Phred-Kennzahlen für jede Base unter Berücksichtigung aller verbliebener Reads werden u. a. mittels HaplotypeCaller/GATK erneut berechnet.<sup>173</sup> Im nächsten Schritt werden die Abweichungen vom Referenzgenom festgestellt und mit den nötigen Annotationen in einem neuen Dateiformat zusammengestellt. Die Detektion von SNVs, Indels und strukturellen Sequenzveränderungen erfolgt mit Programmen wie z.B. GATK oder FreeBayes;<sup>174</sup> basierend auf den an einer bestimmten Stelle in der Sequenz vorliegenden Reads, wird die Wahrscheinlichkeit des Genotyps an der gegebenen Position bestimmt. Zur Annotation der Varianten wird das Programm AnnoVar verwendet.<sup>175,176</sup> In diesem Schritt werden den Varianten Informationen zugeordnet, wie z.B. der Genname, der aus der Sequenzvariante resultierende Aminosäure-Austausch und Vorhersagen zu Effekten die Funktion des kodierten Proteins betreffend. Außerdem implementiert das Programm AnnoVar Daten wie Allelfrequenzen in der Allgemeinbevölkerung (gnomAD) oder bereits zu dem Gen beschriebene Mutationsanalysen und Phänotypen aus der OMIM Datenbank (Stand Januar 2019; <https://www.omim.org/statistics/entry>). Nach Aufbereitung der Sequenzierdaten werden zwei Dateien generiert, die Informationen zum Genotyp einer oder mehrerer Personen in einer VCF; (*variant call format*) -Datei und die Varianten-Annotationen aus vorher definierten Datenbanken in einer AnnoVar-Datei enthalten.

### 3.3 Filterung von ES-Daten und Priorisierung von Kandidatengen

Das Exom einer einzelnen Person enthält zwischen 20.000 und 30.000 SNVs und Indels.<sup>172</sup> Nach Aussortieren häufiger Varianten mit einer Allelfrequenz über dem definierten Cut-Off (hereditäre Erkrankungen sind seltene Erkrankungen und somit sind häufige Varianten *a priori* nicht krankheitsrelevant) verbleiben durchschnittlich bis zu 400 Missense- und 10 bis 20 *loss-of-function*-Varianten.<sup>174</sup> Die Identifizierung von putativ krankheitsursächlichen Varianten ist bei dieser Menge an Sequenzveränderungen schwierig. Daher werden weitere gesunde und/oder betroffene Familienangehörige in die ES-Analyse einbezogen, um Varianten, die nicht mit der Erkrankung in einer Familie segregieren, auszuschließen und die Anzahl in Frage kommender, putativ pathogener Varianten weiter zu reduzieren.<sup>177</sup> Zur weiteren Filterung der Sequenz-Daten wird eine Analyse im Hinblick auf den gegebenen Erbgang einer Erkrankung durchgeführt. Neben der Filterung auf heterozygote Varianten, können die Daten aus der VCF-Datei auch auf homozygot und *compound* heterozygot vorliegende Varianten gefiltert werden. Im Anschluss werden die Daten in den meisten Fällen nach Allelfrequenzen gefiltert. Hierzu gibt es verschiedene Populationsdatenbanken. Die Auswahl der Datenbanken zur Filterung kann dabei entscheidend sein. Die am häufigsten genutzten Datenbanken sind ExAC und gnomAD. Diese enthalten die ES-Daten von 60.706 nicht verwandten Personen bzw. 123.136 Exom- und 15.496 Genom-Datensätze aus verschiedenen Sequenzierungs-Studien.<sup>178</sup> Hierzu zählen u. a. das *1000 Genomes* Projekt, das *Myocardial Infarction Genetics Consortium* sowie die *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) Studie. Die Exom- und Genom-Daten von Personen mit schweren pädiatrischen Erkrankungen wurden vorab entfernt. Die maximal zu erwartende Allelfrequenz wird für jede ES-Analyse in Hinblick auf den Erbgang und dem zeitlichen Einsetzen sowie der Schwere einer Erkrankung definiert. Bei schweren, früh manifestierenden pädiatrischen Erkrankungen werden *de novo*-Varianten als krankheitsursächlich erwartet, für die keine Anlageträger in den Datenbanken verzeichnet sind (Allelfrequenz 0%).<sup>177</sup> Anders bei spät manifestierenden, häufig erst im Erwachsenenalter auftretenden Erkrankungen: Hier ist durchaus möglich, dass für eine bestimmte Sequenzveränderung Anlageträger in den Datenbanken gnomAD oder ExAC verzeichnet sind. Daher werden für solche Erkrankungen auch Varianten mit geringen Allelfrequenzen als möglicherweise krankheitsrelevant angesehen.

Die nach der Filterung nach Allelfrequenzen verbliebenen Varianten müssen im nächsten Schritt klassifiziert werden. Auf diese Weise können potenziell krankheitsursächliche Varianten von gutartigen Varianten unterschieden werden. Um eine möglichst objektive Bewertung der Sequenzveränderung zu erzielen, werden Varianten in bekannten Krankheitsgenen nach Richtlinien *des American College of Medical Genetics and Genomics* klassifiziert.<sup>179</sup> Dieses

Klassifikationssystem teilt Varianten in fünf Kategorien ein: pathogen, wahrscheinlich pathogen, Variante mit unklarer Signifikanz, wahrscheinlich gutartig und gutartig.<sup>179</sup> Den Kriterien zur Klassifizierung nach den ACMG-Standards wird in dieser Arbeit eine hohe Bedeutung beigemessen. Daher ist das Vorgehen zur Variantenbewertung im nächsten Kapitel der Einleitung (Kapitel 3.4) noch einmal ausführlich beschrieben.

Der Vorteil von Exom-Sequenzierungen gegenüber einer Gen-Panel-Analyse liegt in der Möglichkeit, neue, bislang unbeschriebene Krankheitsgene zu identifizieren. Findet man bei einer Familie mit der Erkrankung kosegregierende auffällige Varianten (z.B. mit sehr kleiner Allelfrequenz) in mehreren Genen, so müssen diese priorisiert werden. Dies erfolgt u.a. nach verschiedenen Gesichtspunkten: (1) Wurde z.B. mittel ES eine Variante in einem Gen identifiziert, das bislang noch nicht mit einer human Erkrankung assoziiert ist, und werden mittels Sanger-Sequenzierung weitere seltene/unbekannte Varianten im gleichen Gen bei mehreren (mind. 2) Patienten mit gleichem Phänotyp aufgedeckt, so ist dieses Gen ein sehr gutes Kandidatengen für die gegebene Erkrankung.<sup>180</sup> Diese Feststellung basiert auf der Annahme, dass die Häufung von Varianten in einem bestimmten Gen bei Patienten mit dem gleichen Phänotyp nicht zufällig sein kann.<sup>181</sup> (2) Gibt es funktionelle Analysen zum jeweiligen Genprodukt, die einen Zusammenhang zwischen Sequenzveränderung, Proteinfunktion und Erkrankung aufzeigen; z.B. ist das Gen im betroffenen Gewebe exprimiert, wirkt das entsprechende Genprodukt innerhalb eines bekannten molekularen Pathomechanismus, etc. (3) Häufig werden auch statistische Modelle angewendet, die u. a. die Genlänge und natürlich vorkommende genetische Variabilität im Sequenzkontext berücksichtigen.<sup>178</sup> Aus den statistischen Berechnungen gehen Wahrscheinlichkeiten zum zufälligen Auftreten einer Variante in einem bestimmten Gen hervor; unter Berücksichtigung der Patientenanzahl innerhalb einer untersuchten Kohorte mit Varianten in dem bestimmten Gen kann so eine sogenannte genetische Bürde für ein putatives Krankheitsgen errechnet werden (i.e. *burden analysis*).<sup>181</sup>

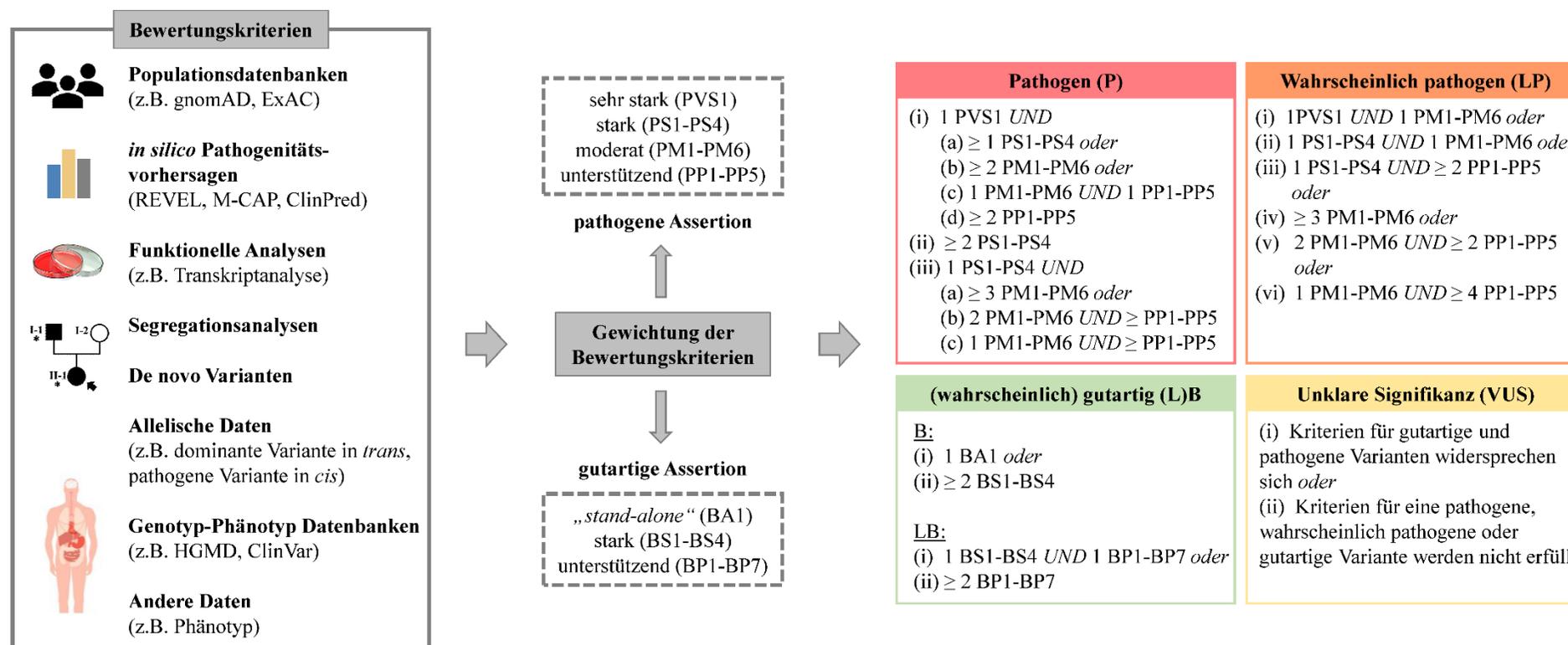
### 3.4 Klassifizierung von Varianten nach ACMG/AMP-Richtlinien

Ein Konsortium aus Repräsentanten des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), der *Association for Molecular Pathology* (AMP) und des *College of American Pathologists* erarbeitete 2013 Richtlinien zur Interpretation von Sequenzvarianten. Diesen Standards entsprechend sollen Varianten innerhalb von fünf Kategorien klassifiziert werden: (i) pathogene Variante (PV, *pathogenic variant*), (ii) wahrscheinlich pathogene Variante (LPV, *likely pathogenic variant*), (iii) Variante mit unklarer Signifikanz (VUS, *variant of uncertain*

*significance*), (iv) wahrscheinlich gutartige Varianten (LBV, *likely benign variant*) und (v) gutartige Varianten (BV, *benign variant*).<sup>179</sup>

Das Bewertungsschema gliedert sich in zwei Gruppen mit Bewertungskriterien zur Interpretation von pathogenen und wahrscheinlich pathogenen Varianten bzw. von gutartigen und wahrscheinlich gutartigen Varianten. Jedes Kriterium für pathogene Varianten wird als „sehr stark“ (PVS1; *very strong*), „stark“ (PS1-4; *strong*), „moderat“ (PM1-6; *moderate*) oder „unterstützend“ (PP1-5; *supporting*) gewichtet; jedes Kriterium für gutartige Varianten geht als „stand-alone“ (BA1), mit „starker“ (BS1-4; *strong*) oder mit „unterstützender“ (BP1-7; *supporting*) Gewichtung in die Bewertung ein (Abb. 27 im Appendix). Die Nummerierung einzelner Kriterien vermittelt keine Unterschiede in der Gewichtung.<sup>179</sup> Abb. 6 zeigt eine Übersicht der Bewertungskriterien und der Einteilung von Varianten in die fünf Klassifizierungskategorien (P, LP, VUS, LB und B). Beispielsweise wird im Bewertungsschema berücksichtigt, ob und mit welcher Allelfrequenz eine Variante in Populationsdatenbanken (z.B. ExAC, gnomAD) beschrieben ist, oder wie die *in silico* Pathogenitätsvorhersagen mittels Programmen wie REVEL, M-CAP oder ClinPred ausfallen.

Beobachtungen aus funktionellen Analysen (z.B. Transkriptanalyse) und eine ggf. familiäre Kosegregation der Variante mit der Erkrankung werden ebenfalls bei der Bewertung berücksichtigt. Zudem wird in die Klassifizierung auch miteinbezogen, ob Varianten bereits in Genotyp-Phänotyp Datenbanken wie z.B. HGMD, ClinVar, UMD-LSDB, LOVD beschrieben sind. Schließlich sind auch andere verfügbare Hinweise auf eine putative Beteiligung der Variante an der vorliegenden Erkrankung (z.B. der vorliegende Phänotyp ist spezifisch für Mutationen in diesem Gen) Teil des Bewertungsschemas. Schließlich werden für jede Variante alle anwendbaren Kriterien in einer der fünf Klassifizierungskategorien zusammengefasst (Abb. 6).



**Abb. 6: Bewertung und Klassifizierung von Sequenzvarianten nach ACMG/AMP Richtlinien.** Zur Bewertung der Pathorelevanz von Varianten werden die Allelfrequenz, *in silico* Pathogenitäts-Vorhersagen, funktionelle Analysen, Segregationsanalysen, einhergehende Varianten, Informationen aus Datenbanken zu Genotyp-Phänotyp Beziehungen und sonstige Hinweise, wie z.B. der Phänotyp des Patienten berücksichtigt. Die Bewertungskriterien werden unterschiedlich stark gewichtet. Kriterien zur Bewertung von pathogenen Varianten werden als PVS1 (sehr stark), PS1-PS4 (stark), PM1-PM6 (moderat) und PP1-PP5 (unterstützend) gewichtet. Kriterien zur Bewertung von gutartigen Varianten werden als BA1 (sehr stark), BS1-BS4 (stark) und BP1-BP7 (unterstützend) gewichtet. Zur Einordnung einer Variante in die Klasse pathogener, wahrscheinlich pathogener, (wahrscheinlich) gutartiger Varianten oder Varianten mit unklarer Signifikanz, werden die anwendbaren Bewertungskriterien in einer der fünf Kategorien (P, LP, VUS, LB, B) kombiniert.

## 4. NGS-basierte Analysen zu erblichen Aortenerkrankungen

### 4.1 Design eines NGS-Gen-Panels

Für die zielgerichtete Analyse ausgewählter Gene bei Patienten mit einer erblichen Bindegewebserkrankung und ggf. vaskulärer Beteiligung wurde ein NGS-basiertes Gen-Panel (tNGS; *targeted* NGS) entworfen. Dieses enthielt 31 Gene (*ACTA2*, *ADAMTS10*, *COL1A1*, *COL2A1*, *COL3A1*, *COL4A5*, *COL5A1*, *COL5A2*, *DCHS1*, *EFEMP2*, *ELN*, *FBN1*, *FBN2*, *FLNA*, *GATA5*, *LTBP2*, *MAT2A*, *MFAP5*, *MYH11*, *MYLK*, *NOTCH1*, *PLOD1*, *PRKG1*, *SKI*, *SLC2A10*, *SMAD3*, *SMAD4*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBR1* und *TGFBR2*), die mit HCTD und/oder TAAD assoziiert sind (Tab.1; Abb. 7; Tab. 6 im Appendix). Die genomische Region von Interesse (*Region of Interest*, ROI) umfasste insgesamt 867 Exons und 186.801 Basenpaare. In Ergänzung dazu wurde mittels ES das Gen *LOX* untersucht (7 Exons und ca. 2.000 Basenpaare).

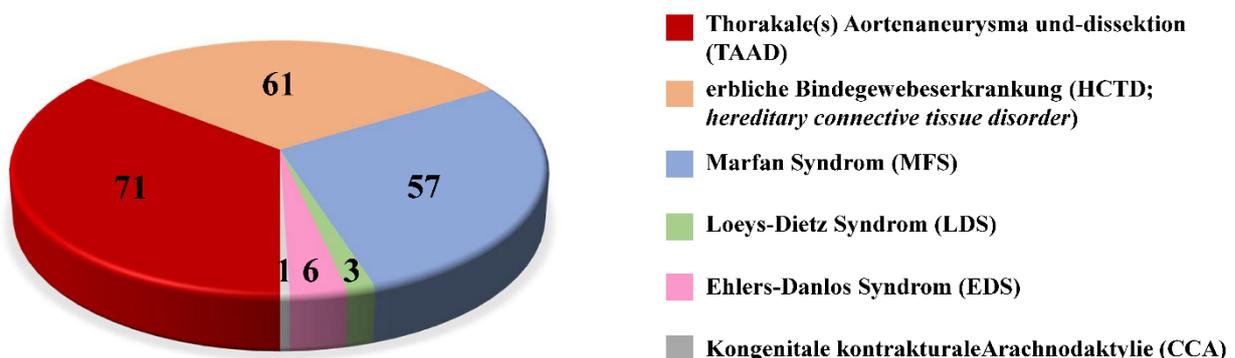
<b>definitive/<u>starke</u> Assoziation mit TAAD</b>	<b>jüngst mit TAAD assoziiert</b>
<i>ACTA2, COL3A1, FBN1, <u>LOX</u>, MYH11, MYLK, <u>PRKG1</u>, SMAD3, TGFB2, TGFBR1, TGFBR2</i>	<i>MAT2A, MFAP5, TGFB3</i>
<b><u>mäßige</u>/eingeschränkte Assoziation mit TAAD</b>	<b>Assoziation mit HCTD</b>
<i>COL4A5, <u>EFEMP2</u>, ELN, FBN2, FLNA, NOTCH1, SLC2A10, SKI, SMAD4</i>	<i>ADAMTS10, COL1A1, COL2A1, COL5A1, COL5A2, DCHS1, GATA5, LTBP2, PLOD1</i>

**Abb. 7: Mittels NGS analysierte Gene und deren Assoziation mit TAAD/HCTD.** Elf Gene weisen eine definitive oder eine starke Assoziation mit erblichen Aortenerkrankungen auf.<sup>182-184</sup> Diese Gene wurden kürzlich als klinisch hoch valide beschrieben.<sup>184</sup> Drei Gene wurden jüngst ebenfalls mit TAAD in Verbindung gebracht.<sup>182-184</sup> Eine Assoziation dieser Gene mit TAAD wurde zwar bereits durch Studien unterstützt, jedoch sind endgültige Beweise noch ausständig.<sup>184</sup> Acht weitere Gene sind mäßig oder eingeschränkt mit hereditären Aortopathien assoziiert.<sup>182-184</sup> Diese Gene wurden klinisch mit überlappenden Merkmalen zwischen TAAD und HCTD in Verbindung gebracht. Neun Gene werden mit HCTD, aber nicht mit TAAD in Verbindung gebracht. In Ergänzung zum diagnostischen Charakter dieses NGS-Gen-Panels wurden diese Gene im Rahmen eines forschungsbasierten Ansatzes analysiert.<sup>184</sup> Die Analyse von Varianten in *LOX* erfolgte mittels ES.

## 4.2 Studienkohorten für Hochdurchsatzsequenzierungen

In dieser Arbeit wurden Patienten mit Aortopathien oder einer verwandten hereditären Bindegewebserkrankung molekulargenetisch untersucht. Für alle Patienten, die zuvor sorgfältig nach standardisierten und evidenz-basierten Kriterien klinisch evaluiert wurden, lagen Einverständniserklärungen vor. Die Phänotypisierungen beruhten auf den diagnostischen Kriterien der ersten<sup>185</sup> und der revidierten Ghent Nosologie<sup>186</sup>, den Kid-SMS Parametern sowie den Empfehlungen in der *GeneReviews* Datenbank<sup>187</sup>. Die Patienten wurden im Rahmen der Marfan Sprechstunde im Universitären Herzzentrum (UHZ) und der Kinderkardiologie des UHZ sowie der Pädiatrischen Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) rekrutiert. Weitere Patienten stammten aus den folgenden Zentren in Deutschland: Klinik für Herz- und Gefäßkrankheiten am Katharinenhospital Stuttgart; Universitäres Gefäßzentrum – Bereich Angiologie und Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden; Institut für Humangenetik der Universität Ulm; Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Düsseldorf und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Kinderklinik Datteln der Universität Witten/Herdecke; Institut für Humangenetik der Universitätskliniken in Leipzig.

Die Studienkohorte für die NGS-basierte Analyse von 32 ausgewählten Genen (siehe Einleitung Kapitel 4.1) setzte sich aus 121 männlichen und 78 weiblichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 42 Jahren (SD:  $\pm 15,6$ ) zusammen. Es wurden 152 Patienten mittels tNGS-Analyse und 47 Patienten mittels ES-Analyse untersucht.



**Abb. 8: Studienkohorte für NGS-Analyse von 32 ausgewählten Genen.** Bei 199 Patienten (Durchschnittsalter 42 Jahre; SD:  $\pm 15,6$ ) wurden 32 Gene, die mit Aortopathien und/oder HCTD assoziiert sind, analysiert. Unter ihnen waren 71 Patienten mit TAAD, 61 Patienten mit HCTD, 57 Patienten mit MFS, 3 Patienten mit LDS, 6 Patienten mit EDS und 1 Patient mit CCA.

Unter ihnen waren 57 Patienten mit Verdacht auf ein MFS, 3 Patienten mit LDS, 6 Patienten mit EDS, ein Patient mit CCA, 71 Patienten mit TAAAD sowie 61 Patienten mit HCTD (Abb. 8). Bei 16 Patienten wurden zusätzliche kardiovaskuläre Abnormalitäten, wie bikuspidale Aortenklappen (3 Patienten), Mitralklappenprolaps (5 Patienten), Aneurysmen der abdominalen Aorta (2 Patienten), Aneurysmen oder Dissektionen der Carotiden (4 Patienten) und intrakranielle Aneurysmen sowie subarachnoide Blutungen (2 Patienten) diagnostiziert. Bei etwa der Hälfte der Patienten (45,7%) wurde bereits ein operativer Eingriff durchgeführt oder ist in Planung. Für 88 Patienten (44,2%) wurden bei Familienangehörigen ersten oder zweiten Grades TAAAD/HCTD-spezifische Auffälligkeiten dokumentiert. 72 Patienten berichten (36,2%) zum Zeitpunkt der genetischen Analysen von einer negativen Familienanamnese. Bei 19,6% der Patienten lagen keine Informationen bezüglich der Familienhistorie vor.

Zur Identifizierung neuer Krankheitsgene wurden in dieser Arbeit 8 Indexpatienten und ihre Familienangehörige mittels ES analysiert. Bei diesen Patienten mit syndromaler oder nicht-syndromaler HCTD/TAAAD wurde bisher keine krankheitsursächliche Variante in einem der bekannten Krankheitsgene identifiziert. Im Folgenden sind die klinischen Kennzeichen der Indexpatienten sowie erkrankter Familienangehöriger und die im Vorfeld durchgeführten genetischen Analysen beschrieben (Abb. 9).

Der Indexpatient der Familie #1 erlitt eine Dissektion der *Aorta ascendens*, des Aortenbulbus sowie der *Aorta descendens*. Er zeigte zudem einen Hypertelorismus, einen hohen Gaumen, Plattfüße und Charakteristika einer starken Myopie. Es wurde der Verdacht auf ein Marfan Syndrom geäußert. Mittels Sanger-Sequenzierung wurde keine pathogene Sequenzvariante in den Genen *FBNI*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *TGFB2*, *COL3A1*, *ACTA2*, *MYH11*, *NOTCH1*, *SMAD3* und *SLC2A10* identifiziert. Ein Bruder des Indexpatienten ist im Alter von 39 Jahren an einem Aortenaneurysma verstorben. Bei einem weiteren Bruder wurden Aneurysma der *Aorta descendens* sowie der Carotiden festgestellt. Dessen Sohn (Neffe des Indexpatienten) wies eine geringe Ektasie des Aortenbulbus und ein positives Daumen-Unterarm- sowie ein positives Daumen-Handgelenkszeichen auf. Die Nichte des Indexpatienten hatte eine Skoliose, eine Myopie und positive Daumen-Unterarm- sowie Daumen-Handgelenkszeichen, jedoch keine Auffälligkeiten an der Aorta. Drei Kinder des Indexpatienten wiesen eine grenzwertige Duraektasie auf; die Verdachtsdiagnose eines familiären Marfan Syndroms war bei ihnen nicht gesichert (Abb. 9A).

Die Klinik des Indexpatienten der Familie #2 war durch eine bikuspidale Aortenklappe mit mittelgradiger Aortenklappeninsuffizienz, eine Ektasie der *Aorta ascendens*, eine Dilatation des

Aortenbogens, sowie kraniofaziale Dismorphien und eine Duraektasie gekennzeichnet. Ein klappentragendes Konduit wurde operativ angelegt. Die Verdachtsdiagnose lautete bikuspides Aortenklappen-Syndrom, die Differenzialdiagnose Loeys-Dietz-Syndrom. Molekulargenetische Analysen der Gene *FBN1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *TGFB2*, *ACTA2* und *NOTCH1* deckten keine pathogene Variante auf. Der Sohn des Indexpatienten erhielt einen Klappenersatz im Bereich der Aortenwurzel im Rahmen einer Bentall-Operation. Er zeigt zudem einen Hypertelorismus, eine leichte Mikrogenie, eine rechtskonvexe thorakale Skoliose, Mehrfachfrakturen der Kniescheibe sowie eine Myopie und Astigmatismus. Sein Vater wies ebenfalls phänotypische Merkmale aus dem Spektrum hereditärer Aortopathien auf. Ein Bruder des Indexpatienten berichtete von skelettalen Auffälligkeiten und einer leichtgradigen Erweiterung des Aortenbulbus (Abb. 9B).

Der Indexpatient aus der Familie #3 wies eine Dilatation der *Aorta ascendens*, einschließlich des Aortenbulbus, einen Mitralklappenprolaps mit Mitralklappeninsuffizienz, eine Dilatation der Pulmonalarterie, eine Uvulahypoplasie, positives Daumen-Handgelenkszeichen, Plattfüße, kraniofaziale Dismorphien und einen hohen gotischen Gaumen auf. Es wurde die Verdachtsdiagnose Marfan Syndrom geäußert. Der Patient wies keine pathogenen Mutationen in *FBN1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *TGFB2*, *COL3A1*, *ACTA2*, *MYH11*, *NOTCH1*, *SMAD3* und *SLC2A10* auf. Zwei Brüder des Indexpatienten zeigten ebenfalls Auffälligkeiten spezifisch für MFS: Der jüngere Bruder hatte einen dilatierten Aortenbulbus sowie skelettale Auffälligkeiten. Der ältere Bruder wies Plattfüße, ein positives Daumen- und Handgelenkszeichen, überbewegliche Gelenke, einen hohen gotischen Gaumen, kraniofaziale Dismorphie mit Retrognathie sowie lateral abfallende Lidachsen auf. Der Neffe des Indexpatienten (Sohn des älteren Bruders) präsentierte sich mit einer Duraektasie (Abb. 9C).

Die Indexpatientin der Familie #4 hatte eine Dilatation der *Aorta ascendens*, eine Aortenklappeninsuffizienz sowie einen Mitralklappenprolaps. Des Weiteren wurden bei ihr rezidivierende Spontan-Pneumothoraxe, eine Duraektasie, hoher gotischer Gaumen, Retrognathie, Skoliose, Überstreckbarkeit der Gelenke, Plattfüße und ein positives Daumen-Handgelenkszeichen dokumentiert. Es wurde der Verdacht auf Marfan Syndrom geäußert. Sanger-Sequenzierungen der Gene *FBN1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *ACTA2* und *MYH11* deckten keine pathogene Sequenzveränderungen auf. Die Tochter der Indexpatientin wies einen hohen Gaumen, Hyperopie und eine Duraektasie auf. Ihr Sohn hatte einen dilatierten Aortenbulbus, Hyperopie, eine Duraektasie und berichtete von fehlender körperlicher Belastbarkeit. Die Mutter der Indexpatientin hatte eine Duraektasie, eine Doppelniere und war schwerhörig (Abb. 9D).

Die Indexpatientin der Familie #5 weist Anzeichen einer Bindegewebsschwäche auf. Bei ihr wurden hypermobile Gelenke, eine elastische Haut, Ganzkörperschmerzen, Taubheitsgefühle

sowie Dissektionen der Carotiden und der *Aorta vertebralis* diagnostiziert. Molekulargenetische Analysen deckten keine pathogene Variante in den folgenden Genen auf: *ABCC6*, *ACTA2*, *ADAMTS2*, *ALDH18A1*, *ATP6V0A2*, *ATP7A*, *B3GALT6*, *B4GALT7*, *CHST14*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *DSE*, *EFEMP2*, *ELN*, *FBLN5*, *FBN1*, *FBN2*, *FKBP14*, *GORAB*, *LTBP4*, *MAT2A*, *MFAP5*, *MYH11*, *MYLK*, *PLOD1*, *PLOD3*, *PRDM5*, *PRKG1*, *PYCR1*, *RIN2*, *SKI*, *SLC2A10*, *SLC39A13*, *SMAD3*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBRI*, *TGFBRII*, *TNXB*, *ZNF469*. Die Mutter und Großmutter mütterlicherseits sollen nach Angaben der Indexpatientin ähnliche Symptome gehabt haben. Bei ihrer Großtante mütterlicherseits wurde Morbus Boeck diagnostiziert; sie ist verstorben. Die zwei Töchter der Indexpatientin wiesen keine klinischen Anzeichen für eine hereditäre Bindegewebserkrankung auf (Abb. 9E).

Für den Indexpatienten der Familie #6 wurde die Verdachtsdiagnose familiäres thorakales Aortensyndrom (TAAD) gestellt. Es wurde keine pathogene Mutation in den Genen *ACTA2*, *FBN1*, *MYH11*, *MYLK*, *NOTCH1*, *SLC2A10*, *SMAD3* und *TGFB2* identifiziert. Die zwei Söhne des Indexpatienten wiesen ebenfalls Auffälligkeiten eines Aortensyndroms auf (Abb. 9F).

Der Vater der Indexpatientin der Familie #7 erlitt eine Aortendissektion und zeigte klinische Merkmale eines Marfan Syndroms. Bei ihm wurde keine molekulargenetische Diagnostik zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose durchgeführt. Seine Tochter wies ebenfalls einen auffälligen marfanoiden Phänotyp auf. Im Alter von 22 Jahren wurde bei ihr keine Erkrankung an der Aorta festgestellt. Es wurde der Verdacht auf ein familiäres Marfan Syndrom geäußert. Bei der Indexpatientin wurde keine pathogene Variante in den Genen *FBN1*, *TGFBRI*, *TGFBRII*, *TGFB2* und *ACTA2* identifiziert (Abb. 9G).

Indexpatient der Familie #8 zeigte eine Dilatation des Aortenbulbus sowie der *Aorta ascendens* mit leichtgradiger Aortenklappeninsuffizienz; weitere bei ihm festgestellte klinische Auffälligkeiten waren eine dilatative Kardiomyopathie mit leichtgradig eingeschränkter linksventrikulärer Funktion, ein Missverhältnis der Armspanne zur Körpergröße, eine leichtgradige Trichterbrust, einen hohen gotischen Gaumen, Plattfüße und rezidivierende Leistenbrüche. Es wurde die Verdachtsdiagnose Marfan Syndrom geäußert. Molekulargenetische Analysen deckten keine pathogene Variante in den Genen *FBN1*, *TGFBRI*, *TGFBRII*, *TGFB2* und *ACTA2* auf. Der Bruder des Indexpatienten ist perioperativ nach einer Aortendissektion im Alter von 51 Jahren verstorben. Der Sohn ist hochgewachsen und hatte einen Spontanpneumothorax, ventrikuläre Extrasystolie, Anzeichen einer Myopie, einen hohen Gaumen sowie Senkspreizfüße (Abb. 9H).

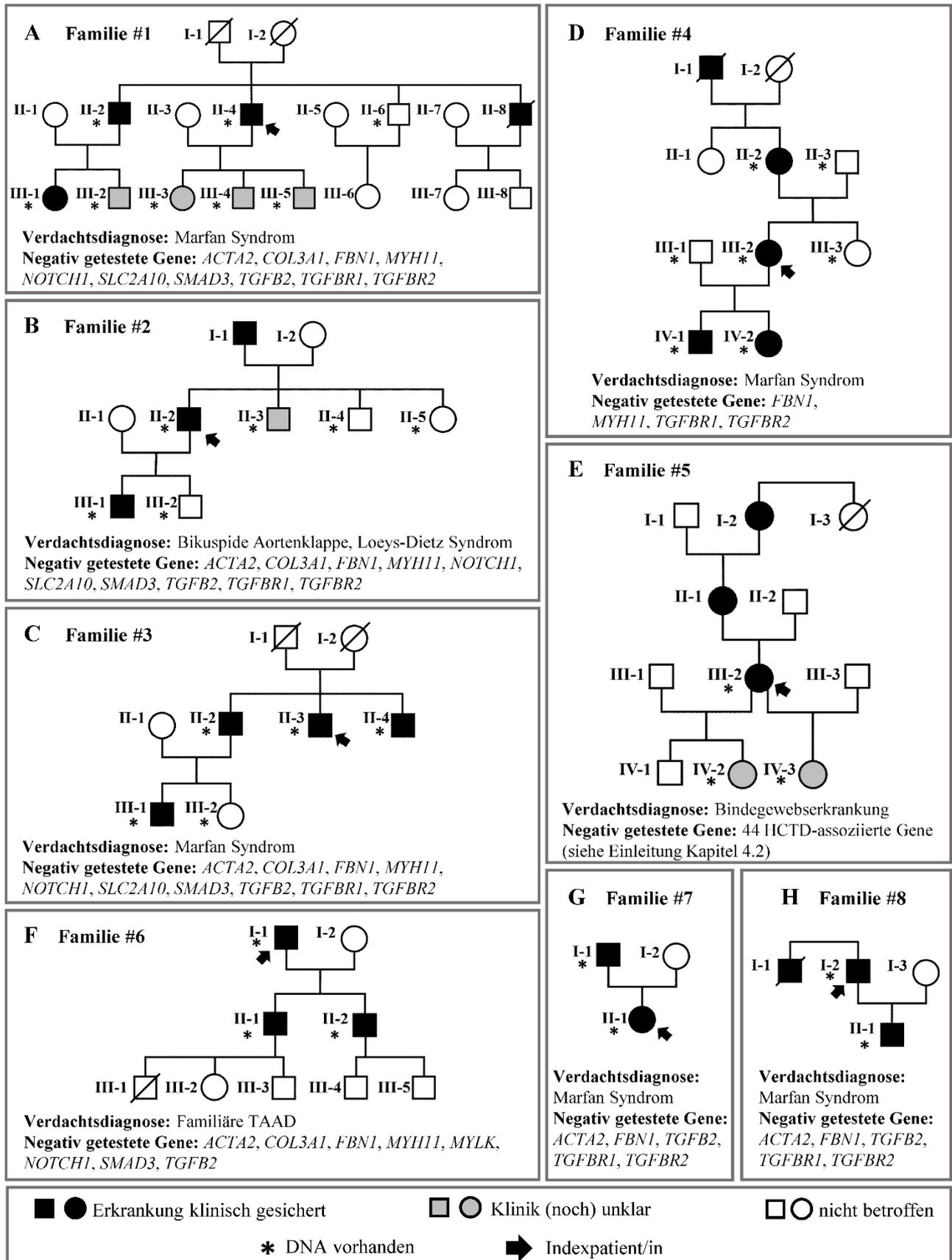


Abb. 9: Stammbäume der mittels ES analysierten Familien #1 bis #8 (A-H). Die Indexpatienten sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

## IV. Ziele der Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Doktorarbeit war die Identifizierung der genetischen Ursache für erbliche Aortenerkrankungen und ähnliche Erkrankungen des Bindegewebes bei 199 Patienten. Der Großteil der Patienten war von einer syndromalen Erkrankung mit kardiovaskulärer Beteiligung betroffen, für die bislang keine genetische Ursache aufgedeckt werden konnte. Eine erweiterte molekulargenetische Analyse sollte Aufschluss darüber bringen, ob bei diesen Patienten krankheitsrelevante Varianten in einem Genen liegen, welche noch nicht oder zum jetzigen Zeitpunkt nur andeutungsweise mit Aortopathien bzw. Bindegewebserkrankungen assoziiert wurden. Zu diesem Zwecke wurden zwei NGS-basierte Methodiken, die zielgerichtete Gen-Panel-Diagnostik (tNGS) und die Exom-Sequenzierung (ES), verwendet.

Die einzelnen Zielsetzungen waren:

- (i) Die Identifizierung von krankheitsursächlichen Varianten bei Patienten mit einer erblichen Aortopathie oder einer assoziierten Bindegewebserkrankung durch Auswertung eines NGS-basierten Gen-Panels mit 32 Genen, die mit TAAD und/oder HCTD assoziiert sind.
- (ii) Die Verfeinerung der klinischen und genotypischen Daten bei Patienten mit Aortopathien aufgrund von Identifizierung von Varianten in bekannten Krankheitsgenen bzw. Kandidatengenen.
- (iii) Die Bestimmung neuer Kandidatengene für erbliche Aortenerkrankungen bei 8 Patienten und ihren Familienangehörigen durch Auswertung von ES-Datensätzen.
- (iv) Die Bestätigung der Pathogenität von identifizierten Varianten durch biochemische und zellbiologische Untersuchungen an geeigneten Zell- und/oder *in vitro*-Modellen mit speziellem Fokus auf Varianten im *CDKLI*-Gen, eines im Vorfeld an diese Arbeit definierten neuen putativen Krankheitsgens. Diese Analysen sollen auch der Aufklärung der zugrundeliegenden Pathomechanismen bei erblichen Erkrankungen des Bindegewebes mit kardiovaskulärer Beteiligung dienen.

## V. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Material für molekularbiologische Methoden

Ultra Pure™ Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
1 kB DNA Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
OneTaq®QuickLoad® 2xMM w/Std Buffer	NEB (Ipswich, USA)
pENTR Directional TOPO® Cloning Kits	Invitrogen (Karlsruhe)
In Fusion HD® Cloning Kit	Takara Bio (CA, USA)
Gateway® LR Clonase Enzym Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
FastDigest Restriktionsendonukleasen	Invitrogen (Karlsruhe)
Fast Digest Buffer 10x green	Invitrogen (Karlsruhe)
BSA 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinase K	Invitrogen (Karlsruhe)
QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit	Agilent (Santa Clara, CA)
PfuUltra™ HF DNA Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
10x PfuUltra™ HF DNA Polymerase Buffer	Agilent (Santa Clara, CA)
Taq Poymerase	PeqLab (Darmstadt)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit	Genomed (Löhne)
PAXgene® Blood RNA Kit 50, v2	PreAnalytiX
SuperScript IV Reverse Transkriptase Systems	Invitrogen (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
Kanamycinsulfat	Fluka (Steinheim)
Midori Green Advanced DNA Stain	NIPPON Gen. EU (Düren)
Orange-G	Sigma (Taufkirchen)
Select Agar	Gibco
Exonuklease I	GE Healthcare (Chicago)
FastAP™Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Invitrogen (Karlsruhe)
ABI BigDye Terminator Sequencing Kit v.1.1	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTPs	Invitrogen (Karlsruhe)
Hi-Di™ Formamid	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA-Isolierungs Kit aus Blut	Quiagen (Hilden)
TruSight™ Rapid Capture Kit	Illumina, (San Diego, CA)
MiSeq Reagent Kit v.2	Illumina, (San Diego, CA)
SureSelectXT Human All Exon V6	Agilent (Santa Clara, CA)
Nextera Exome Enrichment Kit	Illumina, (San Diego, CA)
SureSElectXT Automated target Enrichment	Agilent (Santa Clara, CA)
MLPA Kit P065, P066, P148, P155	MRC Holland <sup>188</sup>

## 1.2 Material für proteinbiochemische Arbeitstechniken

### Protease-Inhibitoren und Detergentien:

Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
Complete Mini PhosSTOP Tabletten	Roche (Mannheim)
Nonident P40 / Igepal	ICN (Eschwege)
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma (Taufkirchen)
Triton X-100	Sigma (Taufkirchen)

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) / Western-Blotting

Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma (Taufkirchen)
Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA, 30%/0,8%)	Biorad (München)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (Taufkirchen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Dithiothreitol (DTT), 1M	Invitrogen (Karlsruhe)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
Precision Plus Protein™ Unstained Standard	Biorad (München)
PVDF Western Blotting Membran	Roche (Mannheim)
Magermilchpulver für Western-Blotting	Karl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Sigma (Taufkirchen)
Whatman-3MM-Chromatographie-Papier	Whatman (Kent, England)
Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gels	Biorad (München)
Trans-Blot® Turbo™ Midi-Size Transfer Stacks	Biorad (München)
Trans-Blot® Turbo™ Midi-Size LF PVDF Membrane	Biorad (München)
Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfer Buffer	Biorad (München)

### Detektion der Antikörper-Reaktion beim Immunnachweis:

ECL™ Western Blotting Detection Reagenzien	Amersham Biosci. (Freiburg)
Hyperfilm ECL Röntgenfilme	Amersham Biosci. (Freiburg)

### Präzipitationen und Cleavage Experimente:

GFP-Trap® Beads	ChromoTek (Planegg)
Anti-HA Magnetic Beads	Invitrogen (Karlsruhe)
<u>PamGene® Technologie</u>	
Rekombinantes CDKL1 Protein	SignalChem
Rekombinantes CDKL5 Protein	SignalChem

## 1.3 Materialien für zellbiologische Methoden

### Zellkultur:

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Karlsruhe)
Fötales Rinderserum (FBS)	Sigma (Taufkirchen)
10.000 U/mL Penicillin & 10.000 µg/mL Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
TrypLE™ Express	Gibco (Karlsruhe)
Hygromycin B	Invitrogen (Karlsruhe)
Thymidin	Sigma (Taufkirchen)

Transfektion:

TurboFect Transfection Reagent

Invitrogen (Karlsruhe)

Neon<sup>®</sup> Transfection System

Invitrogen (Karlsruhe)

Immunfluoreszenzfärbungen:

Ziegen-Serum

Sigma (Taufkirchen)

Paraformaldehyd

Sigma (Taufkirchen)

Albumin aus Rinderserum

Sigma (Taufkirchen)

AccuCheck Counting Beads

Invitrogen (Karlsruhe)

ADP-Glo<sup>™</sup> Kinase Assay

Promega (Mannheim)

**1.4 Sonstige Chemikalien**

Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)

Merck (Darmstadt)

TRIZMA<sup>®</sup> BASE<sup>189</sup>

Sigma (Taufkirchen)

Glycin

Carl Roth (Karlsruhe)

Hefeextrakt

Invitrogen (Karlsruhe)

Bacto Tryptone

BD Pharmingen (Heidelberg)

Natriumchlorid (NaCl)

Baker (Deventer, NL)

Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)

Merck (Darmstadt)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Merck (Darmstadt)

di-Kaliumhydrogenphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Merck (Darmstadt)

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)

Sigma (Taufkirchen)

Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>)

Sigma (Taufkirchen)

Ethanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)

Merck (Darmstadt)

Methanol (CH<sub>3</sub>OH)

Merck (Darmstadt)

Isopropanol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>)

Merck (Darmstadt)

Salzsäure (HCl)

Merck (Darmstadt)

Kaliumchlorid (KCl)

Sigma (Taufkirchen)

Kaliumhydroxid (KOH)

Sigma (Taufkirchen)

Natriumhydroxid (NaOH)

Sigma (Taufkirchen)

Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Hybri-Max<sup>®</sup>

Sigma (Taufkirchen)

Manganchlorid (MnCl<sub>2</sub>)

Sigma (Taufkirchen)

Robidiumchlorid (RbCl)

Sigma (Taufkirchen)

Glucose

Sigma (Taufkirchen)

Kaliumacetat (KAc)

Carl Roth (Karlsruhe)

Eisessig

Schuchart (Hohenbrunn)

Glycerin

Carl Roth (Karlsruhe)

Phosphorsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

Merck (Darmstadt)

Formaldehyd-Lösung

Sigma (Taufkirchen)

## 1.5 Bakterienstämme und Zelllinien

	Name	Genotyp bzw. Eigenschaften	Herkunft
<b>Bakterienstämme</b>	DH10B	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ <sup>-</sup> rpsL(StrR) nupG	Invitrogen (Karlsruhe)
	BL21	F <sup>-</sup> ompT hsdSB (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)	Invitrogen (Karlsruhe)
	TOP10	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ <sup>-</sup> rpsL(StrR) endA1 nupG	Invitrogen (Karlsruhe)
	Stellar <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> , endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA -argF) U169, Δ (mrr -hsdRMS -mcrBC), ΔmcrA, λ <sup>-</sup>	Takara Bio Inc. (CA, USA)
<b>Zelllinien</b>	HEK293T	Humane embryonale Zellen aus der Niere, adhären, epitheliale Morphologie, Derivat der HEK293 Zelllinie, SV40 T-Antigen	ATCC (Manassas, USA)
	HeLa	Humane adulte Zervix-Zellen, adhären, epitheliale Morphologie	ATCC (Manassas, USA)

## 1.6 Plasmide

### 1.6.1 Ausgangsvektoren für Klonierungen

	Name	Eigenschaften	Herkunft	Referenz
<b>Expression in Eukaryoten</b>	pMT2sm-HA	Amp <sup>r</sup> , HA-Epitop	Reza M. Ahmadian (Dortmund)	Kaufman et al., 1987
	pEGFP-C1	Km <sup>r</sup> , EGFP-Epitop	Takara Bio Inc. (Mountain View, CA)	
	pEGFP-TEV	Km <sup>r</sup> , EGFP-Epitop, TEV-Epitope	dieser Arbeit	
	pIRESHyg3	Amp <sup>r</sup> , HygB <sup>r</sup> Internal ribosome entry site (IRES) aus ECMV	Clontech Laboratories Inc., Takara Bio Inc. (Mountain View, CA)	
	pCMV5B-HA-SMAD2	Amp <sup>r</sup> , HA-Epitope	Jeff Wrana (Toronto, Kanada); Kommerziell erworben bei Addgene	Eppert et al., 1996

	Name	Eigenschaften	Herkunft	Referenz
Expression in Eukaryoten	pCMV5B-FLAG-SMAD3	Amp <sup>r</sup> , FLAG-Epitope	Jeff Wrana (Toronto, Kanada); Kommerziell erworben bei Addgene	Labbe et al., 1998
	pCS2+	Amp <sup>r</sup> , SP6 Promotor ( <i>in vitro</i> RNA-Synthese)	Melanie Philipp (Ulm)	
Gateway™-Vektoren	pENTR™/D-TOPO®	Km <sup>r</sup> , ccdB	Invitrogen (Karlsruhe)	
	pFLAG-CMV4-DEST™	Amp <sup>r</sup> , FLAG-Epitope	Georg Rosenberger (Hamburg)	
	pMT2sm-HA-DEST™	Amp <sup>r</sup> , HA-Epitope	Georg Rosenberger (Hamburg)	
	pCR4-TOPO®-CDKL1		Kommerziell erworben bei Addgene	

## 1.6.2 Hergestellte Konstrukte

### Konstrukte für die eukaryotische Expression

Konstrukt	Oligonukleotide	Template	Methodik
pMT2sm-HA-CDKL1	CDKL1-pMT2sm-HA-SalI-F CDKL1-pMT2sm-HA-SalI-R	pCR4-TOPO®-CDKL1	In-Fusion®
pEGFP-C1-CDKL1	InFu_CDKL1_pEGFP-C1_BglII_F InFu_CDKL1_pEGFP-C1_SalI_R	pMT2sm-HA-CDKL1	In-Fusion®
pEGFP-TEV	TEV_For TEV_Rev QC_pEGFP-TEV-C1-GATC_For QC_pEGFP-TEV-C1-GATC_Rev	pEGFP-C1	In-Fusion®, Quik Change
pEGFP-TEV-C1-CDKL1	InFu_CDKL1_pEGFP-TEV_BglII_F InFu_CDKL1_pEGFP-C1_SalI_R	pEGFP-C1-CDKL1	In-Fusion®
pIRESHyg3-HA-CDKL1	NheI-HA-For CDKL1-EcoRV-Rev	pMT2sm-HA-CDKL1	Rekombination (Endonukleasen)

### Konstrukte für die Expression in Zebrafärblingen

Konstrukt	Oligonukleotide	Template	Methodik
pCS2+	EcoRI-HA-For CDKL1-XhoI-Rev	pMT2sm-HA-CDKL1	Restriktion & Ligation

*Im Rahmen der Vorarbeiten zu dieser Arbeit mittels Gateway®-Technologie hergestellte Konstrukte für die eukaryotische Expression*

	<b>Konstrukt</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>Template</b>	<b>Methodik</b>
<b>Eingangs-Konstrukt</b>	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO®-SMAD2	SMAD2-pEDT-F2 SMAD2-pEDT-R	pCMV5B-HA-SMAD2	Topoisomerase Reaktion
	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO®-SMAD3	SMAD3-pEDT-F SMAD3-pEDT-R	pCMV5B-FLAG-SMAD3	Topoisomerase Reaktion
<b>Zielkonstrukte</b>	pFLAG-CM4-DEST <sup>TM</sup> -SMAD2			Rekombination aus pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO®-SMAD2
	pFLAG-CM4-DEST <sup>TM</sup> -SMAD3			Rekombination aus pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO®-SMAD3
	pMT2sm-HA-DEST <sup>TM</sup> -SMAD2			Rekombination aus pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO®-SMAD2
	pMT2sm-HA-DEST <sup>TM</sup> -SMAD3			Rekombination aus pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO®-SMAD3

## 1.7 Oligonukleotide

### 1.7.1 Oligonukleotide für Klonierungen

#### Oligonukleotidname

#### Oligonukleotidsequenz

CDKL1-pMT2sm-HA-SalI-F	5'-CAGATTACGCGTCGACTATGATGGAGAAGTATGAAAAAATTGG-3'
CDKL1-pMT2sm-HA-SalI-R	5'-GGCCGCCCGGGTTCGATTAAATGTTTGGAAAACGGTAGTTAAG-3'
InFu_CDKL1_pEGFP-C1_BglII_F	5'-GTCCGGACTCAGATCTATGGAGAAGTATGAAAAAATTGGGA-3'
InFu_CDKL1_pEGFP-C1_SalI_R	5'-CCGCGGTACCGTCGACTTAAATGTTTGGAAAACGGTAGTT-3'
TEV_For	5'-CCGGGAGCTCCGAGAACCTGTATTTCCAGGGTAGCTCCTCCGGA-3'
TEV_Rev	5'-GATCTTCCGGAGGAGCTACCCTGGAAATACAGTTTCTCGGAGCTC-3'
QC_pEGFP-TEV-C1_GATC-For	5'-CTCCTCCGGAAGATCTCGAGCTCAAGCTTC-3'
QC_pEGFP-TEV-C1_GATC-Rev	5'-GAAGCTTGAGCTCGAGATCTTCCGGAGGAG-3'
InFu_CDKL1_pEGFP-TEV_BglII_F	5'-CTCCTCCGGAAGATCTATGATGGAGAAGTATGAAAAAATTG-3'
NheI-HA-For	5'-GCTAGCATGGCTTACCCATACGATGTT-3'
CDKL1-EcoRV-Rev	5'-GATATCTTAAATGTTTGGAAAACGGTAGTTAAGTTTC-3'
EcoRI-HA-For	5'-CCGGAATTCATGGCTTACCCATACGATGTT-3'
CDKL1-XhoI-Rev	5'-CTCGAGTTAAATGTTTGGAAAACGGTAGTTAAGTTTC-3'
SMAD2-pEDT-F2	5'-CACCATGTCGTCCATCTTGCCATTCACGCCGCCAG-3'
SMAD2-pEDT-R	5'-TTATGACATGCTTGAGCAACGCACTGAAGG-3'
SMAD3-pEDT-F	5'-CACCATGTCGTCCATCCTGCCTTCACTCCC-3'
SMAD3-pEDT-R	5'-CTAAGACACACTGGAACAGCGGATGCTTGG-3'

cDNA-T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7-Klone-M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

### 1.7.2 Oligonukleotide für QuikChange® II Site Directed Mutagenesis

Oligonukleotidname	Oligonukleotidsequenz
CDKL1_T430C_C144R_F	5'-AACATTCCGTGATTAAGCTTCGTGACTTTGGATTTGCTCG-3'
CDKL1_T430C_C144R_R	5'-CGAGCAAATCCAAAGTCACGAAGCTTAATCACGGAATGTT-3'
CDKL1_C620T_S207L_F	5'-CCTCTGTGGCCAGGAAAATTGGAGTGGATCAGC-3'
CDKL1_C620T_S207L_R	5'-GCTGATCCACTCCAATTTTCCTGGCCACAGAGG-3'
CDKL1_D208K_F	5'-GTGGCCAGGAAAAATCGAAGGTGGATCAGCTGTATC-3'
CDKL1_D208K_R	5'-GATACAGCTGATCCACCTTCGATTTTTCTGGCCAC-3'
CDKL1_A101G_K34R_F	5'-GTCAGATTGTGGCCATCAGGAAGTTTCTGGAATCAGA-3'
CDKL1_A101G_K34R_R	5'-TCTGATTCCAGAACTTCCTGATGGCCACAATCTGAC-3'
CDKL1_C407T_T136M_F	5'-GCTTAATCACGGAATGTTTCATGATGAGGATATTTCTGGC-3'
CDKL1_C407T_T136M_R	5'-GCCAGAAAATATCCTCATCATGAAACATTCCGTGATTAAGC-3'

### 1.7.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Oligonukleotidname	Oligonukleotidsequenz
pMT2sm-HA-For	5'-GATCTGGCCATACACTTGAGTG-3'
CDKL1_cDNA_seq_1F	5'-CAAATGTAGAAACAGGGACAC-3'
CDKL1_cDNA_seq_1R	5'-GGATGCTTGAGTTGCTTGAGC-3'
CDKL1_cDNA_seq_2F	5'-GAAACATTCCGTGATTAAGC-3'
CDKL1_cDNA_seq_3F	5'-GCTCCTAAAGGGCTGTCTCC-3'
pEGFP-C1_seq_For	5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'
pEGFP-C1_seq_Rev	5'-CTCTACAAATGTGGTATGGCTG-3'
pIREShyg3_seq_1F	5'-GACGGATCGGGAGATCTCCCGATC-3'
pIREShyg3_seq_1R	5'-TTGAGAGGGAGTACTCACCCCAAC-3'
pIREShyg3_seq_2F	5'-CGATGTAGGAGGGCGTGGATATGT-3'
pIREShyg3_seq_3F	5'-GCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG-3'
pCS2+_seq_For	5'-CGCCATTCTGCCTGGGGACGTCGG-3'
pCS2+_seq_Rev	5'-GTTCCCTAAACGAGCATTGCTTAT-3'
SMAD2_cDNA_seq_1F	5'-TGTTACCATACCAAGCACTTGC-3'
SMAD2_cDNA_seq_1R	5'-GAGACGACCATCAAGAGACC-3'
SMAD2_cDNA_seq_2F	5'-CCAGAAAACACTAACTTCCCAG-3'
SMAD2_cDNA_seq_3F	5'-GCTTATACTACATAGGTGGGA-3'
SMAD3_cDNA_seq_1F	5'-GCTGGAGAAGGCCATCACC-3'
SMAD3_cDNA_seq_1R	5'-CTACTCTCTGGTAGTGGTAG-3'
SMAD3_cDNA_seq_2F	5'-GGCTACCTGAGTGAAGATGG-3'
SMAD3_cDNA_seq_3F	5'-CAGAGTGCCTCAGTGACAGC-3'

## 1.8 Antikörper

(WB, Western Blot; ICH, Immunhistochemie)

	Antikörper	Antigen	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>	Anti-EGFP	EGFP	Maus	WB 1:5000	Sigma
	Anti-CDKL1 (polyklonal)	Humanes CDKL1, C-Terminus (Aminosäuren 285-316)	Kaninchen	WB 1:1000 IHC 1:50	Invitrogen
	Anti-CDK2 (E304)	Humanes CDK2, C-Terminus	Kaninchen	WB 1:1000	Abcam
	Anti-p21 Waf1/Cip1 (12D1)	Humanes p21, C-Terminus	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling
	Anti-Calponin1	Humanes Calponin 1, (Aminosäuren 2-297)	Maus	IHC 1:200	R&D Systems
	Anti-Actin Smooth Muscle (1A4 (asm-1))	$\alpha$ -smooth muscle Aktin, 10 Aminosäuren des N-Terminus	Maus	IHC 1:400	Invitrogen
	Anti-CD34 (ICO115)	Blasten (Vorläuferzellen weißer Blutkörperchen) von CML Patienten	Maus	IHC 1:100	Santa Cruz Biotech., Inc.
	Anti-STRO1	Humane CD34+ Zellen des Knochenmarks	Maus	IHC 1:50	Invitrogen

	Antikörper	Antigen	Konjugat	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
<b>Sekundärantikörper</b>	Anti-HA-HRP, High Affinity (3F10)	Humanes Hämagglutinin	HRP	Ratte	WB 1:10.000	Roche (Mannheim)
	Anti-mouse IgG F(ab') <sub>2</sub> -HRP	IgG F(ab') <sub>2</sub> aus Schaf	HRP	Schaf	WB 1:10.000	Amersham
	Anti-rabbit IgG-HRP	IgG aus Kaninchen	HRP	Maus	WB 1:10.000	Dianova
	Anti-rabbit IgG-DyLight800	IgG aus Kaninchen	DyLight 800	Schaf	WB 1:10.000	BioRad

## 2. Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Anzucht von E.coli

Zur Anzucht von *Escherichia coli* (E.coli) wurde LB-Medium verwendet, welchem gegebenenfalls zur Selektion auf plasmidhaltige Kolonien ein Antibiotikum hinzugefügt wurde. In dieser Arbeit wurden 0,025% (w/v) Ampicillin und 0,0025% (w/v) Kanamycinsulfat zur Selektion verwendet. Für die Zellanzucht in einer Flüssigkultur wurde das Kulturmedium mit 1/100 Volumen der entsprechenden Stammkultur oder mit einer auf Festmedium gezüchteten Einzelkolonie angeimpft. Das Zellwachstum erfolgte über Nacht bei 37 °C und 200 Upm in einem Schüttelinkubator.

Die Anzucht von Einzelkolonien erfolgte auf Agarplatten. Dem LB-Medium wurde hierfür Select Agar (Gibco) hinzugefügt und, nach dem Autoklavieren und Hinzufügen eines Antibiotikums, in sterile Petrischalen gegossen. Ein Aliquot der Bakteriensuspension wurde im Anschluss vollständig oder teilweise auf eine Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

*LB-Medium:* 1% (w/v) Bacto Tryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 170 mM NaCl; pH 7,0

*Ampicillin-Stammlösung:* 25% (w/v) in ddH<sub>2</sub>O

*Kanamycinsulfat-Stammlösung:* 2,5% (w/v) in ddH<sub>2</sub>O

*LB-Agar:* 1% (w/v) Bacto Tryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 170 mM NaCl, 1,5% (w/v) Agar

#### 2.1.2 Herstellung kompetenter E.coli für chemische Transformation

Die Herstellung kompetenter E.coli für chemische Transformationen erfolgte mittels der Rubidiumchlorid-Methode. Zunächst wurden E.coli auf LB-Agar ohne Zugabe von Antibiotika angezüchtet und anschließend eine Einzelkolonie zum Animpfen einer 2 mL  $\psi$ B –Medium Flüssigkultur verwendet. 1 mL dieser Vorkultur wurde im Anschluss in 100 mL  $\psi$ B –Medium überführt und bis zu einer OD<sub>550</sub>=0,3 - 0,4 unter aeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Aus dieser Kultur wurden wiederum 5 mL Bakteriensuspension in 100 mL unbeimpftes  $\psi$ B –Medium überführt. Das Zellwachstum wurde bei einer OD<sub>550</sub>=0,3 - 0,4 durch 5-minütige Inkubation auf Eiswasser unterbunden. Die Zellen wurden bei 5 °C und 2.500 Upm pelletiert und anschließend in 15 mL kaltem TfbI-Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eiswasser wurde die Zellsuspension erneut bei 5 °C und 2.500 Upm zentrifugiert, das Zellpellet in 2 mL

kaltem TfbII-Puffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kompetente E.coli wurden bei -80 °C aufbewahrt.

*ψB* –*Medium*: 34 mM MgSO<sub>4</sub> (steril filtriert), 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto Tryptone, 10 mM KCl; pH 7,6 mit KOH einstellen

*TfB I-Medium*: 15,2% (v/v) Glycerol, 30 mM KAc, 80 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, 14 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen; steril filtrieren

*TfB II-Medium*: 2 mM MOPS pH 7,0, 3% (v/v) Glycerol, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM RbCl; steril filtrieren und lichtgeschützt aufbewahren

### 2.1.3 Transformation kompetenter E.coli Zellen mit Plasmid DNA

Zur Transformation kompetenter E.coli Zellen wurden 100 µL kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 µg Plasmid-DNA 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C. In direktem Anschluss daran wurden die Zellen 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 700 µL SOC-Medium wurde der Transformationsansatz 1 Stunde bei 37 °C und 350 Upm inkubiert und schlussendlich auf eine Selektionsplatte bestehend aus LB-Agar und entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Das Wachstum von Einzelkolonien erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C.

*SOC-Medium*: 22 mM Glucose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 2% (w/v) Bacto Tryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 8,5 mM NaCl; pH 7,0

### 2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Maxi/Mini-Präp) aus E.coli

Abhängig vom Isolierungsmaßstab und der daraus resultierenden Ausbeute wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Prokaryoten angewandt.

#### Minipräp

Flüssigkulturen mit einem Volumen von 2 mL wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation bei 8.000 Upm pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 100 µL SOL1 mithilfe eines Vortexmischers resuspendiert. Anschließend wurden 200 µL SOL2 hinzugegeben, die Lösung mehrfach invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µL SOL3 folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Die aufgeschlossenen Zellen wurden im Anschluss bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und mit 350 µL Isopropanol vermischt und lösliche von nicht löslichen Zellbestandteilen mittels Zentrifugation bei 13.000 Upm getrennt. Zur Eliminierung von RNA

wurden 100  $\mu\text{L}$  TE/RNase für 15 Minuten bei 37 °C hinzugegeben. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte bei Raumtemperatur durch Zugabe von 120  $\mu\text{L}$  eines Gemisches aus 88% Isopropanol und 0.2 M K-Acetat und anschließender Zentrifugation bei 14.000 Upm. Der Überstand wurde verworfen und übriges Isopropanol durch Verdunstung entfernt. Die DNA wurde im Anschluss in 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

SOL1: 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8,0 in ddH<sub>2</sub>O

SOL2: 0,2 M NaOH, 35 mM SDS in ddH<sub>2</sub>O

SOL3: 3 M KAc, 11,5% (v/v) Eisessig in ddH<sub>2</sub>O

### Maxipräp

Bei Flüssigkulturen mit einem Volumen von 200 mL erfolgte die Plasmid-Isolierung mithilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kit Systems nach Herstellerangaben. Die DNA wurde anschließend in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration auf 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  eingestellt.

### 2.1.5 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Hydrolasen, die DNA an definierten, 4 bis 8 Basenpaar langen Sequenzbereichen schneiden können. Dieser Eigenschaft wird sich zum Beispiel bei einer Restriktionsanalyse oder einer Klonierung zu Nutze gemacht. Jeweils 1  $\mu\text{g}$  zirkuläre Plasmid-DNA wurde zusammen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (FastDigest Restriktionsendonukleasen, Invitrogen), Zugabe von BSA (Invitrogen) und einem Restriktionspuffer (FastDigest Buffer 10 x green, Invitrogen) bei 37 °C für die Enzym-spezifische Zeit inkubiert. Es folgte gegebenenfalls im Anschluss an den Restriktionsverdau eine Inaktivierung der Enzyme bei 80 °C. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen zur Analyse von Plasmid-tragenden Einzelkolonien, zur Linearisierung von zirkulären Plasmiden und Aufbereitung von cDNA-Klonen im Rahmen von Klonierungen eingesetzt.

### 2.1.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA wurde mittels Photometrie ermittelt. Hierbei wurde die Absorption einer DNA- oder RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Es wurden jeweils 2  $\mu\text{L}$  einer Nukleinsäure enthaltenden Probe auf eine Take 3 Micro-volume Platte (BioTek) aufgetragen und am Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek) analysiert.

### 2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Arbeitstechnik zur Vervielfältigung eines definierten DNA-Sequenzbereiches. Jeweils für das 5'- und das 3'-Ende der Sequenz werden Oligonukleotide synthetisiert, welche komplementär zu der zu vervielfältigenden Sequenz sind und Anfang beziehungsweise Ende des DNA-Fragmentes definieren. Nach Denaturierung des DNA-Doppelstranges in zwei Einzelstränge können sich die Oligonukleotide an die jeweils komplementären Bereiche anlagern. Eine DNA-Polymerase ermöglicht die Extension der Oligonukleotide komplementär zum Template-Strang vom 5'- zum 3'-Ende. Denaturierung, Anlagerung der Oligonukleotide und Extension werden in mehreren Zyklen wiederholt. Auf diese Weise entstehen multiple Kopien eines spezifischen DNA-Sequenzbereiches. Neben einem DNA-Template und einer thermostabilen DNA-Polymerase werden einem PCR-Reaktionsansatz zwei Oligonukleotide (Primer) zur Hybridisierung an das DNA-Template, dNTPs und  $MgSO_4$  hinzugefügt. Letzteres dient der Aktivierung der DNA-Polymerase.

Eine PCR wurde in dem nachstehenden Reaktionsansatz durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden als Lyophilisat (Sigma, Taufkirchen) erworben und mit 1x TE-Puffer auf eine Konzentration von jeweils 100  $\mu M$  eingestellt. PCR-Reaktionen im Vorfeld an eine Klonierung unterschieden sich von dem hier beschriebenen Reaktionsansatz. Nähere Informationen hierzu sind bei der jeweiligen Klonierungs-Technik aufgeführt.

<i>PCR-Reaktionsansatz:</i>	DNA-Template	1 $\mu L$
	Primer vorwärts 10 $\mu M$	0,5 $\mu L$
	Primer rückwärts 10 $\mu M$	0,5 $\mu L$
	OneTaq <sup>®</sup> QuickLoad <sup>®</sup> 2xMM	7,5 $\mu L$
	ddH <sub>2</sub> O	5,5 $\mu L$

<i>PCR-Programm:</i>	98°C	4 min	} 11 Zyklen	
	96°C	20 sec		
	65°C	20 sec		
	68°C	1 min		
	96°C	20 sec		} 27 Zyklen
	55°C	20 sec		
	68°C	1 min		
	68°C	5 min		

*100 x TE-Puffer:* 10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7,5

### 2.1.8 Agarosegelelektrophorese

Mittels einer Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäure-Fragmente gemäß ihrer Größe getrennt und analysiert werden. Als Trägermaterial dient eine gelartige Matrice aus 1x TBE-Puffer und Ultra Pure™ Agarose. Je nach Gewichtsanteil bildet die Agarose ein Maschenwerk aus unterschiedlich großen Zwischenräumen, durch welche DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell hindurch wandern können. Dem Trägermaterial wurde zudem ein mit der DNA interkalierender Farbstoff hinzugefügt, hier Midori-Green Advanced DNA Stain, welcher unter UV-Licht sichtbar wird. Den DNA-Molekülen wurde zunächst gegebenenfalls ein Glycin-haltiger Ladepuffer mit einem Farbstoff (Orange G) hinzugefügt und in die Probenaschen eines Agarosegels aufgetragen. Bei Verwendung des OneTaq®QuickLoad® 2xMM w/Std Puffers musste kein zusätzlicher Ladepuffer hinzugegeben werden. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung migrieren die Moleküle entsprechend ihrer negativen Ladung von der Anode zur Kathode innerhalb des Gels. Kleinere DNA-Fragmente legen in einer gewissen Zeit eine längere Strecke zurück als größere Fragmente.

*10 x TBE-Puffer:* 1,7 M Tris, 1,7 M Borsäure, 50 mM EDTA in ddH<sub>2</sub>O

*Orange G-Ladepuffer:* 50% (v/v) 1 xTBE, 50% (v/v) Glycerin, 88 nM Orange G

### 2.1.9 Aufreinigung von PCR Produkten vor einer DNA-Sequenzierung nach Sanger

Vor der Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurden die in der PCR eingesetzten Oligonukleotide und dNTPs sowie einzelsträngige DNA enzymatisch entfernt. Hierzu wurde das PCR-Produkt mit einem Reaktionsansatz aus 6.6 U Exonuklease I und 0.66 U FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Deaktivierung der Enzymaktivität für 15 Minuten bei 80 °C.

### 2.1.10 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Zur Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül wurde die Didesoxymethode nach Sanger, auch Kettenabbruch-Synthese genannt, angewandt. Diese Technik beruht auf einer *in vitro* Replikation des betreffenden DNA-Doppelstranges. Ausgehend von einem kurzen Abschnitt bekannter DNA-Sequenz verlängert eine DNA-Polymerase eine der beiden komplementären DNA-Stränge. Hierbei greift die Polymerase neben den dNTPs auch auf 2'-3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) zurück, die der Sequenzierreaktion in geringer

Konzentration hinzugefügt wurden. Sobald ein ddNTP eingebaut wird, kommt die DNA-Synthese zum Erliegen. Wird ein ddNTP in den neusynthetisierten Strang eingebaut, ist eine Verlängerung der DNA durch die DNA-Polymerase nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. Schlussfolgernd entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Nukleotidanzahl, die mittels Kapillarelektrophorese auf Sequenzierungsautomaten aufgetrennt und mittels Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurden für eine Sequenzierreaktion mithilfe des ABI BigDye Terminator Sequencing Kits (Invitrogen, Karlsruhe) 2 µL eines PCR-Produktes beziehungsweise 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Dem Reaktionsansatz wurden ein Oligonukleotid bekannter DNA Sequenz (Primer), ein Sequenzierpuffer sowie BigDye Terminator, ein ddNTP enthaltendes Reagenz, in folgenden Volumina hinzugefügt.

<i>Sequenzier-Reaktionsansatz:</i>	DNA-Template	2 µL
	Primer (10 µM)	1 µL
	5x Sequenzierpuffer <sup>190</sup>	4 µL
	BigDye Terminator vs.1.1	2 µL
	ddH <sub>2</sub> O	11 µL

Im Anschluss daran folgte die *in vitro* Replikation, welche in drei Schritte untergliedert ist; Denaturierung des DNA-Doppelstranges in zwei Einzelstränge, Anlagerung eines sequenzspezifischen Oligonukleotids und Extention des neu synthetisierten DNA-Fragmentes.

<i>In vitro Replikation:</i>	96°C	1 min	} 29 Zyklen
	96°C	30 sec	
	55°C	15 sec	
	60°C	4 min	
	72°C	4 min	

Nach der Sequenzierreaktion wurden die Amplikons zunächst mit Natriumacetat und Ethanol gefällt, bevor sie von einem automatischen Kapillarsequenzierer (ABI 3500; Applied Biosystems) analysiert wurden. Sequenz-Elektropherogramme wurden mithilfe der Sequence Pilot Software (JSI Medical Systems, Kippenheim) ausgewertet.

### 2.1.11 Klonierung mittels Gateway<sup>®</sup> Technologie

Das Invitrogen Gateway<sup>®</sup> Verfahren ist ein Klonierungssystem, welches die Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligasen umgeht. Die Methodik beruht auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda in E.coli, durch die er in seinem lysogenen

Zyklus in das Genoms des Bakteriums integrieren kann (Landy, 1989). Eine detaillierte Beschreibung der Technologie ist auf der Internetseite der Firma Invitrogen nachzulesen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)). Die angewandte Methode beginnt mit der Klonierung eines Blunt-end PCR Produktes in einen pENTR™ Vektor, welcher den Eintritt in das Gateway® System und damit eine hocheffiziente, Zeit sparende Überführung einer cDNA in Expressionsvektoren ermöglicht. Hierfür sind lediglich zwei spezifische, kurze DNA-Sequenzen notwendig, die als Erkennungssequenzen für die Rekombination dienen. Dies sind die so genannten Att-Stellen („attachment sites“). Das zu klonierende DNA-Fragment wurde zunächst zwischen zwei Att-Stellen eines pENTR™/D-TOPO-Vektors eingefügt. Von diesem Eingangsklon ist die Rekombination in jeden x-beliebigen Zielvektor über eine anschließende LR-Reaktion möglich, vorausgesetzt er enthält die entsprechenden Att-Stellen.

<i>PCR-Reaktionsansatz:</i>	DNA-Template	3 µL
	Primer For (10 µM)	1 µL
	Primer Rev (10 µM)	1 µL
	dNTP Mix (10 mM)	0,5 µL
	PfuUltra™ HF DNA Polymerase	0,2 µL
	10x PfuUltra™ HF Buffer	2,5 µL
	ddH <sub>2</sub> O	16,8 µL

<i>PCR-Programm:</i>	98 °C	2 min	} 35 Zyklen
	98 °C	10 sec	
	55 °C	15 sec	
	72 °C	75 sec	
	72 °C	4 min	

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mithilfe des JETQUICK PCR Product Purification Spin Kits (Genomed, Löhne) aufgereinigt, bevor die TOPO® Klonierungsreaktion nach Herstellerangaben in einem Ansatz aus 4 µL PCR-Produkt, 1 µL TOPO®-Vektor und 1 µL Salt Solution für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Reaktion wurde anschließend vollständig in TOP10 chemisch kompetente Zellen transformiert und auf eine LB-Agar Kulturschale mit Ampicillin zur Selektion ausgestrichen. Einzelkolonien wurden anschließend mittels Plasmid-Mini-Präp und Restriktionsverdau hinsichtlich der Inkorporation des PCR-Produktes in den pENTR™/D-TOPO®-Vektor analysiert. Positive Einzelkolonien wurden zudem mittels Sanger sequenziert.

Zum Transfer des eingefügten PCR-Produktes aus dem pENTR™/D-TOPO®-Vektors in ein Gateway® Destination Expressionsplasmid wurde eine LR-Rekombination mithilfe des Gateway® LR Clonase® II Enzyms durchgeführt. Als LR-Reaktion wird dahingehend die

Rekombination des DNA-Inserts aus einem Eingangsvektor in einen Zielvektor bezeichnet. Der Reaktionsansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

<i>LR-Rekombination:</i>	pENTR™/D-TOPO® (100-300 ng)	1-10 µL
	pDEST (300 ng)	2 µL
	5x LR Clonase® II Enzym Mix	4 µL
	TE Puffer	ad 20 µL

Die LR-Rekombinationsreaktion wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 µL einer Proteinase K Lösung hinzugegeben und weitere 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde in DH10B kompetente E.coli transformiert. Einzelkolonien wurden wiederum mittels Mini-Präp und Restriktionsverdau, sowie Sanger-Sequenzierung analysiert.

### 2.1.12 In-Fusion® Klonierung

Das Einfügen von DNA-Fragmenten in unterschiedliche Expressionsvektoren für die Anwendung in Säuger- und Bakterienzellen wurde mithilfe des In-Fusion® HD Cloning Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Namensgebend für diese Technik ist das In-Fusion® Enzym, welches die Fusion eines über PCR generierten DNA-Fragmentes mit einer linearisierten Vektor-DNA über die Erkennung von 15 komplementären Basenpaaren ermöglicht. Beim Design der Oligonukleotide zum Amplifizieren des spezifischen DNA-Bereiches wurden die zusätzlichen Nukleotide, welche komplementär zum Zielvektor sind, als Extension jeweils an das 5'-Ende der Oligonukleotide angehängt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde in der Regel zwischen zwei Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingefügt. An genau diesen Sequenzbereichen fand gleichermaßen die Linearisierung des Zielvektors durch den Einsatz spezifischer Endonukleasen statt. Die Klonierungsreaktion setzte sich schließlich aus dem In-Fusion® Enzym, einem PCR-Produkt und einem linearisierten Zielvektor gemäß der Herstellerangaben zusammen. Ein Teil des Reaktionsansatzes wurde im Anschluss in Stellar™ kompetente Zellen (Takara Bio Inc.) transformiert.

### 2.1.13 Klonierung mittels Restriktionsendonukleasen

Ein weiteres Verfahren zur Klonierung von DNA-Sequenzen in Expressionsvektoren basiert auf dem Gebrauch von Restriktionsendonukleasen. Diese Technik wurde in dieser Arbeit zur Klonierung von *CDKL1* in den pCS2+-Vektors sowie den pIRESHyg3-Vektor verwendet. Die Multiple Cloning Site eines Plasmids, also der Ort, an dem die Inkorporation von DNA-

Fragmenten geschieht, beinhaltet zahlreiche Erkennungssequenzen für Endonukleasen, die doppelsträngige DNA spezifisch schneiden können. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Klonierung zu nutze.

Zunächst wurden zwei Restriktionsenzyme ausgewählt (hier: EcoRI und XhoI für pCS2+ sowie NheI und EcoRV für pIRESHyg3), die innerhalb der *Multiple Cloning Site*, nicht aber innerhalb der einzufügenden DNA-Sequenz schneiden. Die Erkennungssequenz für jeweils eines der Enzyme wurde an das 5'-Ende eines vorwärts-Primers beziehungsweise an das 5'-Ende eines rückwärts-Primers hinzugefügt. Die Herstellung eines PCR-Produktes wurde in Anlehnung an den PCR-Reaktionsansatz für eine Gateway<sup>®</sup> Klonierung durchgeführt. Unter anderem wurde hierfür ebenfalls eine thermostabile Polymerase mit Proofreading-Funktion verwendet. Das PCR-Produkt wurde im Anschluss mithilfe des JETQUICK PCR Product Purification Spin Kits (Genomed, Löhne) aufgereinigt. Danach wurden die entsprechenden Restriktionsendonukleasen hinzugefügt, welche spezifisch die DNA-Sequenz an den 5'-Enden des PCR-Produktes erkennen und schneiden. Parallel dazu wurden ebenfalls die Zielvektoren (hier: pCS2+ und pIRESHyg3) mithilfe von den Endonukleasen EcoRI und XhoI beziehungsweise NheI und EcoRV linearisiert. Nach Aufreinigung wurden der linearisierte Vektor und das PCR-Produkt mittels T4-DNA-Ligase ligiert. Das zusammengefügte Konstrukt aus Vektor und PCR-Produkt wurde anschließend in DH10B kompetente Zellen transformiert.

#### **2.1.14 QuikChange<sup>®</sup> II Site Directed Mutagenesis Kit**

Der gezielte Austausch sowie die Insertion beziehungsweise Deletion einzelner oder mehrerer Basen innerhalb einer Plasmid-DNA wurde mithilfe des QuikChange<sup>®</sup> II Site Directed Mutagenesis Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Wesentlichen wurde der Sequenzbereich von Interesse zunächst in einer PCR mittels spezifischer Oligonukleotide amplifiziert. Bei dem Design der Oligonukleotide war zu beachten, dass die einzufügende Mutation in der Mitte der Oligonukleotide liegt und jeweils von 10-15 Nukleotiden am 5'- und am 3'-Ende flankiert wird. Mit der Hilfe einer *PfuUltra* HF (high-fidelity) DNA Polymerase wurden beide Stränge einer Plasmid-DNA in 12 bis 18 Zyklen aus Denaturierung, Anlagerung der Oligonukleotide und Elongation repliziert. Die Dauer der Elongation war abhängig von der Größe des Plasmids in Basenpaaren, wobei 1 kb Plasmid 1 Minute Elongation erforderte. Im Anschluss an die PCR wurde ein Restriktionsverdau mit der Endonuklease DpnI durchgeführt. DpnI erkennt und schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, welche in den meisten E.coli Stämmen zu finden ist. Die parentale Plasmid-DNA, welche als Template für die PCR diente,

wurde somit abgebaut. Schlussendlich wurde die amplifizierte DNA einschließlich der gewünschten Punktmutation in kompetente Zellen transformiert.

### **2.1.15 Isolierung von RNA**

Zur Isolierung von RNA aus humanem Blut wurden Blutproben in PAXgene® Blood Röhrchen (PreAnalytiX) entnommen und bis zur Analyse maximal eine Woche bei 4 °C oder längerfristig bei -20 °C aufbewahrt. Die Isolierung der RNA erfolgte im Anschluss mithilfe des PAXgene® Blood RNA Kit 50, v2 (PreAnalytiX) nach Herstellerangaben. Die RNA wurde am Schluss in insgesamt 50 µL BR5-Puffer (PreAnalytiX) eluiert, 5 Minuten bei 65 °C denaturiert und ihre Konzentration bei einer Absorptions-Wellenlänge von 260 nm am Epoch (BioTek) bestimmt. Die Reinheit und Qualität der isolierten RNA wurde zusätzlich gelelektrophoretisch in einem 1%-Agarose Gel überprüft. Nach erfolgreicher Isolierung waren die 18S sowie die 28S ribosomale RNA erkennbar.

### **2.1.16 cDNA-Synthese**

Aus der isolierten RNA wurde mithilfe des SuperScript IV Reverse Transkriptase Systems (Invitrogen) nach Herstellerangaben cDNA synthetisiert, um an dieser beispielweise eine Transkriptanalyse durchzuführen. Hierfür wurden bis zu 5 µg RNA in einem Reaktionsansatz mit 1 µL oligo-d(T)-Primern und einem 10 mM dNTP Mix 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf 4 °C abgekühlt. Im Anschluss wurden der Reaktion 4 µL einer 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 2 µL 0,1M DTT, 40 Units RNase Out sowie 200 Units SuperScript Reverse Transkriptase Enzym und 2 µL eines 10 x RT Puffers hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde anschließend 50 Minuten bei 50 °C inkubiert, gefolgt von 5 Minuten bei 85 °C. Abschließend wurde 1 µL einer RNaseH hinzugegeben und weitere 20 Minuten bei 37 °C inkubiert.

### **2.1.17 Detaillierte Transkriptanalysen**

Zur Untersuchung von Transkriptvarianten wurde die synthetisierte cDNA zunächst mithilfe des TOPO®-TA-Systems (Invitrogen) in einen pCR 2.1-TOPO® TA Vektor subkloniert. Hierzu wurde eine PCR mit der OneTaq®QuickLoad® 2xMM w/Std Puffer durchgeführt und anschließend 1 µL pCR 2.1-TOPO® TA Vektor sowie 1 µL Salt Solution zu 4 µL PCR-Produkt hinzugefügt und 5

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde in kompetente E.coli DH10B transformiert. Im Anschluss wurden an den Einzelkolonien Kolonie-PCRs unter Zugabe folgender Reagenzien durchgeführt.

<i>Kolonie-PCR-Reaktionsansatz:</i>	ddH <sub>2</sub> O	20,9 µL
	10 x Puffer	2,5 µL
	T7-Primer	0,5 µL
	M13R-Primer	0,5 µL
	dNTP Mix (10 mM)	0,5 µL
	Taq Polymerase	0,1 µL

Die PCR-Produkte aus Einzelkolonien wurden anschließend gelelektrophoretisch analysiert und mithilfe der T7- und M13R-Primer sequenziert.

## 2.2 Genetische Analysen mittels Hochdurchsatz-Sequenzierungen

In dieser Arbeit wurden Patienten mit Verdacht auf eine hereditäre Bindegewebserkrankung wie MFS, LDS, EDS, CCA, syndromale oder nicht-syndromale TAAD oder eine bislang ungeklärte Form hereditärer Bindegewebserkrankungen (HCTD) mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung analysiert. Bei 152 Patienten erfolgte eine zielgerichtete NGS-basierte Gen-Panel-Analyse (tNGS). Diese wurde von der Abteilung für Molekulargenetik des Instituts für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) meist im Rahmen eines diagnostischen Auftrages durchgeführt. Die technische Durchführung war zwar nicht dissertationsrelevant, jedoch als essenzielle Vorarbeit zu diesem Forschungsprojekt zu werten und soll somit hier kurz beschrieben werden. Genomische DNA wurde aus peripherem Blut nach standardisierten Laborverfahren isoliert. Die Zielsequenzregionen wurden mithilfe des *TruSight<sup>TM</sup> Rapid Capture* Kits (Illumina, SanDiego, CA) nach Herstellerangaben angereichert. Dies beinhaltete zunächst die Tagmentierung der genomischen DNA, d.h. die DNA-Proben wurden mittels PCR amplifiziert und dabei mit für jeweils einen Patienten spezifischen Adaptoren (Indices) versehen. Anschließend wurden Proben von bis zu 12 Personen in einem einzigen Hybridisierungsmix vereint. Der Hybridisierungsmix enthielt Sonden spezifisch für die Zielregionen. Die DNA/Sonden Hybride wurden mit Streptavidin-Beads isoliert und unspezifisch gebundene DNA-Fragmente wurden entfernt. Die gewonnene DNA-Bibliothek wurde im Anschluss wieder von den Streptavidin-Beads gelöst, aufgereinigt und mittels PCR amplifiziert. Die Konzentration jeder DNA-Bibliothek wurde mithilfe des Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS (High Sensitivity) Kits bestimmt (Life Technologies, Carlsbad, CA). Für die Generierung von Clustern und die sich daran anschließende Sequenzierung der DNA Proben auf einer *MiSeq* Flusszelle wurde das *MiSeq Reagent Kit v.2* System (Illumina) und eine

*MiSeq* Plattform (Illumina) verwendet. Die Primärdaten wurden mithilfe des *Sequence Pilot* Moduls SeqNext (JSI Medical Systems, Kippenheim) visualisiert und Abweichungen zum humanen Referenzgenom hg19 evaluiert. Die Zielsequenzregionen umfassten 31 Gene, inklusive 40 bp der 5' und 3' intronischen Bereiche, mit einer Gesamtgröße von 186.801bp.

Gesamtexomische Sequenzierungen von 4 Indexpatienten einer Familie und betroffenen Verwandten wurden bis Herbst 2016 durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kutsche und Herrn PD Dr. Rosenberger durchgeführt. Dazu wurden exonische Bereiche durch das *Nextera Exome Enrichment*-Kit (Illumina) angereichert. Die Hochdurchsatzsequenzierung erfolgte auf der Illumina-Plattform HiSeq 2000/2500 (Illumina) im Heinrich-Pette-Institut (HPI) in der Arbeitsgruppe von Prof. Grundhoff. Ab Herbst 2016 wurde die gesamtexomische Sequenzierung von 4 weiteren Indexpatienten und betroffenen Familienangehörigen sowie 39 sporadische Patienten entweder durch das *Cologne Center for Genomics* (Köln) oder der Firma CeGaT (Tübingen) durchgeführt. Im Anschluss an die Exom-Sequenzierung wurden die Primärdaten von der Bioinformatik Facility des UKEs durch die in der Einleitung beschriebenen Programme aufbereitet und analysiert.

### 2.2.1 Filterung von ES-Daten

Die Bioinformatik Facility des UKEs stellte nach Aufbereitung der Primärdaten VCF-Dateien zur Verfügung. Diese enthielten annotierte Sequenzvarianten aller Mitglieder einer Familie, welche in die gesamtexomische Analyse einbezogen wurden, sowie Informationen zum jeweils vorliegenden Genotyp, Ausgabe-Dateien des AnnoVar Programmes und Dateien zur Visualisierung der Reads mithilfe des *Integrative Genomics Viewer* (IGV v.2.3.25). In der AnnoVar-Ausgabe-Datei waren u. a. Annotationen wie OMIM-Phänotypen, ClinVAR-Einträge, Pathogenitätsvorhersagen und Allelfrequenzen aus den gnomAD und PopFreqMax-Datenbanken hinterlegt. Letztere integriert u. a. Allelfrequenz-Daten aus den Populationsdatenbanken des *1000 Genomes Project*<sup>174</sup> und dem *Exome Variant Server* (EVS, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA; Stand Januar 2019; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

Die Daten wurden im Anschluss hinsichtlich unterschiedlicher Gesichtspunkte gefiltert, die in Abb. 10 zusammengefasst sind. Im ersten Schritt der Filterung erfolgte unter Annahme eines autosomal dominanten Erbganges eine Filterung nach heterozygoten Varianten, die in eindeutig erkrankten Mitgliedern einer Familie vorliegen. Zur Abfrage solcher Varianten aus der VCF-Datei wurde ein JAVA-basiertes Skript der Bioinformatik Facility verwendet. Dieses Skript erlaubte zunächst die Definition von betroffenen und nicht betroffenen Personen. Varianten, die sowohl in

erkrankten als auch gesunden Personen vorkommen, können auf diesem Weg bioinformatisch ausgeschlossen werden. Jedoch wurden in dieser Arbeit solche Varianten zunächst nicht verworfen. Aufgrund reduzierter Penetranz beziehungsweise variabler Expressivität können auch bei gesunden Personen pathogene Varianten gefunden werden. Unter Einbeziehung der Varianten in der VCF-Datei und der Annotationen aus der AnnoVar-Ausgabe-Datei wurde durch das JAVA-Skript eine Excel-Datei erstellt. Diese enthielt alle den Filterkriterien entsprechenden Varianten einschließlich Annotationen wie OMIM-Phänotypen, Pathogenitätsvorhersagen und Allelfrequenzen. Im Anschluss wurden alle Varianten oberhalb einer definierten Allelfrequenz verworfen. Hierzu wurde der Excel-Befehl Daten>Filtern verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Varianten gefiltert, dessen Allelfrequenz in der gnomAD- und der PopFreqMax-Datenbank geringer als die Prävalenz der vorliegenden Erkrankung ist. Außerdem wurden alle Varianten, für die homozygote Anlageträger in den Datenbanken verzeichnet sind, aussortiert. Im letzten Filter-Schritt wurden die Daten auf falsch-positive Varianten überprüft. Hierzu wurden die entsprechenden Varianten durch den *Integrative Genomics Viewer* (IGV v.2.3.25) visualisiert. Varianten mit geringer Abdeckung (<20 Reads) und niedriger Qualitätskennzahl (<20) wurden verworfen. Neben diesen Varianten verblieben in der Regel weitere Artefakte, die anhand von Abdeckung und Qualitätskennzahl in der bioinformatischen Filterung nicht ermittelt wurden und sich erst im Sequenzkontext als ein Artefakt der Sequenzierung herausstellen. Hierzu gehören zum Beispiel deletierte oder duplizierte Basen in einem Nukleotid-Stretch. Zudem wurden intronische Varianten, die über  $\pm 5$  Basen von den Exongrenzen entfernt liegen, vorerst aussortiert, obgleich auch tief intronische Varianten pathogen sein können.<sup>191</sup>

### 2.2.2 Klassifizierung von Sequenzvarianten

Alle durch Hochdurchsatzsequenzierung, sei es mittels zielgerichteter NGS-Panel-Diagnostik oder ES, eruierten Sequenzvarianten wurden im Kontext der Erkrankung des Patienten und der Funktion des Genproduktes bewertet. Bei der Klassifizierung von synonymen, Missense- und Nonsense-Varianten, Insertionen und Deletionen, sowie intronischen Sequenzveränderungen an Exon-Intron-Grenzen wurde sich im Wesentlichen an den Richtlinien des *American College of Medical Genetics and Genomics*<sup>179</sup> orientiert. Das ACMG schlägt hierzu ein Bewertungsschema vor, welches Varianten in fünf Klassen einteilt: (a) krankheitsverursachend (*pathogenic*; P), (b) wahrscheinlich krankheitsverursachend (*likely pathogenic*; LP), (c) Variante mit unklarer Signifikanz (*variant of unknown significance*; VUS), (d) wahrscheinlich gutartig (*likely benign*; LB), (e) gutartig (*benign*; B). Die Vorgehensweise bei der Klassifizierung von Varianten nach

ACMG/AMP-Richtlinien ist in der Einleitung (Kapitel 3.4) ausführlich beschrieben. Unter anderem wurde überprüft, ob und mit welcher Bewertung eine Variante bereits in Datenbanken, welche die Beziehungen zwischen Phänotyp und Sequenzvarianten beschreiben, aufgeführt ist. Hierzu zählten die Datenbanken ClinVar, Human *Gene Mutation Database* (HGMD), *Universal mutation database* (UMD)-*Locus Specific Database* (LSDB) und *Leiden Open Variation Databases* (LOVD).<sup>76,192-194</sup> Wissenschaftliche Publikationen wurden ebenfalls dahingehend überprüft, ob und in welchem Kontext eine Variante bereits beschrieben ist. Außerdem wurde der Effekt der Variante auf strukturelle und funktionelle Veränderungen des Proteins beurteilt. Dies beinhaltete Kriterien in Bezug auf (a) die Art der Sequenzveränderung im Kontext der Genposition und der Konsequenz auf das codierte Protein, (b) die evolutionäre Konservierung der Aminosäure oder Proteinregion, (c) der Effekt von Missense-Varianten und Indels auf die Proteinfunktion sowie (d) die Konsequenz von SNVs und Indels auf das Spleißen der prä-mRNA. Die Beurteilung des Effektes einer Variante auf das Protein wurde durch verschiedene *in silico* Programme zur Pathogenitäts-Vorhersage unterstützt. Die Auswirkungen einer Missense-Variante konnten mittels ClinPred<sup>195</sup>, REVEL (*Rare Exome Variant Ensemble Learner*)<sup>196</sup> und M-CAP (*Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity*)<sup>197</sup> vorhergesagt werden. Diese drei *in silico* Programme generieren einen Score zwischen 0 und 1. Es gilt, je größer der Score, desto stärker sind die Auswirkungen auf das Protein. Es wurden die von den Entwicklern empfohlenen Cut-Offs von  $\geq 0,5$  für ClinPred und REVEL sowie  $\geq 0,025$  für M-CAP angewendet. Konsequenzen von SNVs und Indels auf das Spleißen der prä-mRNA wurden mithilfe der *in silico* Programme HSF (*Human Splicing Finder*)<sup>198</sup>, NetGene2 (*Neural network predictions of splice sites*)<sup>199</sup> und MaxEntScan (*Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs*)<sup>200</sup> beurteilt. Diese Programme bewerten die Wahrscheinlichkeit eines Zugewinns oder Verlustes einer kanonischen oder kryptischen Spleißstelle in der prä-mRNA. Schließlich wurden die Auswirkungen von ausgesuchten Sequenzvarianten mittels Transkriptanalysen oder *in vitro* Proteinanalysen untersucht. Informationen zur evolutionären Konservierung von Aminosäuren oder Proteinregionen wurden aus den Datenbanken Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) und UniProt (Universal Protein Resource; <http://www.uniprot.org/>) bezogen.<sup>201</sup>

Das Bewertungskriterium PS1 wurde in dieser Arbeit nur dann einer Variante zugewiesen, sofern sie als P/LP in ClinVar von mindestens zwei unabhängigen Quellen bewertet wurde und in HGMD in mindestens zwei unabhängigen Publikationen erwähnt ist oder ein anderer Austausch die gleiche Aminosäure betreffend in HGMD als DM (*disease causing mutation*) verzeichnet ist. In diesem Kontext wurden auch die Datenbanken UMD-LSDB und LOVD auf die Anwesenheit von relevanten Varianten überprüft. Einer Variante wurde das Bewertungskriterium PP3 zugeteilt,

wenn mindestens zwei der *in silico* Programme einen Pathogenitäts-Score über den empfohlenen Cut-Offs vorhersagten oder wenn mindestens zwei der Programme zur Vorhersage der Spleiß-Stellen eine Konsequenz beschreiben. PP5 und BP6 wurden in dieser Arbeit nicht als Bewertungskriterium verwendet.

### 2.2.3 Identifizierung und Priorisierung von neuen Kandidatengen für hereditäre Aortopathien

Neben der NGS-basierten Gen-Panel-Analyse wurden in dieser Arbeit gesamtexomische Analysen bei 8 Familien mit einer erblichen Bindegewebserkrankung zur Identifizierung neuer Kandidatengene durchgeführt. Da zunächst eine monogene, autosomal dominante Vererbung angenommen wurde, wurden im Anschluss an die ES-Analyse lediglich heterozygote Varianten, die in allen Betroffenen einer Familie vorkommen, herausgefiltert. Nach Klassifizierung der Varianten wurde eine Priorisierung der neuen putativen Kandidatengene durchgeführt. Dazu wurde die Position der von der Sequenzveränderung betroffenen Aminosäure(n) innerhalb eines Proteins, z.B. liegt dort eine funktionelle Domäne, bewertet. Informationen hierzu wurden in den Datenbanken Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) und UniProt (Universal Protein Resource; <http://www.uniprot.org/>) recherchiert. Zudem war es interessant, ob zu dem Protein oder zu Interaktionspartnern des Proteins bereits eine Funktion in bekannten Signalwegen beschrieben ist, deren Fehlregulation den vorliegenden Phänotyp erklären könnte. Hierzu wurde eine ausführliche Literaturrecherche in der NCBI-Datenbank PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) durchgeführt.

Schließlich wurde bei der Priorisierung von Kandidatengen die Toleranz/Intoleranz eines Gens für Sequenzveränderungen berücksichtigt. Insbesondere bei autosomal-dominanten Erkrankungen sind Gene, die Intoleranz für Variation zeigen, eher ein Krankheitsgen, als solche, in denen viele Varianten in der Allgemeinbevölkerung beschrieben sind. Diesbezüglich liefert die Datenbank gnomAD detaillierte Informationen.<sup>178</sup> Die Toleranz/Intoleranz gegenüber Missense-Varianten wird im misZ-Score ausgedrückt. Informationen über die Toleranz/Intoleranz gegenüber einem Funktionsverlust des Proteins sind im pLI-Score enthalten. Letzteres schließt Nonsense-Varianten, *frameshift*-Varianten und Varianten, die den Spleißakzeptor oder-donor betreffen, ein. Die verwendete gnomAD-Matrix beruht auf dem Vergleich zwischen der Anzahl zu erwartender Varianten und der Anzahl tatsächlich beobachteter Varianten in der Gesamtbevölkerung. Es gilt, je höher der misZ- oder pLI-Score, desto intoleranter ist ein Gen gegenüber den jeweiligen Sequenzveränderungen. Eine signifikante Reduktion beobachteter zu

erwarteter Missense-Varianten ist durch einen misZ-Score  $>3$  definiert. Der pLI-Score bewegt sich zwischen 0 und 1. Ein pLI-Score  $>0,9$  ist indikativ für eine signifikante Intoleranz gegenüber einem Funktionsverlust des codierten Proteins.

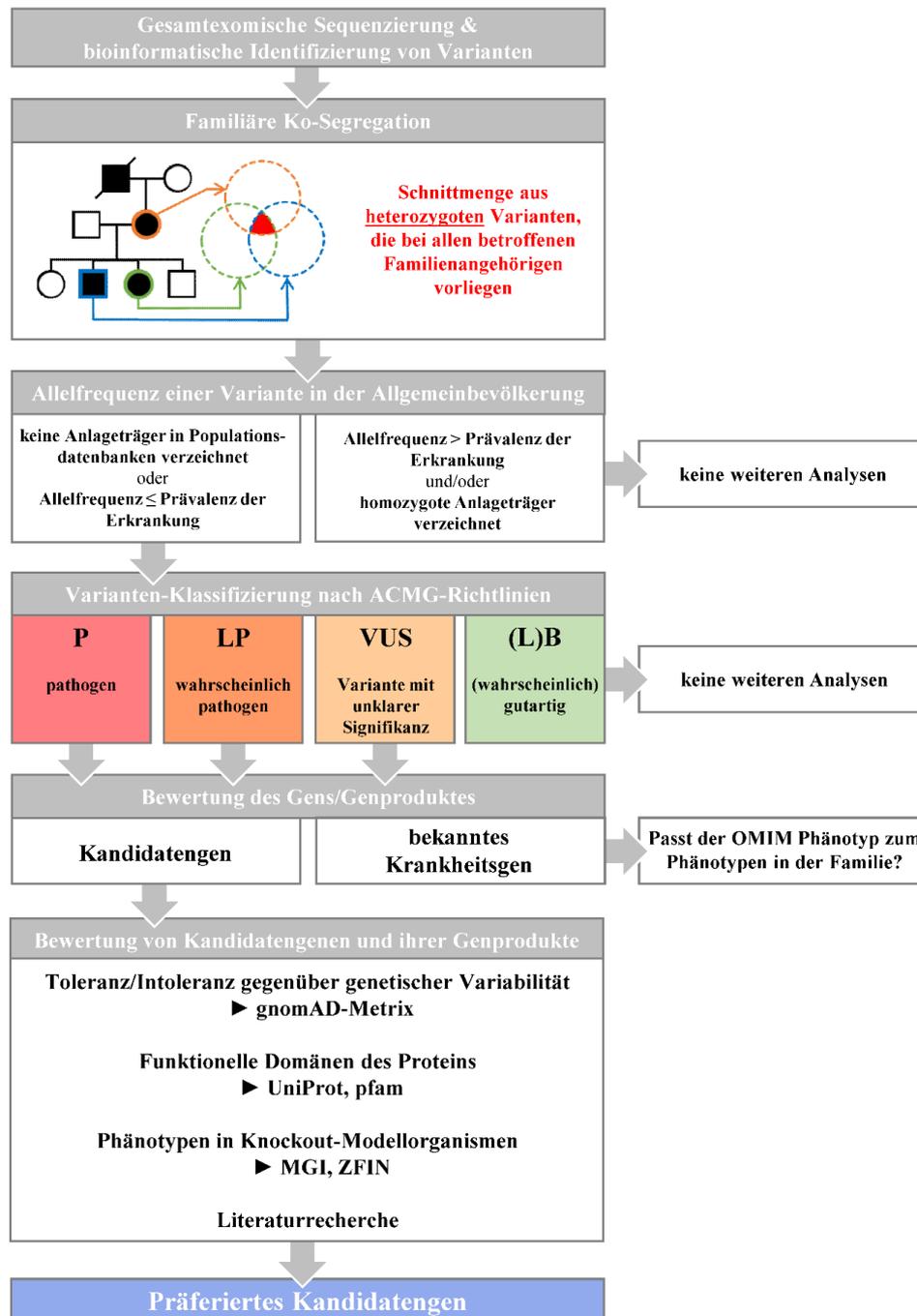
Die eruierten Kandidatengene wurden weiter in Bezug auf Daten von Knockout-Phänotypen in Modellorganismen beurteilt. Dazu wurden Informationen aus den Datenbanken *Mouse Genome Informatics* (MGI)<sup>202</sup> bzw. *Zebrafish Information Network* (ZFIN)<sup>188</sup> bezogen und der dort beschriebene Phänotyp mit den klinischen Merkmalen des Patienten verglichen.

#### **2.2.4 Verifizierung von putativen Kandidatengen durch Mutationanalysen**

Kandidatengene, in denen mittels gesamtexomischer Sequenzierung eine putativ krankheitsursächliche Sequenzveränderung aufgedeckt wurde, wurden mittels Sanger-Sequenzierung in einer 175 Patienten umfassenden Kohorte mit einer erblichen Bindegewebserkrankung untersucht. Diese Analysen dienten dazu neue Krankheitsgene aus der Liste identifizierter Kandidatengene zu bestätigen und gegebenenfalls auch die Prävalenz von Mutationen in einem gegebenen Gen abzuschätzen.

Im Rahmen von Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Rosenberger alle Exons einschließlich angrenzender intronischer Bereiche, u.a. der 9 Exons des *CDKLI* Gens, sequenziert. Die Oligonukleotidsequenzen für die Mutationsanalyse in *CDKLI* mittels Sanger-Sequenzierung sind im Kapitel 1.7.3 des Methodenabschnittes angegeben. Die Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation codierender Bereiche wurde mithilfe des OneTaq<sup>®</sup>QuickLoad<sup>®</sup> 2xMM w/Std Puffer (NEB, Ipswich, USA), und wie im Kapitel 2.1.7 des Methodenabschnittes beschrieben, im 96-Loch Platten Format durchgeführt.

Das in dieser Arbeit vorgestellte NGS-basierte Gen-Panel wurde Anfang 2018 in der Molekulargenetik des Instituts für Humangenetik in Hamburg (UKE) durch weitere Gene ergänzt. Varianten in den überwiegend aus Exom-Sequenzierungen eruierten neuen Kandidatengen, u.a. *CDKLI*, wurden in einer forschungsbasierten Gen-Panel-Analyse (tNGS) identifiziert.



**Abb. 10: Vorgehen zur Identifizierung von Sequenzveränderungen und Priorisierung von Kandidatengen.** Mittels ES-Analyse und bioinformatischer Auswertung der Rohdaten wurden Sequenzveränderungen identifiziert, die unter Berücksichtigung der ACMG/AMP-Richtlinien als pathogen (P), wahrscheinlich pathogen (LP), gutartig (B) oder als Variante mit unklarer Signifikanz (VUS) eingestuft wurden. Im Anschluss wurde das Gen bzw. das Genprodukt bewertet. Bei Varianten in bekannten Krankheitsgenen wurde überprüft, ob der in OMIM beschriebene Phänotyp zur Klinik des Indexpatienten bzw. der untersuchten Familie passt. Gene, die noch nicht mit einer humanen Erkrankung assoziiert sind, wurden nach folgenden Kriterien bewertet und priorisiert: (a) Toleranz/Intoleranz gegenüber genetischer Variabilität, (b) betrifft die Variante eine funktionelle Domäne im kodierten Protein, (c) sind bereits Phänotypen in Knockout-Modellorganismen beschrieben, (d) andere Daten, wie z.B. Hinweise auf Beteiligung in bekannten Pathomechanismen von Aortopathien. Aus jeder ES-Analyse ging unter Berücksichtigung o. e. Bewertungskriterien ein präferiertes Kandidatengen hervor.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die SDS-PAGE ermöglicht die Trennung von Proteinen in einem Proteingemisch gemäß ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Als Matrix dient diesem System ein diskontinuierliches Gel aus Polyacrylamid und Natriumdodecylsulfat (SDS). Letzteres überdeckt die Eigenladung von Proteinmolekülen und verleiht ihnen damit eine konstant negative Ladungsverteilung. Die Proteine werden demnach einzig nach ihrer Kettenlänge, welche proportional zur Molekülmasse ist, getrennt. Entsprechend werden längere Proteine in dem Maschenwerk des Polyacrylamid-Gels stärker zurückgehalten als kürzere Proteine. Bei dem diskontinuierlichen System migrieren die Proteine zunächst zur Konzentrierung in einem Sammelgel mit neutralem pH-Wert und anschließend in einem Trenngel mit basischem pH-Wert; in letzterem erfolgt die eigentliche Auftrennung der Proteine. Der pH-Gradient zwischen Sammel- und Trenngel bewirkt einen Stapelungseffekt, der eine verbesserte Trennschärfe zur Folge hat. Als Elektrolyt dient dabei ein SDS-haltiges Tris-Glycin-Chlorid-Puffersystem (SDS-Laufpuffer).

Bei der Herstellung eines SDS-Geles werden Acrylamid, Sammel- oder Trenngelpuffer und SDS sowie der Katalysator TEMED und der Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) miteinander vermischt und im Anschluss zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen. Zuerst wird das Trenngel hergestellt und mit Isopropanol überschichtet, so dass der Meniskus des Trenngels blasenfrei bleibt. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das flüssige Sammelgel auf das feste Trenngel gegossen und ein geeigneter Probenkamm eingesetzt, um Taschen für den Probenauftrag zu formen. In dieser Arbeit wurden alternativ kommerziell verfügbare Mini-Protean® TGX Stain-free™ Precast Gele (Biorad, München) mit einem Acrylamid-Gradienten von 4-12% und Bis-Tris (pH Wert 6,4 und 7,2) als Puffersubstanz verwendet.

*4x SDS-Trenngelpuffer:* 1,5 M Tris, 14 mM SDS in ddH<sub>2</sub>O; pH 8,8 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> einstellen

*4x SDS-Sammelgelpuffer:* 0,5 M Tris, 14 mM SDS in ddH<sub>2</sub>O; pH 6,8 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> einstellen

*10x SDS-Laufpuffer:* 0,25 M Tris, 28 mM SDS, 1,92 M Glycin in ddH<sub>2</sub>O; pH 8,3

Bevor die Proben auf das SDS-PA Gel geladen wurden, wurde ein Ladepuffer hinzugegeben, der SDS und Dithiothreitol enthält. Letzteres ist ein reduzierendes Reagenz, durch welches Disulfidbrücken im Proteinmolekül gespalten werden. Weiterhin wurden die Proben 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und die Sekundär- sowie Tertiärstrukturen dadurch aufgebrochen. Ein Größenmarker, bestehend aus Proteinen von bekannter Größe, wurde ebenfalls auf jedes SDS-PA Gel aufgetragen, um die Größe von Proteinen aus den Proben abschätzen zu können.

Zur Trennung der Proteine nach Molekülmasse wurde zu Beginn der Elektrophorese eine Spannung von 100 V angelegt. Sobald sich die Proteine im Trenngel befanden, wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Bei Verwendung der Mini-Protean® TGX Stain-free™ Precast Gele wurde eine konstante Spannung von 300 V angelegt. Der Bromphenolblau enthaltende Ladepuffer markiert die Lauffront der Proteine im Gel.

*SDS-Ladepuffer:* 80 mM Tris-HCl, 33% (v/v) Glycerol, 0,3 M DTT, 6,7% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Bromphenolblau; pH 6.8

### 2.3.2 Semi-Dry-Blot

Nach der Trennung von Proteinen nach Molekülmasse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) übertragen, um sie weiteren Analysen zugänglich zu machen. Bei diesem sogenannten Western Blot Verfahren wird senkrecht zum PA-Gel ein elektrisches Feld angelegt, welches die Migration von SDS-beladenen Proteinen zur Anode bewirkt. Hierzu wurde eine PVDF-Membran zunächst in Methanol getränkt, um die Hydrophobie der Membran zu mindern und den Kontakt mit dem Transferpuffer zu begünstigen. Anschließend wurde die Membran anodenseitig auf ein SDS-PA Gel zwischen in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren gelegt. Das entstandene Blotsandwich wurde anschließend zwischen zwei Elektroden, bestehend aus Graphit, gelegt und ein elektrischer Strom von 250 mA angelegt. Proben, welche auf ein Mini-Protean® TGX Stain-free™ Precast Gel aufgetragen wurden, wurden mithilfe des Trans-Blot® Turbo Kit Systems in einem Trans-Blot® Turbo Blotter (BioRad, München) auf eine PVDF Membran übertragen.

*Transferpuffer:* 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol; pH 8,3

### 2.3.3 Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf PVDF-Membranen

Nach der Immobilisierung von Proteinen auf einer PVDF-Membran wurden unspezifische Bindungsstellen während einer 30-minütigen Inkubation in TBS-T mit 5% Milchpulver oder 5% BSA blockiert. Im Anschluss daran wurde die Membran mit Protein- bzw. Epitop-spezifischem Primärantikörper unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur oder mindestens 16 Stunden bei 4 °C. Nach 3-maligem Waschen der Membran mit TBS-T folgte die Inkubation mit einem für den Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran erneut in TBS-T gewaschen. Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper waren entweder mit

einem HRP-Molekül oder einem DyLight 800 Molekül konjugiert. Das HRP-Konjugat katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion durch die Umsetzung von Dioxetanen in ihre oxidierte Form. Die Lumineszenzreaktion erfolgte durch Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid in gleichen Volumenprozenten. Die Detektion der Lumineszenz fand mittels Autoradiographie statt. Bei Verwendung des DyLight800-Konjugates hingegen war keine Zugabe von weiteren Substraten notwendig. Die Detektion wurde durch Anregung des Konjugates bei einer Wellenlänge im Infrarot-Bereich. Die Auswertungen HRP- und DyLight800-basierter Detektionen fanden an einem ChemiDoc<sup>TM</sup> Gel Imaging System (BioRad, München) statt.

*10 x TBS Puffer*: 200 mM Tris, 1,5 M NaCl in ddH<sub>2</sub>O; pH 7,4 mit rauchender HCl einstellen

*10 x TBS-T-Puffer*: 10 x TBS-Puffer, 1% (v/v) Tween20

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

### **2.4.1 Zellkultur**

#### **2.4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen**

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärennten Säugerzelllinien HEK293T und HeLa wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% (v/v) fötalem Rinderserum (FBS) und 100 U/mL Penicillin & 100 µg/mL Streptomycin kultiviert. Das Zellwachstum erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.4.1.2 Passagieren von Zellen**

Konfluente Zellkulturen wurden entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit nach 48 bzw. 72 Stunden passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium in einer Kulturschale abgenommen und der Zellrasen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit 1/10 des üblichen Kulturmediums mit Trypsin bedeckt und 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Zum Deaktivieren des Trypsins wurden die Zellen im Anschluss in Kulturmedium mit 10% (v/v) FBS und 100 U/mL Penicillin & 100 µg/mL Streptomycin resuspendiert. Schließlich wurde abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit 1/10 beziehungsweise 1/20 der Zellsuspension auf neue Kulturschalen verteilt und wiederum bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

*10 x PBS<sup>-/-</sup>*: 1,4 M NaCl, 26 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O; pH 7,4 mit NaOH einstellen

### 2.4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Säugerzellen können mehrere Jahre bei  $-150\text{ °C}$  eingefroren werden. Hierzu wurde der Zellrasen mithilfe von Trypsin von der Kulturschale gelöst und zunächst in DMEM mit 10% (v/v) FBS und 100 U/mL Penicillin & 100  $\mu\text{g/mL}$  Streptomycin aufgenommen. Die Zellen wurden im Anschluss durch Zentrifugation bei 900 Upm pelletiert, in DMEM mit 10% (v/v) FBS, 100 U/mL Penicillin & 100  $\mu\text{g/mL}$  Streptomycin sowie 10% (v/v) DMSO resuspendiert und in Kryo-Eppendorfgefäße zu je 1 mL Zellsuspension aliquotiert. Diese wurden für mindestens 24 Stunden in einem Gefäß mit Isopropanol bei  $-80\text{ °C}$  gelagert, um ein langsames behutsames Einfrieren zu gewährleisten. Für die längerfristige Lagerung wurden die Zellen bei  $-150\text{ °C}$  aufbewahrt.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese zunächst im Wasserbad bei  $37\text{ °C}$  aufgetaut und anschließend in ein Falcon mit vorgelegtem Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation pelletiert und das DMSO-enthaltene Medium verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen in Kulturmedium mit 10% (v/v) FBS und 100 U/mL Penicillin/ 100  $\mu\text{g/mL}$  Streptomycin aufgenommen und in einer Kulturschale im Brutschrank kultiviert.

### 2.4.2 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Turbofect

Als Transfektion wird in der Biologie das Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen bezeichnet. Es gibt verschiedene Verfahren zur Herstellung transient transfizierter Zellen und deren Verwendung ist jeweils abhängig von den Kulturbedingungen, den Anforderungen an die Zelllinie und der wissenschaftlichen Fragestellung. Besonders bewährt haben sich Methoden auf chemischer oder physikalischer Basis, wie zum Beispiel Elektroporation und Lipofektion. Letztere wurde in dieser Arbeit für transiente Transfektionen verwendet. Hierzu wurden eine Million der Zielzellen zunächst in einer Kulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm ausgelegt und über Nacht bei  $37\text{ °C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Im Anschluss wurde ein Transfektionsansatz aus 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und 10  $\mu\text{L}$  Turbofect Transfektionsreagenz in DMEM Kulturmedium ohne FBS hergestellt. Bei einer Ko-Transfektion von zwei unterschiedlichen Plasmiden werden jeweils 2,5  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Der Transfektionsansatz aus DNA und Turbofect Reagenz wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das FBS-haltige Kulturmedium der Zellen in den Kulturschalen durch DMEM ohne FBS ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz hinzugefügt. Nach 6 Stunden bei  $37\text{ °C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  wurde das Transfektionsmedium wiederum durch FBS-haltiges DMEM ausgetauscht und die Zellen wurden nochmals über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### 2.4.3 Stabile Transfektion mittels Elektroporation

Stabile Transfektionen von eukaryotischen Zellen wurden mithilfe des Neon<sup>®</sup> Transfection System (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zielzellen wurden hierfür bis zu einer finalen Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/mL in *Resuspension Buffer R* aufgenommen und anschließend zu 1 µg Plasmid-DNA hinzugegeben. Das Gemisch aus Zellen und DNA wurde daraufhin mithilfe einer Neon<sup>®</sup> Pipette in eine Neon<sup>®</sup> Tip überführt, welche im Anschluss in der Neon<sup>®</sup> Pipette Station platziert wird. Je nach Zelllinie konnte danach ein elektrischer Impuls mit unterschiedlicher Intensität und Dauer übertragen werden, wodurch es zu einer Fusion von Zellen und Plasmid-DNA kam. Der Reaktionsansatz wurde schlussendlich in eine 12-Loch Kulturplatte mit DMEM Kulturmedium mit 10% (v/v) FBS überführt und 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Selektion Plasmid-tragender Zellen durch Zugabe von 500 µg/mL Hygromycin B zum Kulturmedium, denn die transfizierte Plasmid-DNA vermittelt eine Resistenz gegenüber Hygromycin B. Zudem wurden die selektierten Zellen mittels FACS in eine 96-Loch Kulturplatte vereinzelt, um Kulturen aus Einzelzellklonen zu gewinnen. Diese wurden dann hinsichtlich der Expressionsstärke des Zielproteins kodiert von der transfizierten Plasmid-DNA mithilfe von Western Blot Analysen charakterisiert. Zellklone mit der stärksten Expression des Zielproteins wurden in weiterführenden proteinbiochemischen und zellbiologischen Untersuchungen verwendet.

### 2.4.4 Zellysate

Zur Analyse von exprimierten Proteinen in eukaryotischen Zellen wurden die Zielzellen kultiviert und je nach Fragestellung vorbehandelt. Im Anschluss wurde der Zellrasen zweimal mit kaltem PBS<sup>+/+</sup> gewaschen und danach, wenn nicht anders beschrieben, in 1 mL Lysepuffer zuzüglich Protease und Phosphatase Inhibitoren aufgenommen. Die Zusammensetzung des Lysepuffers war abhängig von der Fragestellung und dem Experiment. Nähere Informationen sind bei der jeweiligen Technik vermerkt. Gegebenenfalls wurden die Zellen 15 Minuten auf Eis mit dem Lysepuffer inkubiert, bevor Zelltrümmer und Zellkerne mittels Zentrifugation bei 14000 Upm von den löslichen Proteinen getrennt wurden.

*10 x PBS<sup>-/-</sup>*: 1,4 M NaCl, 26 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O; pH 7,4 mit NaOH einstellen

*1 x PBS<sup>+/+</sup>*: 10% 10 x PBS<sup>-/-</sup>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,52 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7,4 mit NaOH einstellen

### 2.4.5 HA-Immunopräzipitation

Zur Isolierung von HA-Fusionsproteine aus HeLa-Zelllysaten wurden magnetische Beads verwendet, an die ein HA-spezifischer Antikörper konjugiert war. Für jede Probe wurden 20  $\mu$ L Beads vorgelegt und 3-mal mit einem Kinase-Lysepuffer äquilibriert. Transient transfizierte HeLa Zellen wurden pelletiert, in 500  $\mu$ L Kinase-Lysepuffer aufgenommen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelllysate wurden anschließend 10 Minuten bei 14.000 Upm zentrifugiert, um Zelltrümmer und Zellkerne von den Proteinen im Überstand zu trennen. Die Proteinlösung wurde zusammen mit den vorbehandelten magnetischen Beads 2 Stunden bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden Beads erneut 3-mal mit 1 mL Kinase-Lysepuffer gewaschen, um daran gebundenes HA-Fusionsprotein für weitere Analysen vorzubereiten.

*Kinase-Lysepuffer:* 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT

### 2.4.6 EGFP-Trap

Zur Isolierung von EGFP-Fusionsproteinen aus Zelllysaten wurden GFP-Trap<sup>®</sup> Beads verwendet. Für jede Probe wurden 20  $\mu$ L Beads vorgelegt und 3-mal mit 1 mL kaltem Lysepuffer äquilibriert. Transient transfizierte HEK293T Zellen wurden pelletiert, in 750  $\mu$ L GFP-Trap-Lysepuffer aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelllysate wurden anschließend 10 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert, um Zelltrümmer und Zellkerne von den Proteinen im Überstand zu trennen. Die Proteinlösung wurde zusammen mit den vorbehandelten GFP-Trap<sup>®</sup> Beads 2 Stunden bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die GFP-Trap<sup>®</sup> Beads erneut 3-mal mit 1 mL GFP-Trap-Lysepuffer gewaschen, um daran gebundenes EGFP-Fusionsprotein für weitere Analysen vorzubereiten.

*GFP-Trap-Lysepuffer:* 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% (v/v) NP-40; pH 8

### 2.4.7 ADP-Glo<sup>™</sup> Kinase Assay

Das ADP-Glo<sup>™</sup> Kinase System (Promega) ist eine auf Lumineszenz basierende *in vitro* Technik, die es erlaubt, mittels der Quantifizierung von ADP, welches während einer Kinase oder ATPase Reaktion produziert wird, Rückschlüsse auf die Aktivität des ADP-generierenden Enzyms zu ziehen. Im Vorfeld an die Anwendung des ADP-Glo<sup>™</sup> Kinase Systems wurden Hela bzw. HEK293T Zellen mit Plasmid-DNA transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in Kinase-Lysepuffer bzw. GFP-Trap-Lysepuffer lysiert und das Zielprotein mittels HA-

Immunopräzipitation bzw. EGFP-Trap isoliert. Das auf den anti-HA magnetischen Beads bzw. auf EGFP-Beads immobilisierte Protein wurde danach in 10  $\mu$ L Kinasereaktionspuffer aufgenommen, ein Reaktionsansatz aus 150  $\mu$ M ATP, 200  $\mu$ M Peptidsubstrat sowie Reaktionspuffer hinzugefügt und 40 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Enzymreaktion einzuleiten. Die Kinase übertrug dabei eine Phosphatgruppe von ATP auf das Substrat unter Bildung von ADP. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz in eine 96-Loch-Platte überführt und 40 Minuten bei Raumtemperatur mit 25  $\mu$ L des ADP-Glo<sup>TM</sup> Reagenzes inkubiert, wodurch die Kinase Reaktion terminiert und übriges, nicht in der Reaktion verwendetes ATP depletiert wurde. Danach wurden für weitere 40 Minuten 50  $\mu$ L eines Kinase Detektionsreagenzes hinzugefügt. Dieses ermöglichte die Umwandlung von ADP in ATP. Das neu generierte ATP wurde im Rahmen des ADP-Glo<sup>TM</sup> Kinase Systems zur Aktivierung einer Luciferase/Luciferin Reaktion verwendet. Die resultierende Lumineszenz korrelierte entsprechend mit der Menge an ADP, die in der Kinase Reaktion umgesetzt wurde und war somit indikativ für die Kinase Aktivität.

*Kinase-Lysepuffer:* 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT

*GFP-Trap-Lysepuffer:* 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% (v/v) NP-40; pH 8

*Kinasereaktionspuffer:* 50 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,2 mM DTT; pH 7,5

#### **2.4.8 Immunfluoreszenz-Analysen**

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von EGFP-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen wurde die Immunfluoreszenz-Technik angewandt. Vorbereitend wurden hierzu 100.000 HeLa Zellen auf sterilen Deckgläschen in einer 12-Loch-Kulturschale kultiviert. Der Zellrasen wurde mit kaltem PBS<sup>+/+</sup> gewaschen und 10 Minuten mit 4% (w/v) PFA in PBS<sup>-/-</sup> bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS<sup>+/+</sup> wurden die Coverslips in ProLong<sup>TM</sup> Diamond Antifade Mountant mit DAPI (Invitrogen, Karlsruhe) auf einem Objekträger eingedeckt. Diese Proben wurden mindestens 24 Stunden nach Einbettung in Moviol bei 4 °C getrocknet. Die visuelle Analyse erfolgte auf einem SP8-Konfokalmikroskop (Leica).

#### **2.4.9 Proliferationsassay**

Das Proliferationsverhalten von eukaryotischen Zellen wurde mittels FACS-basierter Bestimmung der Zellzahl untersucht. Im Vorfeld wurden 10<sup>5</sup> stabil transfizierte HeLa Zellen in DMEM mit 10% (v/v) FBS pro Loch einer 12-Loch-Kulturplatte ausgelegt. Jeweils 24, 48 und 72 Stunden

danach wurde der Zellrasen geerntet und einmal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Die Zellen wurden in 175 µL PBS<sup>-/-</sup> aufgenommen und in ein FACS-Gefäß überführt. Unmittelbar vor der Analyse am FACS Gerät wurden außerdem 20 µL AccuCheck Counting Beads (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugegeben und die Suspension wurde 3 Sekunden mithilfe eines Vortexmischers gemischt. Es wurden insgesamt 2000 Beads gezählt und die absolute Anzahl an Zellen, welche während der Analysezeit die Messzelle passierten, wurde bestimmt.

#### **2.4.10 Synchronisation von eukaryotischen Zellen und Analyse von Regulatoren des Zellzyklus**

Für die intrazelluläre Analyse der Expression von Regulatoren des Zellzyklus war es zunächst erforderlich die Zielzellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus zu synchronisieren, bevor mit den Untersuchungen begonnen werden konnte. In dieser Arbeit wurden HeLa Zellen zur Expressionsanalyse von CDK2 und p21 im Übergang zwischen der G1- und S-Phase des Zellzyklus mittels eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Hierzu wurden 1 Million stabil transfizierte HeLa Zellen in DMEM mit 10% (v/v) FBS in einer 10 cm-Kulturschale kultiviert. Im Anschluss wurde das Kulturmedium durch Zugabe von 2 mM Thymidin komplettiert. Nach 18 Stunden Inkubation wurde der Zellrasen dreimal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und in Kulturmedium ohne Thymidin inkubiert, um die Blockierung des Zellzyklus in der G1/S-Phase aufzuheben. Anschließend erfolgte eine weitere 18-stündige Inkubation mit 2 mM Thymidin in Kulturmedium. Bevor die Expressionsanalyse der Zellzyklus Regulatoren beginnen konnte wurden die Zellen erneut für 8 Stunden in Kulturmedium ohne Thymidin inkubiert. Schlussendlich wurden die synchronisierten HeLa Zellen in RIPA-Puffer lysiert und die Expression von CDK2 und p21 mittels Western Blot analysiert.

*RIPA-Puffer:* 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 3,5 mM SDS, 12,7 mM DOC, 1% (v/v) NP-40, 0,5%; pH 8

## **2.5 Immunhistologie**

### **2.5.1 Einbettung von humanem Aortengewebe in Paraffin**

Zur Analyse der Expression bestimmter Zielproteine in histologischen Präparaten wurden immunhistologische Untersuchungen an humanem Gewebe der *Aorta ascendens* durchgeführt. Dieses wurde am Universitären Herz-Zentrum des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf einer weiblichen Patientin mit einem Aneurysma der *Aorta ascendens* (70 mm) und einer

mittelgradigen Aortenklappen-Insuffizienz im Zuge einer Operation zum Ersatz der *A. ascendens* und des Aortenbogens entnommen. Das Gewebe wurde direkt nach Entnahme in einer NaCl-Lösung aufbewahrt. Anschließend wurde es in einer 37%-igen Formaldehyd-Lösung für mindestens 24 Stunden fixiert. Es folgte die sukzessive Entwässerung des Gewebes mit Alkohol in steigender Konzentration und danach die Aufnahme in einem Intermedium, hier Xylol. Dieser Schritt wurde in einem Entwässerungsautomaten im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie am UKE durchgeführt. Das Xylol hat die Eigenschaft, dass es sich sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin mischt. Zur Einbettung in Paraffin wurde das Gewebe schließlich in erwärmtes, flüssiges Paraffin getränkt, so dass zuvor mit Wasser gefüllte Räume nun mit Einbettmedium gefüllt wurden. Das heiße Paraffin wurde abgekühlt, bis ein starrer Paraffinquader vorlag. Im Anschluss wurden 3 µm dicke Querschnitte der Aortenwand am Mikrotom hergestellt, die auf Glasobjektträger aufgezogen wurden.

### 2.5.2 Immunhistochemische Analysen

Alle Färbungen wurden mithilfe eines Färbeautomaten von Ventana BenchMark XT (Roche) und des *UltraView Universal DAB Detection Kits* (Roche) in der Mauspathologie Facility des UKEs durchgeführt. Analysen zur Detektion von CDKL1 wurden in einem CC1-Puffer (Roche) für 60 Minuten vorbehandelt. Präparate, die der Analyse von Aktin-Smooth-Muscle (ASM), Calponin und CD34 dienten, wurden hingegen 30 Minuten mit CC1-Puffer (Roche) inkubiert. Für die Färbung des STRO-1 Epitops wurde keine Vorbehandlung vorgenommen. Die Primärantikörper spezifisch für CDKL1, ASM, Calponin, CD34 und STRO-1 wurden in jeweiliger Konzentration, wie in Kapitel 1.8 des Materialabschnittes beschrieben, auf das fixierte Aortengewebe aufgetragen. Anschließend wurde das Gewebe mit Reaction Buffer (Roche) gewaschen und für die Inkubation mit den Sekundärantikörpern vorbereitet. Es wurden zwei Typen von Sekundärantikörpern verwendet: (a) *Horseradish* Peroxidase (HRP)- und (b) Alkalische Phosphatase (AP)-konjugierte Immunglobuline. HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurden mithilfe des *UltraView Universal DAB Detection Kits* (Roche) in brauner Farbe detektiert. Die Detektion von AP-konjugierten Sekundärantikörpern wurde mit dem *UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit* (Roche) durchgeführt. Diesbezüglich war eine rote Färbung zu beobachten.

Die Auswertung der Expression von CDKL1, ASM und Calponin erfolgte am *Slidescanner Nano Zoomer 2.OHT* (Hamamatsu) und mithilfe der Software *NanoZoomer Digital Pathology* (Hamamatsu). Bildaufnahmen zur Darstellung der Expression von CDKL1, CD34 und STRO-1 wurden am Apotome.2 (Zeiss) gemacht.

## 2.6 PamGene® Technologie

Zur Erstellung eines Kinase-Aktivität-Profiles von CDKL1 wurden Untersuchungen mithilfe eines PamGene®4-Mikroarrays durchgeführt. Diese Technologie basiert auf der Phosphorylierung von bekannten Peptiden durch Serin/Threonin- oder Tyrosin-Kinasen. In dieser Arbeit wurde die Aktivität von CDKL1, einer Serin/Threonin-Kinase, untersucht. Auf jedem der vier Arrays eines PamChip®4 sind 144 Peptide mit einer Länge von jeweils 13 Aminosäuren auf einer porösen Membran aus Keramik immobilisiert. Diese Peptide beinhalten Phosphorylierungsstellen, die für diverse Kinasen entweder in der Literatur beschrieben sind oder durch bioinformatische Analysen hervorgesagt wurden. Zur Detektion phosphorylierter Serine oder Threonine wurden phosphospezifische Primärantikörper und anschließend Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Fluoreszenz-Intensität wurde im Anschluss mithilfe einer CCD-Kamera ausgelesen.

### 2.6.1 Analyse des Kinase-Profiles von CDKL1 in HeLa-Zelllysaten

Zur Analyse des Kinase-Profiles von CDKL1 auf einem PamGene®4 Array wurden zunächst Zelllysate aus HeLa Zellen bei Überexpression von CDKL1 WT- oder mutantern Protein hergestellt. Die Aufarbeitung von Proteinen aus transient transfizierten eukaryotischen Zellen wurde dabei mithilfe des M-PER Mammalian Extraction Kit Systems (PamGene®, Hertogenbosch, NL) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die HeLa-Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, anschließend in jeweils 100 µL Extraktionspuffer, bestehend aus M-PER Mammalian Extraction Buffer und einer 1:100 Verdünnung des Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail sowie des EDTA-freien Halt Protease Inhibitor Cocktail, aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden im Anschluss zentrifugiert und der Überstand zuerst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C aufbewahrt. Die Protein-Konzentration wurde mithilfe eines BCA-Protein Assays (Pierce) nach Herstellerangaben bestimmt. Mittels Western Blot Analysen wurde die Überexpression von CDKL1 überprüft. Im Anschluss wurden jeweils 1 µg Gesamtprotein mit 4 mM ATP und einem Antikörper-Mix zur Detektion von phosphorylierten Serinen und Threoninen im PamGene® Reaktionsansatz auf einem PamGene®4-Array eingesetzt. Die Analyse des Kinase-Profiles wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Präprozessierung des PamGene®4-Arrays sowie die anschließende Kinase-Profil-Analyse auf einer PamStation®12 wurde durch Herrn Dr. Malte Kriegs und Herrn Konstantin Hoffer im Labor für Strahlenbiologie & experimentelle Radioonkologie (UKE) durchgeführt.

### **2.6.2 Analyse des Kinase-Profiles von rekombinantem CDKL1 und CDKL5**

Das Kinase-Profil von aufgereinigtem, rekombinantem CDKL1 und CDKL5, welche durch einen Baculovirus in Sf9-Insektenzellen exprimiert wurden, wurde ebenfalls auf einem PamGene<sup>®</sup>4 Microarray analysiert. Zunächst wurde in einer Analyse zur Vorbereitung auf die Untersuchung der Aktivität von CDKL1 und CDKL5 eine Titration mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,05 µg, 0,1 µg, 0,15 µg und 0,2 µg) durchgeführt. Anschließend wurde die Analyse des Kinase-Profiles mit 0,2 µg CDKL1 bzw. CDKL5 und 4 mM ATP auf einem PamGene<sup>®</sup>4 Array in Triplikaten von Herrn Dr. Malte Kriegs und Herrn Konstantin Hoffer im Labor für Strahlenbiologie & experimentelle Radioonkologie (UKE) durchgeführt.

### **2.7 Statistik**

Für alle statistischen Analysen wurde die Software GraphPad Prism 8 verwendet. Vor der Anwendung eines parametrischen/nicht-parametrischen statistischen Tests wurden die Rohdaten, d.h. z.B. die relativen Signalstärken bei der autoradiographischen Auswertung einer Western Blot Analyse, normalisiert, um etwa Expressionsunterschiede zwischen unabhängigen Messreihen auszugleichen. Für experimentelle Gruppen mit mehr als zwei Messreihen wurde ein One-way Anova angewandt. Bei zwei Messreihen wurde jeweils ein t-Test verwendet. Welche statistische Analyse im Einzelfall verwendet wurde, ist bei den jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil beschrieben. Als statistisch signifikant wurden Datensätze mit p-Werten < 0,05 gewertet.

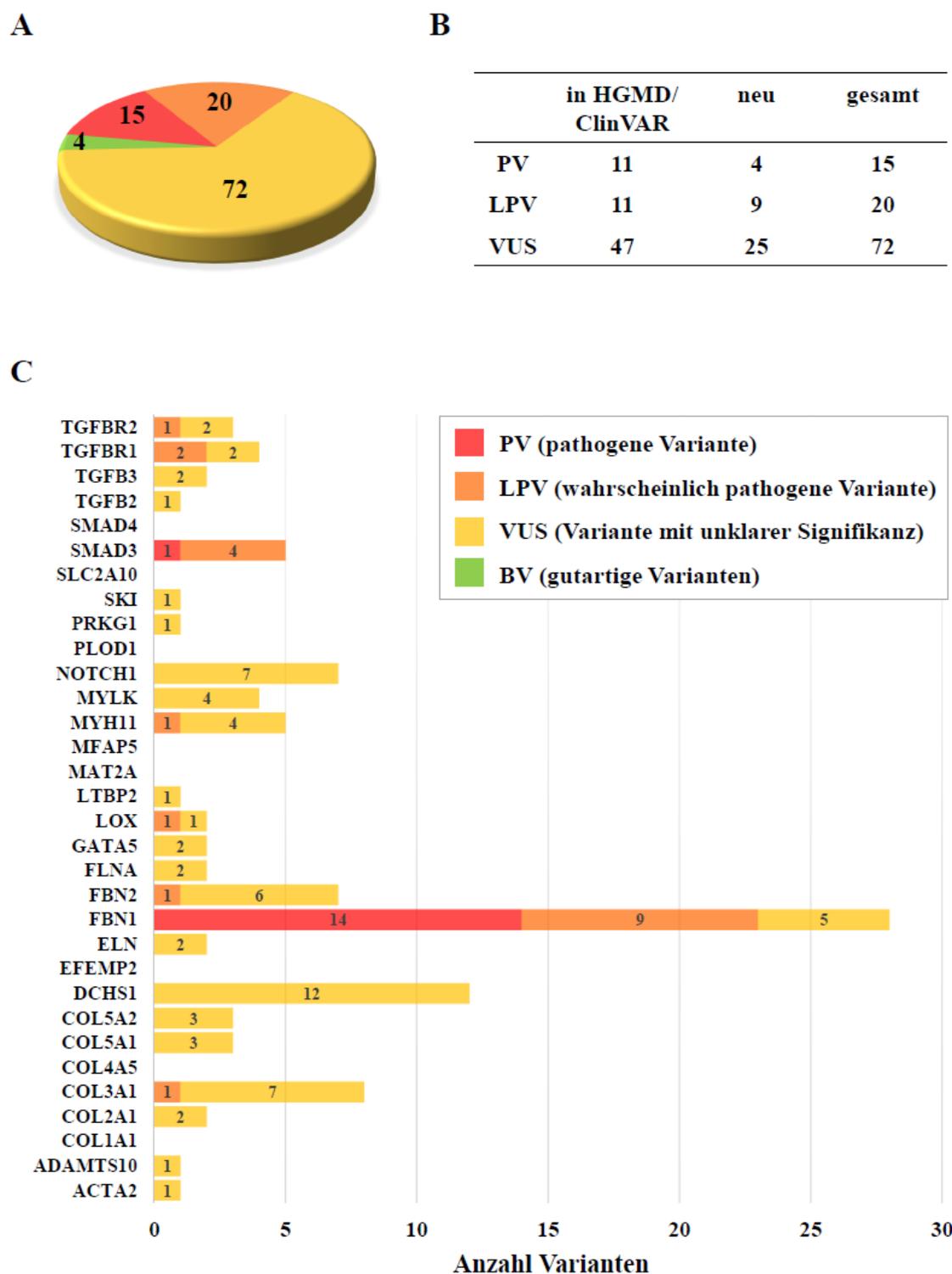
## VI. Ergebnisse

### 1. NGS-basierte Analyse von 32 Genen in 199 Patienten mit einer hereditären Aortopathie oder assoziierten Erkrankungen des Bindegewebes

In dieser Arbeit wurden 199 Patienten mit einer hereditären Aortopathie oder ähnlichen Erkrankung aus dem Formenkreis der Bindegewebskrankheiten hinsichtlich einer Sequenzveränderung in 32 ausgewählten Genen untersucht. 152 Patienten wurden mittels zielgerichteter NGS (*targeted* NGS; tNGS)-basierter Gen-Panel-Analyse und 47 Patienten wurden mit Hilfe einer exomweiten Hochdurchsatzsequenzierung (ES) analysiert. Unter ihnen waren 57 Patienten mit Verdacht auf ein MFS, 3 Patienten mit LDS, 6 Patienten mit EDS, ein Patient mit CCA, 71 Patienten mit TAAD sowie 61 Patienten mit HCTD. Bei 16 Patienten wurden zusätzliche kardiovaskuläre Abnormalitäten, wie bikuspidе Aortenklappen (3 Patienten), Mitralklappenprolaps (5 Patienten), Aneurysmen der abdominalen Aorta (2 Patienten), Aneurysmen oder Dissektionen der Carotiden (4 Patienten) und intrakranielle Aneurysmen sowie subarachnoide Blutungen (2 Patienten) diagnostiziert.

#### 1.1 Identifizierung und Klassifizierung von Sequenzveränderungen

In der Studienkohorte von 199 Patienten wurden insgesamt 111 Varianten identifiziert, die eine geringere Allelfrequenz als die Prävalenzen der jeweils mit dem gegebenen Gen assoziierten Erkrankung aufwiesen (Abb. 11A). In 8 der 32 Gene wurden keine Varianten detektiert. Hierzu zählten *COL1A1*, *COL4A5*, *EFEMP2*, *MAT2A*, *MFAP5*, *PLOD1*, *SLC2A10* sowie *SMAD4*. Unter Berücksichtigung der ACMG/AMP-Richtlinien zur Klassifizierung von Varianten wurden 15 Varianten als krankheitsursächlich (*pathogenic variant*; PV), 20 Varianten als wahrscheinlich krankheitsursächlich (*likely pathogenic variant*; LPV) und 72 Varianten mit unbekannter Signifikanz (*variant of unknown significance*; VUS) definiert. Zusammengenommen waren dies 107 berichtenswerte Varianten (PV, LPV, VUS), die in der Tab. 7 des Appendix beschrieben sind. Vier weitere Varianten wurden als wahrscheinlich gutartig (*likely benign variant*; LBV) klassifiziert (Abb. 11A; Tab. 8 im Appendix). Diese wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. In der Gruppe der 107 berichtenswerten Varianten wurden 67 Missense-Varianten, 7 Indels (Insertionen/Deletionen; 6 von diesen verursachen eine Verschiebung des Leserahmens), 13 intronische Veränderungen, 3 Nonsense-Varianten, 13 synonyme Varianten sowie 2 Varianten im 5'UTR, eine Genduplikation und eine Spleißstellenveränderung detektiert.



**Abb. 11: Zusammenfassung von 111 identifizierten Sequenzveränderungen in 32 analysierten Genen.** 199 Patienten wurden mittels zielgerichteter NGS-Diagnostik analysiert. In 24 Genen wurden insgesamt 111 Varianten identifiziert und nach ACMG/AMP-Richtlinien klassifiziert. **A:** Anzahl der identifizierten Varianten. Es wurden 15 PV, 20 LPV, 72 VUS und 4 BV aufgedeckt. **B:** Bekannte und neue PV, LPV und VUS. **C:** Verteilung berichtenswerter Varianten in den 32 analysierten Genen. In den Genen *COL1A1*, *COL4A5*, *EFEMP2*, *MAT2A*, *MFAP5*, *PLOD1*, *SLC2A10* und *SMAD4* wurden keine Varianten identifiziert.

In der Gruppe krankheitsursächlicher Varianten (PV) waren 11 bereits in den Datenbanken ClinVar oder HGMD beschrieben, 4 waren bislang unbekannt (Abb. 11B). Zudem wurden 9 neue LPV und 25 neue VUS identifiziert. (Abb. 11B) Die Mehrzahl (wahrscheinlich) krankheitsursächlicher Varianten (PV und LPV) wurde absteigend in den Genen *FBNI*, *SMAD3*, *TGFBR1*, *FBN2*, *COL3A1*, *LOX*, *MYH11* und *TGFBR1* identifiziert (Abb. 11C). Die meisten VUS wurden in *DCHS1*, *COL3A1*, *NOTCH1*, *FBN2* und *FBNI* aufgedeckt (Abb. 11C).

## 1.2 Retrospektive Analyse gesamtexomischer Daten und Identifizierung von Varianten in *LOX*

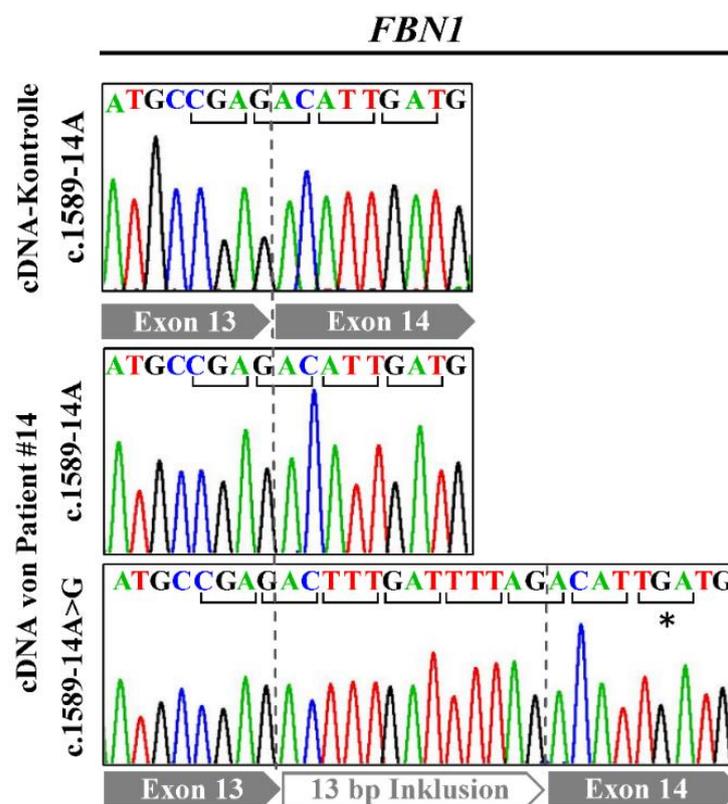
Die Verfügbarkeit gesamtexomischer Daten von 47 Patienten ermöglichte die retrospektive Analyse von Sequenzveränderungen in weiteren Krankheits- und Kandidatengenen für hereditäre Aortopathien, wie etwa des *LOX*-Gens.

Bei einem 48-jährigen Patienten (#13) mit der Verdachtsdiagnose Loeys-Dietz Syndrom, basierend auf einem Aortenaneurysma, durchscheinender Haut, Neigung zu Hämatomen, Hernien und rezidivierenden Verletzungen der Knöchelbänder, wurde eine Variante im *LOX* Gen aufgedeckt. Die Variante *LOX* c.995A>G (p.Tyr332Cys) ist in der Datenbank gnomAD nicht verzeichnet. Die Veränderung betrifft eine Aminosäure in der katalytischen Domäne des *LOX*-Proteins. Das *in silico* Pathogenitäts-Programm ClinPred sagte eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion, hervorgerufen durch den Aminosäureaustausch eines Tyrosins zu einem Cystein an Proteinposition 332, vorher. Die *in silico* Programme REVEL und M-CAP errechneten einen Score unter den empfohlenen Cut-Offs für pathogene Varianten. Dahingehend wurde die *LOX*-Variante des Patienten #13 als VUS (PM1+PM2+PM4) klassifiziert (Tab. 7, Appendix).

Ein 23-jähriger Patient (#188) mit TAAD wurde ebenfalls mittels gesamtexomischer Sequenzierung analysiert. Bei dem Patienten wurde neben einer VUS in *FBN2* eine Nonsense-Variante in *LOX* aufgedeckt [*LOX* c.125G>A (p.Trp42\*)], die nicht in der Datenbank gnomAD aufgeführt ist. Eine Beteiligung von Nonsense-Varianten im *LOX*-Gen an der Pathogenese der vorliegenden Erkrankung ist bekannt.<sup>114</sup> In dieser Arbeit wurde die *LOX*-Variante des Patienten #188 als LPV (PVS1*strong*+PM2) klassifiziert (Tab. 7, Appendix).

### 1.3 Transkriptanalyse der intronischen *FBNI* c.1589-14A>G Variante

Für die bisher in keiner Datenbank verzeichnete intronische Variante *FBNI* c.1589-14A>G wurden die Auswirkungen auf das Spleißen der prä-mRNA mittels einer Transkriptanalyse untersucht. Die Variante wurde bei einem Patienten (#14) mit klinischen Merkmalen eines Marfan Syndroms und einer positiven Familienanamnese für TAAD identifiziert. *In silico* Analysen mittels der Programme HSF und MaxEntScan sagten die Aktivierung eines kryptischen Spleiß-Akzeptors vorher. Mithilfe einer Transkriptanalyse sollten die Auswirkungen auf das Spleißen der prä-mRNA des Patienten #14 im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle experimentell untersucht werden.

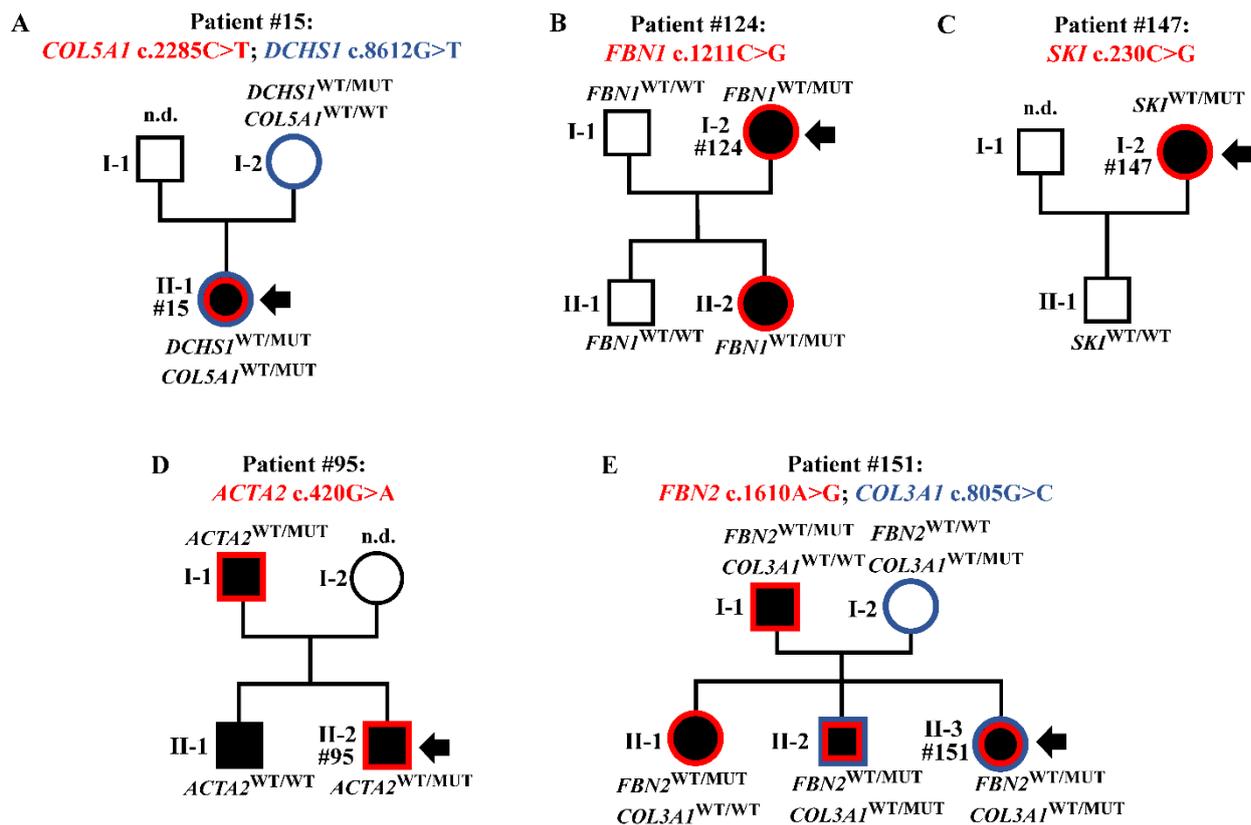


**Abb. 12: Transkriptanalyse für die Sequenzveränderung *FBNI* c.1589-14A>G (Patient #14).** *First-strand* cDNA wurde aus isolierter RNA des Patienten #14 und einer gesunden Kontrolle synthetisiert und als Template für die Amplifikation von den Sequenzbereich betreffenden *FBNI* Transkriptregionen verwendet. Nach Subklonierung der Amplikons und Transformation in kompetente *E.coli*, wurden einzelne Kolonien einer Kolonie-PCR unterzogen und die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Dargestellt sind partielle Sequenzelektropherogramme der Exons 13 und 14 des *FBNI* Gens von der cDNA einer gesunden Kontrolle sowie von der cDNA des Patienten #14. Die Sequenzanalyse der cDNA des Patienten zeigt eine 13-Nukleotid lange Expansion des 5'-Endes von Exon 14. Die 13 Nukleotide stammen vom 3'-Ende des Introns 13. Die Expansion von Exon 14 wurde bei der gesunden Kontrolle nicht nachgewiesen. Die Basenabfolge ist über dem Elektropherogramm in farblicher Kodierung dargestellt. Der Leserahmen, gegeben durch die Abfolge von Trinukleotiden, welche für je eine Aminosäure kodieren, ist durch eckige Klammern verdeutlicht. Das vorzeitige Stop-Codon ist mit einem Sternchen markiert.

Nach RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, PCR-Amplifikation und Subklonierung von DNA-Fragmenten des betreffenden Sequenzbereiches wurden bei der cDNA des Patienten #14 *FBNI* Transkripte identifiziert, welche eine 13-Nukleotid lange Expansion am 5'-Ende des Exons 14 aufwiesen (Abb. 12). Die beobachtete Expansion führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und in Folge zu einem vorzeitigen Stop-Codon (p.Ile531Phefs\*6). Dahingehend wurde die intronische *FBNI* c. 1589-14A>G Variante als LPV (PS3+PM2+PP3+PP4) klassifiziert (Tab. 7, Appendix).

#### 1.4 Familiäre Segregationsanalysen ausgewählter Varianten

Für 7 identifizierte Sequenzvarianten wurde eine familiäre Segregationsanalyse bei Familienangehörigen durchgeführt. Bei Patient #15 mit klinischen Manifestationen einer Bindegewebserkrankung und Aneurysma sowie Dissektion der Carotiden wurden die Varianten *COL5A1* c.2285C>T und *DCHS1* c.8612G>T detektiert. In der gesunden Mutter (Abb. 13A: I-2) des Patienten wurde die Variante in *DCHS1*, jedoch nicht die *COL5A1* Variante aufgedeckt. Bei Patientin #124 mit HCTD wurde die Variante *FBNI* c.1211C>G identifiziert. Diese wurde ebenfalls bei der Tochter (Abb. 13B: II-2) der Patientin #124 nachgewiesen. Die bei Patientin #147 mit TAAD identifizierte Variante *SKI* c.230C>G wurde bei ihrem gesunden Sohn (Abb. 13C: II-1) nicht detektiert. Die Ergebnisse aus den Segregationsanalysen in Familien der Patienten #15, #124 und #147 waren mäßig informativ und wurden daher bei der Verfeinerung der Varianten-Klassifizierung nicht berücksichtigt. In der Familie von Patient #95 mit HCTD wurden der Vater (Abb. 13D: I-1) und der Bruder (Abb. 13D: II-1) des Indexpatienten, welche Manifestationen einer HCTD aufweisen, bezüglich der synonymen Sequenzveränderung *ACTA2* c.420G>A analysiert: Es wurde keine Kosegregation dieser Variante mit der Erkrankung in der Familie festgestellt. In der Familie der Patientin #151 mit Verdacht auf Kongenitale Kontrakturale Arachnodaktylie (CCA; *congenital connective arachnodaktylie*) wurde keine Kosegregation der *COL3A1* c.805G>C Variante mit der Erkrankung - betroffene Familienmitglieder zeigen klinische Manifestationen, die auf eine Bindegewebserkrankung hindeuten - beobachtet (Abb. 13E). Allerdings wurde die *FBN2* c.1610A>G Variante bei der Indexpatientin, ihren zwei erkrankten Geschwistern (Abb. 13E: II-1, II-2) und ihrem erkrankten Vater (Abb. 13E: I-1), nicht aber bei ihrer gesunden Mutter (Abb. 13E: I-2) detektiert. Daher wurde die Variante *FBN2* c.1610A>G nachträglich von einer VUS zu einer LPV reklassifiziert.



**Abb. 13: Segregationsanalysen bei Familienangehörigen der Patienten #15, #124, #147, #95 und #151.**

**A.** Segregation der *COL5A1* c.2285C>T (rot) und *DCHSI* c.8612G>T (blau)Varianten in der Familie des Patienten #15 (II-1, markiert mit einem Pfeil). Die Mutter (I-2) des Patienten #15 trägt ebenfalls die Variante in *DCHSI* (blau). **B.** Segregation der *FBNI* c.1211C>G Variante (rot) in der Familie des Indexpatienten #124 (I-2, markiert mit einem Pfeil). Eine betroffene Familienangehörige (II-2) trägt ebenfalls die *FBNI* c.1211C>G Variante (rot). **C.** Segregation der *SKI* c.230C>G Variante (rot). Der Sohn der Indexpatientin #147 (I-2, markiert mit einem Pfeil), trägt die *SKI* c.230C>G Variante nicht. **D.** Segregation der *ACTA2* c.420G>A (rot) Variante in der Familie des Indexpatienten #95 (II-2, markiert mit einem Pfeil). Die Erkrankung segregiert nicht mit der heterozygoten *ACTA2* Variante bei den betroffenen Personen (I-1, II-1 und II-2). **E.** Segregation der *FBN2* c.1610A>G (rot) und *COL3A1* c.805G>C (blau) Variante in der Familie der Indexpatientin #151 (II-3, markiert mit einem Pfeil). Alle betroffenen Personen (I-1, II-1, II-2 und II-3) dieser Familie tragen die *FBN2* c.1610A>G (rot), nicht aber die *COL3A1* c.805G>C Variante (blau). MUT, mutiertes Allel; WT, Wildtyp Allel; ●■, erkrankt; ○□, gesund.

## 1.5 Reklassifizierung von Varianten

In dieser Studie wurden insgesamt 19,8% aller identifizierter Varianten reklassifiziert. Dies traf auf 21 Varianten, die bereits in den Datenbanken HGMD und ClinVar verzeichnet sind, sowie auf eine noch nicht in der Literatur beschriebene Variante zu. In der Tab. 7 des Appendix sind Unterschiede in der Klassifizierung von bereits in HGMD und ClinVar beschriebenen Varianten durch „d.c.“ (*discordant classification*) gekennzeichnet. Alle diskordanten Varianten sind zudem in Tab. 9 des Appendix beschrieben. Durch Anwendung der ACMG/AMP- Richtlinien zur

Klassifizierung von Sequenzvarianten wurde bei jeweils 12 bzw. 14 Varianten eine abweichende Bewertung zu der Beurteilung in HGMD bzw. ClinVar beobachtet. Sieben Varianten, welche in HGMD als DM (*disease causing mutation*, krankheitsursächliche Variante) aufgeführt sind, wurden in dieser Arbeit als LPV klassifiziert. Weiterhin wurden eine in HGMD beschriebene DM sowie zwei DM(?) (*likely disease causing mutation*, wahrscheinlich krankheitsursächliche Variante) auf Varianten mit unklarer Signifikanz (VUS) herabgestuft. Im Gegenzug wurden zwei als DM(?) verzeichnete Varianten in dieser Studie als PV klassifiziert. 3 Varianten wurden von der ClinVar Klassifizierung „krankheitsrelevant“ auf LP, sowie 1 Variante mit unklarer Signifikanz zu einer LBV herabgestuft. Die krankheitsrelevanten Auswirkungen von 10 weiteren Varianten wurden in dieser Studie höher eingestuft als in der ClinVar Datenbank. LBV bzw. VUS wurden zu VUS respektive LPV reklassifiziert.

Die Variante *FBN2* c.1610A>G, welche im Patienten #151 identifiziert wurde, wurde nachträglich aus folgenden Gründen von einer VUS zu einer LPV reklassifiziert: Da die Variante in 4 Familienangehörigen mit der Erkrankung kosegregiert (Abb. 13E), wurde bei der Klassifizierung die ACMG-Kategorie PP1 mit moderater Gewichtung hinzugefügt. Darüber hinaus wurde beim Patienten #151 die Differentialdiagnose Kongenitale Kontrakturale Arachnodaktylie (CCA) gestellt, und nach bisherigem Kenntnisstand sind Varianten in *FBN2* die spezifische genetische Ursache für diesen Phänotyp,<sup>204</sup> daher wurde die Bewertung der Variante in *FBN2* bei dem Patienten #151 durch den ACMG-Parameter PP4 ergänzt. Die Nonsense-Sequenzvariante in *LOX* c.125G>A (p.Trp42\*), die bei dem Patienten #188 identifiziert wurde und nicht in der Datenbank gnomAD verzeichnet ist, wurde initial als VUS interpretiert. Da die gleiche Variante ebenfalls bei zwei verwandten Patienten mit TAAD und zudem eine weitere Nonsense-Variante (p.Gly202\*) bei einem Patienten mit familiärer TAAD beschrieben wurden,<sup>114</sup> wurde die ACMG-Kategorie PVS1 mit starker Gewichtung (*PVS1<sub>strong</sub>*) bei der Klassifizierung ergänzt.

## 1.6 Analyse von einhergehenden Varianten

Die 107 berichtenswerten Varianten wurden in 81 von 199 analysierten Patienten identifiziert. Die Differenz zwischen der Anzahl an Varianten und der Anzahl mutationspositiver Patienten ist damit zu erklären, dass einige Patienten mehrere PV, LPV und/oder VUS tragen. Dies traf auf 25 Patienten zu. Bei 4 Patienten wurden eine PV und 1 oder 2 zusätzliche VUS detektiert. Ein Patient wies 2 LPV und 2 VUS auf. Ein weiterer Patient hatte 2 LPV und bei 5 Patienten wurden neben einer LPV eine VUS aufgedeckt. Bei 14 Patienten wurden 2 VUS identifiziert (Tab. 10 im

Appendix). In Tab. 2 ist beschrieben, in welchen Genen die einhergehenden Varianten bei den jeweiligen Patienten identifiziert wurden.

Vier Patienten (#14, #126, #142, #162) trugen je eine Variante in *FBNI* und *NOTCH1* (Tab. 2). Patient #14 ist 44 Jahre alt. Bei ihm wurde die Verdachtsdiagnose Marfan Syndrom geäußert. Familienangehörige weisen ebenfalls einen marfanoiden Phänotyp auf. Der Patient hat Aneurysmen am Aortenbulbus, ein positives Daumen-Handgelenkszeichen, Hochwuchs, Asymmetrie des Brustkorbes, eine geringe thorakale Skoliose, faziale Dysmorphien, Dehnungsstreifen sowie eine Duraektasie. Mit 15 Jahren wurde bei ihm zudem ein Spontanpneumothorax festgestellt. Bei ihm wurde eine LPV in *FBNI* und eine VUS in *NOTCH1* aufgedeckt. Die 57-jährige Patientin #126 erhielt ebenfalls die Verdachtsdiagnose Marfan Syndrom bei positiver Familienanamnese, basierend auf einem Aneurysma des Aortenbulbus, Skoliose, positivem Daumenzeichen, Missverhältnis der Armspanne zur Körpergröße, hohem gotischen Gaumen, Dehnungsstreifen und einer Duraektasie. Sie trägt eine PV in *FBNI* sowie eine LPV in *NOTCH1*. Ein weiterer Patient (#142), 53 Jahre alt und keine Anzeichen für eine familiär bedingte Erkrankung, trägt 2 LPVs in *SMAD3* sowie jeweils eine VUS in *FBNI* und *NOTCH1*. Sein Krankheitsbild zeichnet sich durch ein Aneurysma am Aortenbulbus, einen Mitralklappenprolaps, milde Skoliose und einen hohen gotischen Gaumen aus. Weiterhin wies er eine Blutung in den subarachnoiden Raum auf. Der vierte Patient (#162) mit einer PV in *FBNI* und einer VUS in *NOTCH1* war zum Zeitpunkt der Analyse 29 Jahre alt und erhielt die Verdachtsdiagnose Marfan Syndrom mit positiver Familienanamnese. Der Phänotyp basierte auf einem Aneurysma der Aortenwurzel, einem Mitralklappenprolaps, Aorteninsuffizienz, einer erweiterten Lungenarterie, einem Missverhältnis der Armspanne zur Körpergröße, Kielbrust, Skoliose, hohem gotischen Gaumen, kraniofazialen Dysmorphien, Ektopia lentis, Linsentrübung und einer Duraektasie. Zusammengefasst, sind die klinischen Manifestationen der vier Patienten mit Varianten in *FBNI* und *NOTCH1* weder atypisch für das Krankheitsbild hereditärer Aortopathien, noch sind die einzelnen Charakteristika außergewöhnlich stark ausgeprägt. Des Weiteren wies keiner der vier Patienten eine bikuspidale Aortenklappe auf, die durch eine Variante in *NOTCH1* zu erklären wäre.<sup>205</sup>

Die Hochdurchsatzsequenzierung bei den Patienten #97, #138, #151, #161 und #188 deckte jeweils neben einer PV oder LPV zudem eine VUS auf (Tab. 2). Die Phänotypen unterschieden sich jedoch im Wesentlichen nicht von Phänotypen klassischer monogener Bindegewebserkrankungen: Patient #97, 68 Jahre alt, hatte eine Dissektion der *Aorta ascendens* sowie eine Trichterbrust, einen hohen gotischen Gaumen und Hochwuchs. Die Verdachtsdiagnose lautete TAAD. Der 30-jährige Patient #138 hatte mit 20 Jahren eine Dissektion der *Aorta*

*ascendens*, später eine Dissektion der Carotiden; er weist ein Aneurysma der abdominalen Aorta, einen hohen gotischen Gaumen, Skoliose, Plattfüße und eine Duraektasie auf. Patientin #151 war zum Zeitpunkt der Analyse 13 Jahre alt. Das Erkrankungsbild des Mädchens zeichnete sich durch ein positives Daumenzeichen, Überbeweglichkeit der Gelenke, Skoliose, Plattfüße und Astigmatismus aus. Neben der Indexpatientin wurde auch bei drei weiteren Familienangehörigen die Verdachtsdiagnose auf eine hereditäre Erkrankung des Bindegewebes gestellt. Der 51-jährige Patient #161 hatte ein Aortenaneurysma mit schwerer Aorteninsuffizienz, Skoliose, ein Missverhältnis der Armspanne zur Körpergröße, ein positives Daumen-Handgelenkszeichen, einen hohen gotischen Gaumen sowie eine Duraektasie. Es wurde der Verdacht auf ein Marfan Syndrom oder Loeys-Dietz Syndrom geäußert. Patient #188, 23 Jahre alt, mit Verdacht auf nicht-familiäres TAAD, erlitt ein Aortenaneurysma sowie eine Dissektion der *Aorta ascendens*; die *Aorta ascendens* wurde bei ihm chirurgisch ersetzt. Bei 12 weiteren Patienten (#15, #46, #64, #88, #103, #128, #139, #140, #145, #166, #181, #182) wurden 2 VUS in je zwei unterschiedlichen Genen identifiziert (Tab. 2). Zudem wurden bei 4 Patienten je zwei Varianten in demselben Gen beobachtet. Patient #91 mit initialer Diagnose TAAD und negativer Familienanamnese trug eine PV und eine VUS in *FBNI*. Bei den Patienten #111 und #125 – jeweils mit positiver Familienanamnese - wurden je zwei VUS in *DCHSI* aufgedeckt; bei beiden Patienten wurde die Verdachtsdiagnose TAAD geäußert. Patient #127, ebenfalls mit der Verdachtsdiagnose TAAD, aber negativer Familienanamnese, trug zwei LPV in *FBNI*. Es wurde nicht untersucht, ob die zwei Varianten in *cis* oder *trans* (d. h. auf einem oder auf unterschiedlichen Chromosomen) vorliegen.

Tab. 2: Einhergehende Varianten bei 25 Patienten.

Patient	Initial- und Differential-diagnose; Familien-anamnese (FA)	ADAMTS10	COL2A1	COL3A1	COL5A1	DCHS1	FBN1	FBN2	LOX	LTP2	MYH11	MYLK	NOTCH1	PRKG1	SMAD3	TGFB3	TGFBRI	TGFBR2
#14	MFS; FA pos. (TAAD)						LPV						VUS					
#126	MFS; FA pos. (MFS)						PV	VUS					VUS					
#142	HCTD, TAAD, SAH; FA neg.						VUS						VUS		LPV† LPV†			
#162	MFS; FA pos. (MFS)						PV						VUS					
#97	TAAD; FA pos. (TAAD)										LPV	VUS						
#138	TAAD; FA neg.					VUS												LPV
#151	HCTD, CCA; FA pos. (HCTD, MFS)			VUS				LPV										
#161	MFS, LDS; FA pos. (MFS, LDS)						PV				VUS							
#188	TAAD; FA neg.							VUS	LPV									
#15	HCTD, CAAD; FA neg.				VUS	VUS												
#46	HCTD; FA pos. (ARUP)	VUS						VUS										
#64	TAAD, EDS (VASK); FA neg.			VUS							VUS							
#88	TAAD, BAV; FA neg.				VUS							VUS						
#103	TAAD; FA pos. (TAAD)			VUS									VUS					
#128	MFS, MVP; FA n.f.		VUS							VUS								
#139	TAAD; FA pos. (TAAD)		VUS	VUS														
#140	TAAD; FA pos. (TAAD, IA)										VUS			VUS				
#145	TAAD, CCA; FA pos. (IA)					VUS		VUS										
#166	LDS, BAV; FA neg.				VUS													VUS
#181	MFS; FA pos. (MFS)					VUS												VUS
#182	HCTD; FA pos. (TAAD)					VUS							VUS					
#91	TAAD; FA neg.						PV*											VUS*
#111	TAAD; FA pos. (TAAD)					VUS*												VUS*
#125	TAAD; FA pos. (ARUP)					VUS*												VUS*
#127	TAAD; FA neg.						LPV*											LPV*

**Legende zur Tab. 2:**

Einhergehende Varianten, einschließlich krankheitsursächlicher (PV) und wahrscheinlich krankheitsursächlicher Varianten (LPV) sowie Varianten mit unklarer Signifikanz (VUS), sind bei den jeweiligen Patienten betreffend aufgelistet. Initial- und gegebenenfalls Differentialdiagnose sind für jeden Patienten angegeben.

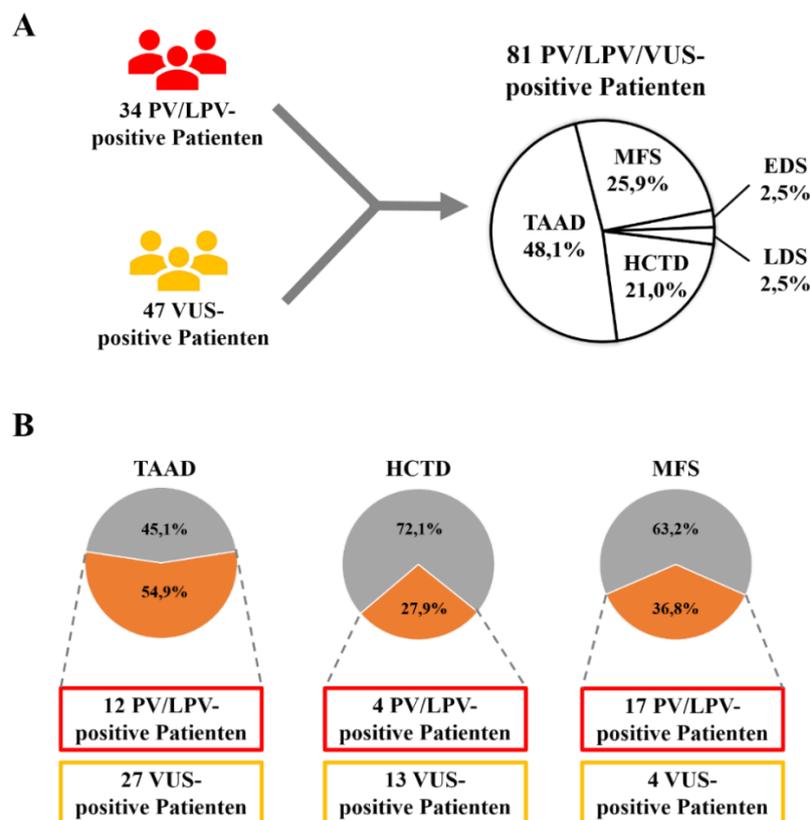
Familienanamnese positiv: FA pos., Familienanamnese negativ: FA neg., Familienanamnese unbekannt: FA n.f. (nicht festgestellt). Im Falle einer positiven Familienanamnese ist die Verdachtsdiagnose für das betroffene Familienmitglied in Klammern angegeben. HCTD (*hereditary connective tissue disorder*), hereditäre Bindegewebserkrankung; TAAD, Thorakale(s) Aortenaneurysma und Aortendissektion; ARUP (*aortic rupture*), Aortenruptur; MFS, Marfan Syndrom; EDS (VASK); Ehlers-Danlos Syndrom (vaskulärer Typ); LDS, Loeys-Dietz Syndrom; CCA (*congenital connective arachnodaktylie*), kongenitale kontrakturale Arachnodaktylie; CAAD, Carotidarterien Aneurysma und Dissektion; IA, intrakranielle Aneurysma; SAH (*subarachnoid hemorrhage*), Subarachnoidalblutung (=Blutungen im subarachnoiden Raum). \*, *cis-trans* Relationen wurden nicht analysiert; †, Varianten liegen in *cis* vor.

**1.7 Diagnostische Ausbeute**

Bei 34 von 199 Patienten (17,1%) wurde eine PV oder LPV aufgedeckt. Die höchste diagnostische Ausbeute von 29,8% (17/57 Patienten mit PV/LPV) wurde in der klinischen Subkohorte von Patienten mit MFS beobachtet (Tab. 3). Unter Berücksichtigung aller berichtenswerter Varianten (PV, LPV und VUS) stieg die diagnostische Ausbeute auf 40,7% (81 von 199 Patienten) an (Tab. 3). Diese Steigerung liegt in erster Linie an den 27 VUS-positiven TAAD Patienten (insgesamt 39/71 Patienten; 54,9%) und 13 VUS-positiven HCTD Patienten (insgesamt 17/61 Patienten; 27,9%) (Abb. 14). Hingegen stieg die diagnostische Ausbeute in der Subkohorte von Patienten mit Marfan Syndrom lediglich um 4 VUS-positive Patienten an (insgesamt 21/57 Patienten; 36,8%) (Abb. 14).

Bei 16,9% (12/71) und 6,6% (4/61) der Patienten mit TAAD bzw. HCTD wurde eine PV oder LPV identifiziert (Tab. 3). Die diagnostische Ausbeute (Identifizierung einer PV/LPV) war bei Patienten mit einer positiven Familienanamnese nicht signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit negativer Familienanamnese (18,2% [16/88] vs. 13,9% [10/72];  $p=0,523$ ) (Tab. 3). Im Anschluss wurde die initiale klinische Diagnose von Patienten mit und ohne einer PV/LPV in mindestens einem der 32 Gene verglichen. Die Häufigkeit der Initialdiagnose MFS war signifikant höher in der PV/LPV positiven (17/34) Patientenkohorte im Vergleich zu der PV/LPV-negativen (40/165) Gruppe (50,0% vs. 24,2%;  $p=0,0059$ ) (Tab. 3). Im Gegensatz dazu war die Häufigkeit der Initialdiagnose HCTD und TAAD in der PV/LPV-positiven Patientenkohorte nicht erhöht (Tab. 3). Der Anteil an TAAD-Patienten in der PV/LPV/VUS-positiven Kohorte (39/81 Patienten; 48,1%) war größer als der Anteil TAAD-Patienten in der PV/LPV/VUS-negativen Kohorte [(32/118 Patienten; 27,2%);  $p=0,003$ ] (Tab. 3). Hingegen war der Anteil HCTD-Patienten in der

PV/LPV/VUS-negativen Kohorte größer als in der PV/LPV/VUS-positiven Kohorte [(17/81; 21,0% PV/LPV/VUS-positiv) versus (22/118; 37,3% PV/LPV/VUS-negativ);  $p=0,0186$ ]. Der Vergleich der Anteile von MFS-Patienten mit und ohne PV/LPV/VUS in den jeweiligen Subkohorten wies keinen signifikanten Unterschied auf [(21/81; 21,0%) versus (36/118; 30,5%);  $p=0,526$ ] (Tab. 3). Diese Daten weisen darauf hin, dass eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, eine berichtenswerte Variante (PV/LPV/VUS) bei Patienten mit der klinischen Diagnose TAAD als bei Patienten mit HCTD zu identifizieren.



**Abb. 14: Diagnostische Ausbeute der NGS-Analyse von 32 HCTD Genen.** **A:** Bei 34 von 199 Patienten wurde eine PV oder LPV identifiziert. Bei 47 von 199 Patienten wurde eine VUS aufgedeckt. Die diagnostische Ausbeute beträgt 40,7% (insgesamt 81 von 199 Patienten). 48,1% der PV/LPV/VUS-positiven Patienten (39/81 Patienten) haben TAAD, 25,9% (21/81 Patienten) haben MFS, 21% (17/81 Patienten) haben HCTD und jeweils 2,5% (jeweils 2/81 Patienten) haben EDS und LDS. **B:** Relativer Anteil PV/LPV/VUS-positiver (orange) bzw. -negativer (grau) Patienten in den phänotypischen Subkohorten TAAD, HCTD und MFS. In der TAAD-Subkohorte wurde bei 12 Patienten eine PV oder LPV und bei 27 Patienten eine VUS detektiert (insgesamt 39/71 Patienten; 54,9%). In der HCTD-Subkohorte wurde bei 4 Patienten eine PV oder LPV und bei 13 Patienten eine VUS detektiert (insgesamt 17/61 Patienten; 27,9%). In der MFS-Subkohorte wurde bei 17 Patienten eine PV oder LPV und bei 4 Patienten eine VUS detektiert (insgesamt 21/57 Patienten; 36,8%).

Tab. 3: Diagnostische Ausbeute

Initiale Diagnose bzw. Familien- anamnese (FA)	Anzahl Patienten	Absolute und relative Anzahl Patienten ...					
		... mit PV/LPV	... mit PV/LPV/VUS	... mit PV/LPV	... mit PV/LPV/VUS	...ohne PV/LPV	...ohne PV/LPV/VUS
		(in der gesamten Studienkohorte 199 Patienten)		(in der Subkohorte 34 bzw. 81 Patienten)		(in der Subkohorte 165 bzw. 118 Patienten)	
<b>HCTD</b>	61	4/61 (6,6%)	17/61 (27.9%)	4/34 (11.8%)	17/81 (21.0%)	57/165 (34.6%)	44/118 (37.3%)
<b>TAAD</b>	71	12/71 (16,9%)	39/71 (54.9%)	12/34 (35.3%)	39/81 (48.1%)	59/165 (35.8%)	32/118 (27.2%)
<b>MFS</b>	57	17/57 (29,8%)	21/57 (36.8%)	17/34 (50.0%)	21/81 (25.9%)	40/165 (24.2%)	36/118 (30.5%)
<b>EDS</b>	6	1/6 (16,7%)	2/6 (33.3%)	1/34 (2.9%)	2/81 (2.5%)	5/165 (3.0%)	4/118 (3.4%)
<b>LDS</b>	3	0/3 (0%)	2/3 (66.7%)	0/34 (0%)	2/81 (2.5%)	3/165 (1.8%)	1/118 (0.8%)
<b>CCA</b>	1	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/34 (0%)	0/81 (0%)	1/165 (0.6%)	1/118 (0.8%)
<b>FA pos.</b>	88	16/88 (18,2%)	38/88 (43.2%)	16/34 (47.1%)	38/81 (46.9%)	72/165 (43.6%)	50/118 (42.4%)
<b>FA neg.</b>	72	10/72 (13,9%)	26/72 (36.1%)	10/34 (29.4%)	26/81 (32.1%)	62/165 (37.6%)	46/118 (39.0%)
<b>FA n.b.</b>	39	8/39 (20,5%)	17/39 (43.6%)	8/34 (23.5%)	17/81 (21.0%)	31/165 (18.8%)	22/118 (18.6%)
<b>gesamt</b>	199 (100%)	34/199 (17,1%)	81/199 (40.7%)	34/34 (100%)	81/81 (100%)	165/165 (100%)	118/118 (100%)

Angegeben sind die absoluten und relativen Patientenzahlen jeweils für die Initialdiagnosen bzw. Familienanamnese. Aufgeschlüsselt sind diese Werte nach den Subkohorten mit und ohne PV/LPV/bzw. PV/LPV/VUS in mindestens einem der 32 analysierten Gene. Daten, bei denen VUS in die Analyse miteinbezogen wurde, sind grau hinterlegt. Gesamte Studienkohorte, 199 Patienten; Varianten-positive Subkohorte 34 Patienten mit PV/LPV bzw. 81 Patienten mit PV/LPV/VUS; Varianten-negative Subkohorte, 165 Patienten ohne PV/LPV bzw. 118 Patienten ohne PV/LPV/VUS.

PV (*pathogenic variant*), krankheitsursächliche Variante; LPV (*likely pathogenic variant*), wahrscheinlich krankheitsursächliche Variante; VUS (*variant of unknown significance*), Variante mit unbekannter Signifikanz.

HCTD (*hereditary connective tissue disorder*), erbliche Erkrankungen des Bindegewebes; TAAD; Thorakale(s) Aortenaneurysma und Dissektion; ARUP (aortic rupture), Aortenruptur; MFS, Marfan Syndrom; EDS, Ehlers-Danlos Syndrom; CCA, *congenital connective arachnodaktylie*. FA pos., positive Familienanamnese; FA neg., negative Familienanamnese; FA n.b., Familienanamnese nicht bekannt.

Hinsichtlich der Subkohorten EDS, LDS und CCA konnte die Beziehung zwischen Patientenzahl und Anzahl identifizierter Varianten nicht statistisch evaluiert werden, da die Subkohorten zu klein waren. Hinsichtlich der Familienanamnese wurde kein signifikanter Unterschied in der diagnostischen Ausbeute, d. h. der Identifizierung einer PV, LPV oder VUS, zwischen Patienten mit positiver (38/88; 43,2%) und negativer Familienanamnese (26/72; 36,1%) festgestellt ( $p=0,419$ ) (Tab. 3). Die Familienanamnese hatte auch innerhalb der jeweiligen klinischen Entitäten (HCTD, TAAD, MFS) keinen Einfluss auf die diagnostische Ausbeute.

## 2. Identifizierung neuer Kandidatengene mittels ES und funktionelle Mutationsanalysen zur Ursache erblicher Aortenerkrankungen

### 2.1 Vorarbeiten zu dieser Studie

In dieser Arbeit wurden 8 Familien mit erblichen Erkrankungen des Bindegewebes mittels gesamtexomischer Hochdurchsatzsequenzierung (ES) analysiert. Vor Beginn dieser Arbeit wurden bei den Indexpatienten im Rahmen eines diagnostischen Auftrages Mutationsanalysen in ausgewählten bekannten Krankheitsgenen mittels Sanger-Sequenzierung in der Molekulargenetischen Abteilung des Institutes für Humangenetik (UKE) durchgeführt. Dabei wurden keine krankheitsursächlichen Varianten aufgedeckt. Zudem waren die Indexpatienten Teil der Studienkohorte der in dieser Arbeit vorgestellten Gen-Panel-Analyse: Die ES-Daten wurden gezielt auf eine Sequenzveränderung in den ausgewählten 32 Genen untersucht. In dieser Analyse wurden bei 7 Indexpatienten keine PV oder LPV in den 32 untersuchten Genen detektiert. Patient #197 (Indexpatient der Familie #8) wies die Sequenzveränderung *GATA5* c.1159C>T (p.Arg387Cys) auf, die als VUS klassifiziert wurde. In den Datenbanken HGMD und ClinVar ist die Veränderung als DM? bei einem Patienten mit bikuspidaler Aortopathie verzeichnet.<sup>206</sup> In ClinVAR ist die Variante als VUS bei Patienten mit TAAD und morphologisch veränderten Aortenklappen beschrieben.<sup>206</sup> Pathogene Varianten in *GATA5* verursachen kongenitale Herzfehler (OMIM # 617912), wie beispielsweise bikuspidale Aortenklappen (BAV).<sup>139,207,208</sup> Der Indexpatient der Familie #8 wies eine leichtgradige Insuffizienz der Aortenklappe auf. Eine auffällige Morphologie der Aortenklappe im Sinne einer BAV wurde weder bei ihm noch bei seinem Sohn, der ebenfalls die Variante in *GATA5* trägt, beobachtet.

Bereits im Vorfeld an diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Rosenberger eine ES-Analyse der Familien #1 bis #4 durchgeführt. Dabei wurden auffällige Varianten in neuen krankheitsassoziierten Kandidatengen identifiziert. Bei 6 Verwandten der Familie #1 wurde eine Variante in *CDKLI* detektiert. Aus phänokritischer Sicht ging *CDKLI* als präferiertes Kandidatengen aus der damaligen Analyse hervor. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die ES-Daten der Familien #1 bis #4 mittels einer überarbeiteten und erweiterten bioinformatischen Pipeline reevaluiert.

### 2.2 Identifizierung von Sequenzveränderungen mittels ES

Zur Identifizierung neuer Kandidatengene wurde eine Familien-basierte ES-Analyse bei allen eindeutig erkrankten Familienmitgliedern durchgeführt. Ausgehend von einem autosomal

dominanten Erbgang, welcher auch beim Großteil der bekannten syndromalen Bindegewebserkrankungen vorliegt, wurden die Daten aus der gesamtexomischen Sequenzierung auf heterozygote Varianten gefiltert. Unter der Annahme, dass der Phänotyp durch hohe Penetranz einer pathogenen Veränderung verursacht wird, wurde eine Schnittmenge von Varianten gebildet, die bei allen Betroffenen einer Familie vorliegen. Dieser Filter-Schritt reduzierte die Menge an Varianten je nach Anzahl betroffener Familienmitglieder von ca. 25.000 auf bis zu 1.000 Varianten pro gesamtexomischer Auswertung einer Familie. Im Anschluss wurden alle Varianten oberhalb einer definierten Allelfrequenz verworfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Varianten gefiltert, die in den Datenbanken gnomAD und PopFreqMax mit einer geringeren Allelfrequenz als die Prävalenz der jeweils vorliegenden Erkrankung verzeichnet sind. Für die eruierten Sequenzveränderungen wurden Segregationsanalysen in Familienmitgliedern, bei denen keine ES-Analyse vorgenommen wurde, mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Varianten, die auch in gesunden bzw. klinisch (noch) nicht auffälligen Familienmitgliedern identifiziert wurden, wurde eine weniger starke Bedeutung (d. h. Pathogenität) zugesprochen. Bei einem autosomal-dominanten Erbgang und einer oft spät manifestierenden Erkrankung aus dem TAAD-Formenkreis kann jedoch auch eine variable Expressivität und/oder reduzierte Penetranz vorliegen. Dahingehend wurden Varianten, die in betroffenen und (noch) nicht auffälligen Personen detektiert wurden, nicht gänzlich verworfen. Es wurden stille Mutationen, Missense- und Nonsense-Mutationen, Indels und intronische Varianten an Exon/Intron-Grenzen (cDNA-Position von -2 bis +2) herausgefiltert, denn über 97% der bereits bekannten pathogenen Mutationen bei Patienten mit einer Erkrankung aus dem TAAD Formenkreis gehören zu diesen Mutationstypen (Quelle: *HGMD Professional* <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>). Für jede Familie verblieben nach Filterung der ES-Daten bis zu 5 Sequenzveränderungen, die in den Datenbanken gnomAD und PopFreqMax nicht verzeichnet sind oder eine geringere Allelfrequenz als die Prävalenz der vorliegenden Erkrankung aufwiesen. Die identifizierten Varianten sind in der Tab. 4 zusammengefasst.

Bei Familie #1 wurde eine gesamtexomische Sequenzierung bei dem Indexpatienten (II-4) sowie seinem betroffenen Bruder (II-2) und seiner Nichte (III-1) durchgeführt. Die ES-Daten wurden auf heterozygote Varianten gefiltert, die in allen drei Familienmitgliedern mit Verdacht auf Marfan Syndrom vorliegen. Es wurden 5 Missense-Varianten in den Genen *MACROD1*, *NUP210*, *F2RL2*, *UBE2R2* und *CDKLI* identifiziert. Die Variante *CDKLI* c.430T>C p.(Cys144Arg), welche bereits in einer vorigen ES-Analyse in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Rosenberger beobachtet wurde, ist nicht in der Datenbank gnomAD verzeichnet. Die verwendeten *in silico* Pathogenitäts-Programme weisen jeweils einen Score über den von den

Entwicklern empfohlenen Cut-Offs auf (Tab. 4). Die Segregationsanalyse in der Familie #1 deckte die *CDKLI*-Variante ebenfalls bei zwei Söhnen (III-4, III-5) und einer Tochter (III-3) des Indexpatienten auf. Bei allen drei Kindern wurde eine grenzwertige Duraektasie beobachtet. Die Verdachtsdiagnose Marfan Syndrom war zum Zeitpunkt der Analyse bei den Personen III-3, III-4 und III-5 nicht gesichert. Die Sequenzveränderung in *CDKLI* wurde in dieser Arbeit als VUS klassifiziert. Die detektierten Sequenzveränderungen in *MACROD1*, *NUP210*, *F2RL2* und *UBE2R2* sind mit einer geringen Allelfrequenz in gnomAD verzeichnet. REVEL, M-CAP und ClinPred sagen negative Konsequenzen des jeweiligen Aminosäureaustausches auf die Funktion des betreffenden Proteins voraus. *MACROD1* c.673C>T p.(His225Tyr) und *NUP210* c.3673C>T p.(Arg1225Trp) wurden mittels Sanger-Sequenzierung auch beim Neffen (III-2) des Indexpatienten identifiziert. Der 29-jährige wies eine geringe Ektasie des Aortenbulbus und ein positives Daumen-Unterarm- sowie ein positives Daumen-Handgelenkszeichen auf. Die Varianten *F2RL2* c.1062T>A p.(Asp354) und *UBE2R2* c.713C>T p.(Ser238Leu) wurden nachträglich auch bei den Kindern des Indexpatienten III-4 und III-5 beobachtet. In den klinisch (noch) nicht auffälligen Familienmitgliedern II-6 und III-2 wurde keine der fünf Varianten identifiziert. Alle beschriebenen Varianten der Familie #1 wurden als VUS klassifiziert (Tab. 4, Familie #1).

Bei Familie #2 wurden die ES-Daten des Indexpatienten (II-2) und seines Sohnes (III-1) auf eine gemeinsame heterozygote Variante gefiltert, die ursächlich für die beobachtete bikuspidale Aortenklappen-Erkrankung sein könnte. Es wurden 5 Missense-Varianten identifiziert. Die Variante *FLNC* c.448G>A p.(Asp150Asn) wurde nur bei dem Indexpatienten und seinem Sohn beobachtet. Die Sequenzveränderung ist nicht in gnomAD verzeichnet. Zwei der drei verwendeten *in silico* Pathogenitäts-Scores weisen einen Score über den empfohlenen Cut-Offs auf. Die aufgedeckten Varianten in *MYO9A*, *MYBPC3*, *ILKAP* und *MYLK* sind in gnomAD mit einer geringen Allelfrequenz gelistet und wurden auch beim Bruder (II-3) des Indexpatienten, welcher skelettale Auffälligkeiten und eine leichtgradige Erweiterung des Aortenbulbus aufweist, identifiziert. Manifestationen eines bikuspiden Aortenklappen-Syndroms wurden bei ihm nicht beobachtet. *MYBPC3* c.1568G>A p.(Gly490Arg) ist als krankheitsursächliche Variante für hypertrophe Kardiomyopathie beschrieben.<sup>209</sup> Dieser Phänotyp wurde in der Familie #2 nicht beobachtet. Die 5 detektierten Sequenzvarianten der Familie #2, welche nicht bei den klinisch unauffälligen Geschwistern des Indexpatienten (II-4 und II-5) identifiziert wurden, wurden als VUS klassifiziert (Tab. 4, Familie #2).

Bei Familie #3 wurde der Verdacht auf ein Marfan Syndrom geäußert. Es wurde eine gesamtexomische Sequenzierung bei dem Indexpatienten (II-3), seinen zwei Brüdern (II-2 und II-4) und einem Neffen (III-1) des Indexpatienten durchgeführt. Es wurden zwei Missense- und

eine *frameshift*-Mutation in den Genen *IGFN1*, *FAM83G* und *SMIM8* identifiziert, die als VUS klassifiziert wurden. Varianten in *FAM83G* und *SMIM8* sind nicht in gnomAD verzeichnet. Die Sequenzveränderung *IGFN1* c.867G>A p.(Gln289His) ist mit einer geringen Allelfrequenz von 0,00001277% (2 heterozygote Anlageträgern) in gnomAD beschrieben. Die *in silico* Programme REVEL, M-CAP und ClinPred weisen ein diskordantes Ergebnis hinsichtlich der Pathogenität der drei detektierten Varianten auf (Tab. 4, Familie #3).

Bei Familie #4 wurde die Verdachtsdiagnose Marfan Syndrom geäußert. Dahingehend wurde eine gesamtexomische Analyse der Indexpatientin (III-2), ihrer Mutter (II-2) und ihren zwei Kindern (IV-1 und IV-2) durchgeführt. Es wurden vier Missense-Varianten in den Genen *TBC1D8*, *KIAA1217*, *TCF7* und *SHROOM1* identifiziert und als VUS klassifiziert. Die Varianten *KIAA1217* c.4348C>G p.(Pro1450Ala) und *SHROOM1* c.253C>T p.(Pro85Ser) sind nicht in der Datenbank gnomAD gelistet. Während für die Variante in dem Gen *KIAA1217* M-CAP und ClinPred Scores über den empfohlenen Cut-Offs aufweisen, sagt für die Variante im *SHROOM1* Protein nur das Programm M-CAP einen pathogenen Effekt auf die Proteinfunktion voraus (Tab. 4). Die Sequenzveränderungen *TBC1D8* c.1733C>T p.(Thr578Met) und *TCF7* c.400G>C p.(Asp134His) sind in gnomAD mit einer geringen Allelfrequenz beschrieben. Die *in silico* Pathogenitäts-Programme sagen unterschiedliche Auswirkungen der jeweiligen Aminosäureaustausche auf die Funktion des betreffenden Proteins vorher (Tab. 4, Familie #4).

Bei Personen der Familie #5 liegen Manifestationen einer erblichen Bindegewebserkrankung vor. In der ES-Analyse wurden die Indexpatientin (III-2) sowie ihre zwei Töchter (IV-2 und IV-3) untersucht. Bei den Kindern der Indexpatientin konnte der Verdacht auf eine Bindegewebsschwäche zum Zeitpunkt der Analyse klinisch (noch) nicht gesichert werden. Es wurde eine Sequenzveränderung in *SLIT3* identifiziert, die nicht bei ihren Kindern aufgedeckt wurde. Die Variante *SLIT3* c.4021G>A p.(Gly1341Ser) ist in gnomAD mit 7 heterozygoten Anlageträgern verzeichnet. Alle drei verwendeten *in silico* Pathogenitäts-Programme weisen diese Variante betreffend einen Score über den empfohlenen Cut-Offs auf. Zudem wurden zwei Varianten detektiert, die bei der Indexpatientin und bei einer ihrer Töchter (IV-2) beobachtet wurden. Die Variante *MYH6* c.2383C>T p.(Arg795Trp) ist mit 29 heterozygoten Anlageträgern in gnomAD aufgelistet. Alle drei verwendeten *in silico* Pathogenitäts-Programme weisen diese Variante betreffend einen Score über den empfohlenen Cut-Offs auf (Tab. 4, Familie #5). Die Variante in *MYH6* wurde bereits bei Patienten mit dem Linksherzhypoplasie-Syndrom beschrieben<sup>210</sup>; diese Manifestation wurde in der Familie #5 nicht beobachtet.

In der Familie #6 wurden drei betroffene Personen mit Verdacht auf familiäre TAAD in einer ES-Analyse untersucht. Neben dem Indexpatienten (I-1) wurde auch bei seinen zwei Söhnen

(II-1 und II-2) eine gesamtexomische Sequenzierung durchgeführt. Es wurden vier gemeinsame Sequenzveränderungen in den Genen *WDR17*, *ITPR3*, *KIAA0408* und *RNPS1* aufgedeckt. Drei dieser Varianten sind Missense-Varianten, von der eine (*ITPR3* c.2274C>A) nicht in gnomAD beschrieben ist. Bei der Sequenzveränderung in *WDR17* handelt es sich um eine Nonsense-Mutation [*WDR17* c.1420C>T p.(Arg474\*)]. Diese ist, genau wie *KIAA0408* c.824G>A p.(Arg275Gln) und *RNPS1* c.878G>A p.(Arg293His), mit einer geringen Allelfrequenz in gnomAD gelistet. Die *in silico* Programme M-CAP und ClinPred weisen einzig für die Sequenzveränderung in *KIAA0408* jeweils einen Score über den Cut-Offs auf. Alle vier Varianten wurden als VUS klassifiziert (Tab. 4, Familie #6).

Bei der Familie #7 wurden die Indexpatientin (II-1) und ihr Vater (I-1), beide mit Verdacht auf Marfan Syndrom, mittels ES analysiert. Die Sequenzierung deckte 2 Missense-Varianten in den Genen *VAV3* und *SLC13A4* sowie 2 Nonsense-Varianten in den Genen *AGAP6* und *LBP* auf. Die vier Sequenzveränderungen sind in gnomAD mit geringen Allelfrequenzen beschrieben. Die *in silico* Pathogenitäts-Vorhersagen, sofern anwendbar, deuten auf keine Beeinträchtigung der Funktion der jeweiligen Genprodukte hin. Alle Varianten wurden als VUS klassifiziert (Tab. 4, Familie #7).

Bei der Familie #8 wurde die Verdachtsdiagnose Marfan Syndrom geäußert. Wie o. e. wurde bei dem Indexpatienten (I-2) und seinem Sohn (II-1) die Variante *GATA5* c.1159C>T p.(Arg387Cys) identifiziert, welche als VUS klassifiziert wurde. Die Sequenzveränderung ist in HGMD und ClinVar bei Patienten mit einer Erkrankung der Aortenklappe beschrieben.<sup>206</sup> Da bei dem Indexpatient zum Zeitpunkt der Analysen der Verdacht auf eine bikuspidale Aortopathie nicht bestätigt werden konnte, wurde eine ES-Analyse bei ihm und seinem Sohn durchgeführt, um weitere putative Kandidatengene zu identifizieren. Bei dieser Untersuchung wurde eine Missense-Variante in *ITGA1* aufgedeckt, die in gnomAD mit 20 heterozygoten Anlageträgern verzeichnet ist. Die *in silico* Programme REVEL, M-CAP und ClinPred weisen diese Sequenzveränderung betreffend alle einen Score über den empfohlenen Cut-Offs auf. Die Variante *ITGA1* c.1895T>G wurde als VUS klassifiziert (Tab. 4, Familie #8).

Tab. 4: Auffällige Sequenzvarianten in 8 Familien mit hereditären Erkrankungen des Bindegewebes.

Stammbaum	Gen, Transkript- variante	c. Annotation p. Annotation	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Klassifizierung nach ACMG- Richtlinien	Segregation
<b>Familie #1: Verdacht auf Marfan Syndrom</b>						
	<i>MACROD1</i>	c.673C>T	0,0001179	0,542/0,889/0,958	VUS <sub>PP1+PP3</sub>	II-4, II-2, III-1, III-2
	NM_014067	p.His225Tyr	(31/0/262912)			
	<i>NUP210</i>	c.3673C>T	0,00003902	0,261/0,094/0,757	VUS <sub>PP1+PP3</sub>	II-4, II-2, III-1, III-2
	NM_024923	p.Arg1225Trp	(11/0/281902)			
	<i>F2RL2</i>	c.1062T>A	0,00002477	0,759/0,144/0,995	VUS <sub>PP1+PP3</sub>	II-4, II-2, III-1, III-4, III-5
	NM_004101	p.Asp354Glu	(7/0/282598)			
	<i>UBE2R2</i>	c.713C>T	0,00001769	0,304/0,050/0,943	VUS <sub>PP2+PP1+PP3</sub>	II-4, II-2, III-1, III-4, III-5
	NM_017811	p.Ser238Leu	(5/0/282648)			
	<i>CDKLI</i>	c.430T>C	0	0,788/0,164/1,000	VUS <sub>PM2+PP1+PP3</sub>	II-4, II-2, III-1, III-3, III-4, III-5
	NM_004196	p.Cys144Arg				
<b>Familie #2: Verdacht auf Bikuspidale Aortenklappen Syndrom bzw. Loey-Dietz Syndrom</b>						
	<i>MYO9A</i>	c.3955C>T	0,0001419	0,376/0,053/0,184	VUS <sub>PP1+BP4</sub>	II-2, II-3, III-1
	NM_006901	p.Arg1319Trp	(40/0/281792)			
	<i>MYBPC3</i>	c.1568G>A	0,0002139	0,898/0,700/0,778	HGMD: DM <sup>209</sup>	II-2, II-3, III-1
	NM_000256	p.Gly490Arg	(60/0/280454)		VUS <sub>PP1+PP3</sub>	
	<i>FLNC</i>	c.448G>A	0	0,230/0,029/0,899	VUS	II-2, III-1
	NM_001458	p.Asp150Asn			PM2+PP1+PP2+BP4	
	<i>ILKAP</i>	c.1016A>T	0,000007954	0,122/0,009/0,854	VUS <sub>PP1+BP4</sub>	II-2, II-3, III-1
	NM_030768	p.Asn339Ile	(2/0/251460)			
	<i>MYLK3</i>	c.211C>T	0,00002421	0,237/0,171/0,468	VUS <sub>PP1+BP4</sub>	II-2, II-3, III-1
NM_182493	p.Arg71Trp	(6/0/247882)				
<b>Familie #3: Verdacht auf Marfan Syndrom</b>						
	<i>IGFN1</i>	c.867G>C	0,00001277	0,155/0,049/0,765	VUS <sub>PP1+PP3</sub>	II-3, II-2, II-4, III-1
	NM_001164586	p.Gln289His	(2/0/156638)			
	<i>FAM83G</i>	c.1939C>T	0	0,257/0,027/0,718	VUS <sub>PP1+PP3</sub>	II-3, II-2, II-4, III-1
	NM_001039999	p.Arg647Trp				
	<i>SMIM8</i>	c.232_233delTA	0	n.a./n.a./n.a.	VUS <sub>PP1+PM2</sub>	II-3, II-2, II-4, III-1
	NM_001042493	p.Tyr78fs*1				

Tab. 4: Fortsetzung

Stammbaum	Gen, Transkript- variante	c. Annotation p. Annotation	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Klassifizierung nach ACMG- Richtlinien	Segregation
<b>Familie #4: Verdacht auf Marfan Syndrom</b>						
	<i>TBCID8</i>	c.1733C>T p.Thr578Met	0,00003600 (9/0/250020)	0,456/0,015/0,898	VUS <sub>PP1+BP4</sub>	III-2, II-2, IV-1, IV-2
	<i>KIAA1217</i>	c.4348C>G p.Pro1450Ala	0	0,363/0,061/0,991	VUS <sub>PM2+PP1+PP3</sub>	III-2, II-2, IV-1, IV-2
	<i>TCF7</i>	c.400G>C p.Asp134His	0,00008501 (20/0/235256)	0,762/0,120/0,441	VUS <sub>PP1+PP3</sub>	III-2, II-2, IV-1, IV-2
	<i>SHROOM1</i>	c.253C>T p.Pro85Ser	0	0,019/0,385/0,119	VUS <sub>PM2+PP1+BP4</sub>	III-2, II-2, IV-1, IV-2
<b>Familie #5: Verdacht auf eine hereditäre Bindegewebserkrankung</b>						
	<i>MYH6</i>	c.2383C>T p.Arg795Trp	0,0001026 (29/0/282708)	0,770/0,226/0,790	HGMD: DM <sup>210</sup> VUS <sub>PP3</sub>	III-2, IV-2
	<i>SLIT3</i>	c.4021G>A p.Gly1341Ser	0,00002486 (7/0/281598)	0,861/0,246/0,982	VUS <sub>PP3</sub>	III-2
<b>Familie #6: Verdacht auf familiäre TAAD</b>						
	<i>WDR17</i>	c.1348C>T p.Arg450*	0,000002436 (6/0/246256)	n.a./n.a./n.a.	VUS <sub>PP1</sub>	I-1, II-1, II-2
	<i>ITPR3</i>	c.2274C>A p.Asp758Glu	0	0,226/0,010/0,204	VUS <sub>PM2+PP1+BP4</sub>	I-1, II-1, II-2
	<i>KIAA0408</i>	c.824G>A p.Arg275Gln	0,00001614 (4/0/247802)	0,236/0,058/0,950	VUS <sub>PP1+PP3</sub>	I-1, II-1, II-2
	<i>RNPS1</i>	c.878G>A p.Arg293His	0,00005060 (7/0/138336)	0,231/0,039/0,269	VUS <sub>PP1+BP4</sub>	I-1, II-1, II-2

Tab. 4: Fortsetzung

Stammbaum	Gen Transkript- variante	c. Annotation p. Annotation	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Klassifizierung nach ACMG- Richtlinien	Segregation
<b>Familie #7: Verdacht auf Marfan Syndrom</b>						
	<i>VAV3</i>	c.307C>G	0,0001632 (46/0/281902)	0,293/0,011/0,264	VUS <sub>PP1+BP4</sub>	II-1, I-1
	NM_006113	p.Arg103Gly				
	<i>AGAP6</i>	c.1549C>T	0,00004244 (12/0/282768)	n.a./n.a./n.a.	VUS <sub>PP1</sub>	II-1, I-1
	NM_001077665	p.Arg517*				
	<i>LBP</i>	c.1237G>T	0,000007979 (2/0/250672)	n.a./n.a./n.a.	VUS <sub>PP1</sub>	II-1, I-1
NM_004139	p.Glu413*					
<i>SLC13A4</i>	c.1613C>T	0,0001407 (39/0/277192)	0,236/0,017/0,294	VUS <sub>PP1+BP4</sub>	II-1, I-1	
NM_012450	p.Thr538Met					
<b>Familie #8: Verdacht auf Marfan Syndrom</b>						
	<i>GATA5</i>	c.1159C>T	0,0001476 (41/0/277724)	0,727/0,771/0,946	HGMD:DM? <sup>206</sup> VUS <sub>PP1+PP3</sub>	I-2, II-1
	NM_080473	p.Arg387Cys				
	<i>ITGAI</i>	c.1895T>G	0,00007073 (20/0/282780)	0,647/0,061/0,827	VUS <sub>PP1+PP3</sub>	I-2, II-1
NM_181501	p.Phe632Cys					

Es sind die Stammbäume der Familien #1 bis #8, die Verdachtsdiagnose für den jeweiligen Indexpatienten sowie alle Varianten, die in den Familien #1 bis #8 mittels ES-Analyse identifiziert wurden und in den jeweils betroffenen Familienmitgliedern mit der Erkrankung kosegregieren, aufgeführt. Die Annotation der Varianten beginnt mit +1 für das A des ATG-Translations-Initiations-Codons in der Referenzsequenz (die jeweilige Transkriptvariante des Gens ist durch die NM\_Nummer gegeben); das Initiationscodon ist Codon 1. Für jede Variante ist die cDNA- und Proteinposition, die in gnomAD verzeichnete Allelfrequenz, die Ergebnisse aus den *in silico* Pathogenitätsvorhersagen REVEL, M-CAP und ClinPred, die Parameter zur Varianten-Klassifizierung nach ACMG-Standards sowie das Ergebnis aus den Segregationsanalyse von verfügbaren Verwandten beschrieben. gnomAD: Genome Aggregation Database (v.2.1); MAF (*minor allele frequency*): Allelfrequenz; het: heterozygote Anlageträger; hom: homozygote Anlageträger;  $\Sigma$ : Gesamtanzahl der analysierten Allele. \*, DNA Probe vorhanden und Segregationsanalyse durchgeführt; ●■, erkrankt, ○□, Klinik (noch) unklar, ○□, gesund; Pfeil: Indexpatient; n.a., nicht anwendbar.

REVEL: *Rare exome variant ensemble learner*; M-CAP: *Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity*; ClinPred: Vorhersage-Programm zur Identifizierung von Krankheits-relevanten Missense-SNVs; Pathogenitäts-Cut-Offs: REVEL ( $\geq 0.5$ ), M-CAP ( $\geq 0.025$ ), ClinPred ( $\geq 0.5$ ).

VUS: Variante mit unklarer Signifikanz; Pathogene Kriterien zur Varianten-Klassifizierung wurden als *moderate* (PM2) oder *supporting* (PP3) gewichtet; gutartige Kriterien zur Klassifizierung wurden als *supporting* gewichtet (BP4).

HGMD (*Human Gene Mutation Database*) Varianten Kategorien: DM (*disease causing mutation*): krankheitsursächliche Mutation; DM? (*likely disease causing mutation*): wahrscheinlich krankheitsursächliche Mutation.

### 2.3 Priorisierung von Kandidatengen

Im Anschluss an die Identifizierung von Sequenzveränderungen mittels gesamtexomischer Sequenzierung wurden die eruierten Kandidatengene priorisiert. Dahingehend wurden alle Sequenzveränderung und Kandidatengene hinsichtlich folgender Kriterien bewertet: (i) Position und Wichtigkeit der von der Sequenzveränderung betroffenen Aminosäure(n) innerhalb eines Proteins. (ii) Toleranz/Intoleranz eines Gens gegenüber Variation. (iii) Phänotypen von Knockout- oder Mutationsanalysen in Modellorganismen. (iv) Bereits bekannte Krankheitsassoziation. (v) Mögliche Beteiligung an bekannten Pathomechanismen für Bindegeweserkrankungen. In Tab. 11 des Appendix sind Informationen aus der Literaturrecherche zu den o. e. Bewertungskriterien, sofern verfügbar, zu allen Kandidatengen detailliert aufgeführt. Im Folgenden werden die für die Priorisierung ausschlaggebenden Eigenschaften der Gene und Genprodukte hervorgehoben.

In Familie #1 wurden Varianten in den Genen *MACROD1*, *NUP210*, *F2RL2*, *UBE2R2* und *CDKL1* identifiziert. Durch die Variante *MACROD1* c.673C>T kommt es zum Austausch eines Histidins gegen ein Tyrosin an der Position 225 der Proteinsequenz. Dieses Histidin befindet sich in der Macro-Domäne des Proteins. Über die Domäne vermittelt die Hydrolase *MACROD1* die Interaktion mit Metaboliten von NAD (+).<sup>211,212</sup> Das Gen *NUP210* ist bisher noch nicht mit einer humanen Erkrankung assoziiert; jedoch ist in HGMD eine Variante in *NUP210* als DM? (*likely disease causing mutation*; wahrscheinlich krankheitsursächliche Mutation) für Autismusspektrum-Erkrankungen und Schizophrenie kategorisiert.<sup>213</sup> Die Variante in *F2RL2* ist in einer 7-Transmembran Domäne lokalisiert (PF00001). Das Genprodukt von *F2RL2* ist ein Rezeptor für Thrombin in glatten Muskelzellen.<sup>304</sup> Das Gen *UBE2R2* weist einen hohen misZ- und einen hohen pLI-Score auf. Die Sequenzveränderung *CDKL1* c.430T>C führt auf Proteinebene zu einem Austausch eines Cysteins gegen ein Arginin an der Position 144. Dieses Cystein befindet sich in der Kinase-Domäne der Serin-/Threonin-Kinase *CDKL1* in räumlicher Nähe zum Phosphatdonor ATP (PDB ID: 4AGU).<sup>214</sup> Die in direkter Nachbarschaft liegenden Aminosäuren sind hoch konserviert. Sie formen die ATP-Bindungstasche und vermitteln die Bindung an ATP.<sup>215</sup> Bisher beschriebene Varianten in *CDKL1* wurden in HGMD als DM? (*likely disease causing mutation*; wahrscheinlich krankheitsursächliche Mutation) mit der diabetischen Form der Retinopathie assoziiert.<sup>216</sup> Das Kandidatengen *CDKL1* wurde ebenfalls bereits in Modellorganismen untersucht. *In vivo* Untersuchungen in Zebrafärblingen stellten *zcdkl1* als wichtiges Entwicklungsgen heraus. Ein Knockdown von *zcdkl1* in Zebrafärblingen führte u. a. zu Augenanomalien, abnorme Achsenformation und Gehirnefehlbildungen.<sup>217</sup> Bei Analysen an

Rattenherzen wurde außerdem eine ansteigende Expression des Cdk1 Proteins von Geburt bis zum adulten Organismus beobachtet.<sup>218</sup> *CDKL1* codiert für eine Serin-Threonin-Proteinkinase, deren Funktion und Substrat bislang unzureichend beschrieben sind. Die Proteinsequenz von CDKL1 weist Homologien zu den Proteinen GSK3A und GSK3B (*glycogen synthase kinases A and B*) auf. In Abb. 28 des Appendix ist ein Vergleich der Proteinsequenzen von den humanen Proteinen CDKL1, GSK3A und GSK3B gezeigt. GSK3A/B phosphorylieren die im TGF- $\beta$ -Signalweg beteiligten Signalproteine SMAD2 und SMAD3 und markieren diese so zur Proteindegradierung.<sup>219,220</sup> Unter der Annahme, dass CDKL1 eine ähnliche zelluläre Funktion wie GSK3A/B erfüllt, würde ein Funktionsverlust von CDKL1 zu einer Verstärkung des TGF $\beta$ -SMAD Signalweges führen. Dies ist - wie o. e. - ein bekannter Pathomechanismus für TAAD-Spektrumerkrankungen. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf die Interaktion zwischen CDKL1 und dem TGF $\beta$ -Rezeptor 1 (TGFBR1).<sup>221</sup> Dahingehend würde CDKL1 stromaufwärts des TGF- $\beta$ -Signalweges die Signalkaskade beeinflussen. Im Modellorganismus *D. melanogaster* wurde im Rahmen einer RNAi-basierten Suche nach Regulatoren des TGF- $\beta$ -Signalweges das Genprodukt Dmel/CG7236 beschrieben. Dieses ist ortholog zu *CDKL1*.<sup>222</sup>

In Familie #2 wurden Varianten in den Genen *MYO9A*, *MYBPC3*, *FLNC*, *ILKAP* und *MYLK3* identifiziert. Mutationen in *MYO9A* wurden u. a. bei Patienten mit einem Myasthenia Syndrom beschrieben (OMIM #618198). In HGMD sind 6 Missense-Varianten verzeichnet, die mit dem kongenitalen Myasthenia Syndrom<sup>190</sup>, einer bipolaren Störung<sup>223</sup> und distaler Arthrogrypose<sup>224</sup> assoziiert sind. *MYO9A* weist zudem einen hohen misZ- und pLI-Score auf. Sequenzveränderungen in *MYBPC3* und *FLNC* verursachen verschiedene Formen einer (Kardio-) Myopathie (OMIM #615396, #115197, #615396, #617047, #614065, #609524).<sup>209,225,226</sup> *FLNC* weist einen hohen misZ- und pLI-Score auf. Das Gen *ILKAP* zeigt ebenfalls eine hohe Intoleranz gegenüber Variabilität und *loss-of-function* Mutationen. *ILKAP* codiert für eine Serin-Threonin Phosphatase, die gemeinsam mit ILK (*Integrin-linked Kinase*) an der Aufrechterhaltung von Zelladhäsionen und der Regulation von GSK3 $\beta$ -abhängigen Signalwegen beteiligt ist.<sup>227</sup> Zu letzterem gehört auch der TGF- $\beta$ -Signalweg, dessen Fehlregulierung ein bekannter Pathomechanismus für TAAD ist. Das Kandidatengen *MYLK3* ist homolog zu *MYLK*, in welchem krankheitsursächliche Sequenzveränderungen bereits bei Patienten mit familiärer TAAD beschrieben wurden.<sup>78</sup> *MYLK* codiert für eine Kinase, welche das Myosin in Muskelzellen phosphoryliert und so die Interaktion zwischen Myosin und Aktin induziert. Dies ist essenziell für die Kontraktion von glatten Muskelzellen.

In Familie #3 wurden Varianten in den Genen *IGFN1*, *FAM83G* und *SMIM8* identifiziert. Die Gene *IGFN1* und *SMIM8* sind weder mit einer humanen Krankheit assoziiert, noch sind

bereits Mutationen in HGMD mit einem Phänotyp beschrieben worden. Für das Gen *FAM83G* sind zwei Missense-Varianten gelistet. Eine als krankheitsursächlich (DM) kategorisierte Variante wurde im Zusammenhang mit Palmoplantarkeratose und üppigem Kopfhauthaar beschrieben, eine andere Sequenzveränderung als DM? (*likely disease causing mutation*; wahrscheinlich krankheitsursächliche Mutation) für Autismusspektrum-Erkrankungen.<sup>228</sup>

In Familie #4 wurden Sequenzveränderungen in den Genen *TBC1D8*, *KIAA1217*, *TCF7* und *SHROOM1* aufgedeckt. Zwei in *TBC1D8* beschriebene Missense-Varianten sind als DM? (*likely disease causing mutation*; wahrscheinlich krankheitsursächliche Mutation) bei Patienten mit Intelligenzminderung und als Krankheits-assoziiertes Polymorphismus bei Veränderungen des Cholesterin-Spiegels annotiert.<sup>203,229</sup> Für *KIAA1217* wurde eine Missense-Variante als wahrscheinlich krankheitsursächlich für Autismusspektrum-Erkrankungen beschrieben.<sup>230</sup> Zwei Missense-Varianten in *TCF7* sind als DP (*disease-associated polymorphism*; Krankheitsassoziiertes Polymorphismus) und DM? (*likely disease causing mutation*; wahrscheinlich krankheitsursächliche Mutation) mit Diabetes Typ 1 und Darmkrebs respektive assoziiert.<sup>231,232</sup> Eine als DM? (*likely disease causing mutation*; wahrscheinlich krankheitsursächliche Mutation) kategorisierte Missense-Variante in *SHROOM1* wurde mit Schizophrenie assoziiert.<sup>213</sup> SHROOM Proteine haben eine Funktion bei der Regulation des Aktomyosin-Netzwerkes<sup>233-235</sup>; eine Beteiligung von *SHROOM1* an der Pathogenese von Bindegewebserkrankungen ist daher möglich.

In Familie #5 wurden Varianten in den Genen *MYH6* und *SLIT3* identifiziert. *MYH6* ist bereits mit Kardiomyopathie (OMIM #613251, #613252) und Atriumseptumdefekten (OMIM #614089) assoziiert. Die in dieser Arbeit aufgedeckte Variante in *MYH6* ist bereits als krankheitsursächliche Variante mit dem hyperplastischen Linksherz-Syndrom beschrieben<sup>210</sup> Außerdem wurde von einem anderen Aminosäureaustausch an dieser Proteinposition berichtet, die mit familiärer hypertropher Kardiomyopathie assoziiert ist [*MYH6* c.2384G>A, p.(Arg795Gln)].<sup>236</sup> Bei der Familie #5 wurde weder ein hyperplastisches Linksherz-Syndrom noch eine hypertrophe Kardiomyopathie beobachtet. *SLIT3* ist bisher mit keiner humanen Erkrankung assoziiert. Eine in HGMD verzeichnete, homozygote Deletion in dem Gen *SLIT3* wurde als wahrscheinlich krankheitsursächlich für kongenitale Anomalien der Niere und des Harntraktes beschrieben.<sup>237</sup> Missense-Varianten in *SLIT3* wurden mit Autismus<sup>230,238,239</sup> und Schizophrenie<sup>240</sup> assoziiert. Nonsense-Varianten wurden im Kontext mit Autismus<sup>239</sup> und konotrunkalen Herzfehlern sowie neurologischen Entwicklungsstörungen beschrieben.<sup>189</sup> Eine 646 kb umfassende Duplikation, einschließlich der Exons 1 bis 4 von *SLIT3* wurde mit Depressionen assoziiert.<sup>241</sup> Eine das Gen *SLIT3* betreffende Translokation ist außerdem bei einem Patienten mit

Hirntumoren und dem Hodgkin Lymphom beschrieben.<sup>242</sup> Das Gen *SLIT3* weist zudem einen hohen misZ- und einen hohen pLI-Score auf. Die p.(Gly1341Ser) -Variante in *SLIT3* betrifft die *EGF-like* Domäne des Proteins. *EGF-like* Domänen sind in vielen Proteinen der Extrazellulären Matrix zu finden und sind an der Regulation von Zelladhäsionen und der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt.<sup>243</sup> Zudem spielen Calcium-bindende *EGF-like* Domänen eine entscheidende Rolle bei Erkrankungen wie z. B. dem Marfan Syndrom.<sup>244</sup> Das Kandidatengen *SLIT3* codiert für einen Liganden der ROBO-Rezeptoren.<sup>245</sup> Der SLIT-ROBO Signalweg spielt u. a. eine Rolle bei der Zelladhäsion während der Polarisation von Herzzellen; zudem wird der NOTCH-Signalweg u. a. durch ROBO-Rezeptoren reguliert.<sup>245</sup> Über den NOTCH-Signalweg werden u. a. wichtige Prozesse während der Entwicklung des Herzens (z.B. Entwicklung der Endokardkissen, trabekuläres Wachstum, Entwicklung der Neuralleiste) reguliert.<sup>245</sup> Der Verlust von *ROBO1/2* und *SLIT3* führte bei Mäusen zu ventrikulärem Septumdefekt.<sup>245</sup> Außerdem wurde *SLIT3* in der Literatur als putativer angiogener Faktor während der Embryonalentwicklung beschrieben.<sup>246</sup>

In Familie #6 wurden Varianten in den Genen *WDR17*, *ITPR3*, *KIAA0408* und *RNPS1* detektiert. Die Gene *WDR17*, *KIAA0408* und *RNPS1* sind weder mit einer humanen Erkrankung assoziiert, noch sind Mutationen mit einem bestimmten Phänotyp in HGMD beschrieben. Bezüglich des Gens *ITPR3* hingegen wird diskutiert, dass Patienten mit Mutationen in *ITPR3* eine Neigung zu Diabetes Typ-1 aufweisen (OMIM #222100).<sup>247</sup> In HGMD sind Missense-Varianten in *ITPR3* als DM? mit Autismus Spektrumerkrankungen und peripherer Neuropathie annotiert.<sup>248,249</sup> Die Gene *ITPR3* und *RNPS1* weisen beide jeweils hohe misZ- und pLI-Scores auf.

In Familie #7 wurden Varianten in den Genen *VAV3*, *AGAP6*, *LBP* und *SLC13A4* identifiziert. Für das Gen *VAV3* sind 3 Missense-Varianten [2 davon DP (*disease-associated polymorphism*; Krankheitsassoziiertes Polymorphismus), 1 DM?], eine Spleiß-Variante [FP (*functional polymorphism*; *in vitro* oder *in vivo* funktioneller Polymorphismus)] sowie eine Deletion (DM?) in HGMD beschrieben und mit Schizophrenie, Autismus sowie der Regulation Thyroid-stimulierender Hormone assoziiert.<sup>250-254</sup> Für das Gen *SLC13A4* sind in HGMD 2 Missense und eine Deletion als FP gelistet und u. a. im Zusammenhang mit reduzierter Sulfat-Aufnahme beschrieben.<sup>255</sup> Für die zwei Kandidatengenen *VAV3* und *SLC13A4* ist nach Knockout dieser Gene in Mäusen neben kardialen, neuronalen und immunologischen Anomalien eine Beeinträchtigung der kardiovaskulären Entwicklung dokumentiert (MGI).<sup>202</sup> Das Gen *SLC13A4* weist zudem einen hohen misZ- und pLI-Score auf. Für das Gen *AGAP6* wurde eine 1-bp Insertion als DM? für das Rett-ähnliche Syndrom beschrieben.<sup>256</sup> Fünf Missense-Varianten in *LBP* wurden mit Sepsis bei Männern (DP), amyotropher Lateralsklerose (DM?), bronchopulmonaler Dysplasie

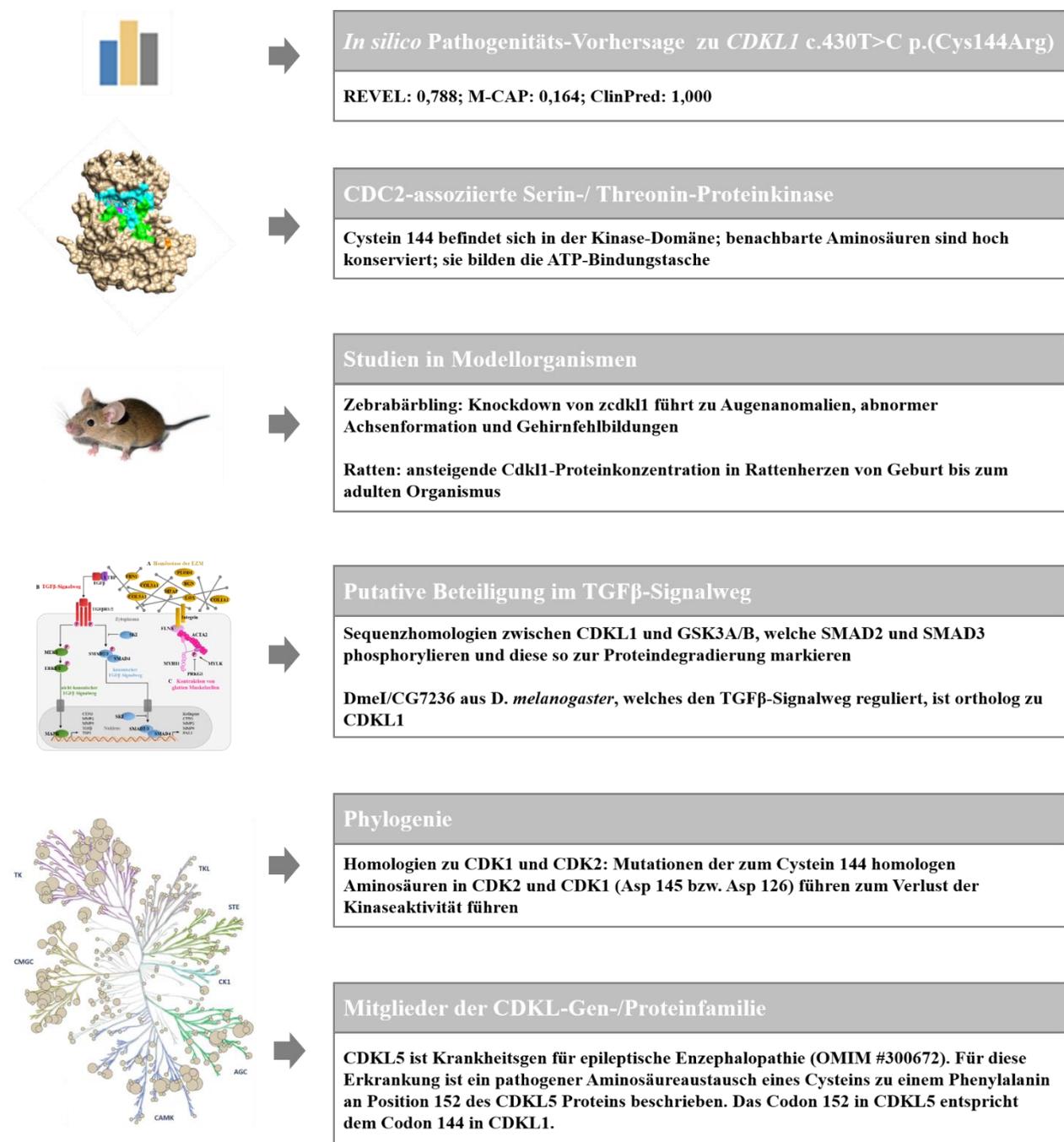
(DM?), reduzierter Bindungskapazität von LPS und Lipopeptiden (FP) sowie mit Sepsis und Multiorgan-Versagen [DFP (*disease-associated functional polymorphism*; Krankheits-assoziiierter Polymorphismus mit funktionellen Daten)] assoziiert.<sup>257-261</sup>

In Familie #8 wurden Varianten in *GATA5* und *ITGA1* identifiziert. Pathogene Varianten in *GATA5* verursachen kongenitale Herzfehler (OMIM # 617912), wie beispielsweise bikuspidale Aortenklappen (BAV).<sup>139,207,208</sup> Bezüglich *ITGA1* ist eine Missense-Variante (DP) in HGMD verzeichnet, die mit einem erhöhten Risiko für Hirntumore assoziiert ist.<sup>262</sup>

Wie bereits in Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurde auch in der erneuten Auswertung der ES-Daten *CDKL1* als Kandidatengen für hereditäre Aortenerkrankungen präferiert (Abb. 15). Diese Präferenz basiert auf hohen Scores aus den *in silico* Pathogenitätsvorhersage-Programmen für die *CDKL1* p.(Cys144Arg)-Variante, der Position der betroffenen Aminosäure in der Kinase-Domäne des Proteins, sowie auf Studien in Modellorganismen und Homologien zu bekannten Akteuren des TGF- $\beta$ -Signalweges (Abb. 15). *CDKL1* ist ein Mitglied der CDC2-assoziierten Serin-Threonin Proteinkinase Familie. Die CDC (*cell-division-cycle*)-Proteine sind wichtige Regulatoren des Zellzyklus von eukaryotischen Zellen. Sie regulieren u. a. die Zellteilung, Zelldifferenzierung und Apoptose.<sup>263</sup> Das CDC2-Protein (*CDK1*; *cell-dependent kinase 1*) ist ein Schlüsselregulator im Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase. Aus phylogenetischer Sicht stammen die *CDKL*-Proteine von der *CDK*-Proteinfamilie ab.<sup>263</sup> Im Gegensatz zu *CDKs* ist für die *CDKL*-Proteine keine Interaktion mit Cyclinen bekannt. Vielmehr weisen sie wie auch die Familie der *MAP*-Kinasen das konservierte Phosphorylierungsmotif Thr-X-Tyr (X: Glycin, Prolin oder Glutaminsäure)<sup>264-266</sup> auf und könnten dahingehend an der Signaltransduktion (u. a. Proliferation, Differenzierung, Motilität und Apoptose) beteiligt sein.<sup>267</sup> *CDKL1* weist Homologien zu den Kinasen *CDK2* und *CDK1* auf, welche den Zellzyklus steuern.<sup>267</sup> Mutationen der zum Cystein 144 homologen Aminosäuren in *CDK2* und *CDK1* (Asp 145 bzw. Asp 126) führten zum Verlust der Kinaseaktivität; daher wurden diese Mutationen als dominant-negative postuliert.<sup>267-272</sup> Die Familie der *CDKL*-Gene besteht aus 5 Mitgliedern: *CDKL1*, *CDKL2*, *CDKL3*, *CDKL4* und *CDKL5*. *CDKL5* ist ein bekanntes Krankheitsgen für eine Form der epileptischen Enzephalopathie (OMIM #300672). Für diese Erkrankung ist ein pathogener Aminosäureaustausch eines Cysteins zu einem Phenylalanin an Position 152 des *CDKL5* Proteins beschrieben.<sup>273</sup> Das Codon 152 in *CDKL5* entspricht dem Codon 144 in *CDKL1*.<sup>264</sup>

Zusammengefasst untermauern *in silico* Pathogenitätsvorhersagen, die Lage der Mutation in einer funktionellen Proteindomäne, veröffentlichte Studien an Modellorganismen, Homologien zu Proteinen des TGF- $\beta$ -Signalweges sowie Daten über verwandte Proteinkinasen bzw. zu anderen

Mitgliedern der CDKL-Proteinfamilie eine mögliche Beteiligung der *CDKL1* c.430T>C p.(Cys144Arg)-Variante an der Pathogenese der Aortenerkrankung in Familie #1 (Abb. 15). *CDKL1* wurde als Top-Kandidateng für hereditäre Aortopathien präferiert.



**Abb. 15: Das Kandidateng *CDKL1*.** In der Abbildung sind Ergebnisse und Informationen aus der *in silico*-Pathogenitätsvorhersage zur *CDKL1* p.(Cys144Arg)-Variante und aus der Literatur zusammengefasst. Abbildung zur Phylogenie von Kinasen (Abbildung links, unten) verändert nach [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com).

## 2.4 Verifizierung von *CDKLI* als Kandidatengen durch Mutationsanalysen

Im Rahmen von Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Rosenberger alle 9 Exons einschließlich angrenzender intronischer Bereiche des *CDKLI* Gens bei 175 Patienten mit dem Verdacht auf eine hereditäre Aortenerkrankung mittels Sanger-Sequenzierung analysiert.

Diese Mutationsanalyse deckte die *CDKLI* c.620C>T (p.Ser207Leu) Variante bei einem Geschwisterpaar (Familie #9) mit Verdacht auf ein erbliches Aortensyndrom auf (Abb. 16B). Für diese Sequenzveränderung sind in der gnomAD Datenbank 6 heterozygote Anlageträger (Allelfrequenz: 0,002389%) beschrieben. Die Sequenzveränderung führt auf Proteinebene zum Austausch eines Serins gegen ein Leucin an der Proteinposition 207. Das Serin befindet sich in Nachbarschaft zu hoch konservierten Aminosäuren, die an der Substrat-Bindung beteiligt sind (Abb. 16E). Es wurde bereits über eine dominant-negativ wirkende Mutation der zur CDKLI-Aminosäure 208 analogen Aminosäure in *S. pombe* cdk2 berichtet (p.Asp208Lys)<sup>274</sup>.

Im Rahmen der zielgerichteten NGS-basierten Gen-Panel-Analyse am Institut für Humangenetik in Hamburg (UKE), welche seit Anfang 2018 auch die Analyse des *CDKLI* Gens beinhaltet, wurde eine weitere Sequenzveränderung in *CDKLI* aufgedeckt (Abb. 16C). Die Variante *CDKLI* c.407C>T (p.Thr136Met) mit einer Allelfrequenz von 0,003538% in der Allgemeinbevölkerung (10 heterozygote Anlageträger in gnomAD) wurde bei einer Patientin (#200) mit Verdacht auf sporadische TAAD identifiziert. Eine Segregationsanalyse bei klinisch (noch) unauffälligen Personen in ihrer Familie wurde zum Zeitpunkt dieser Dissertation nicht durchgeführt.

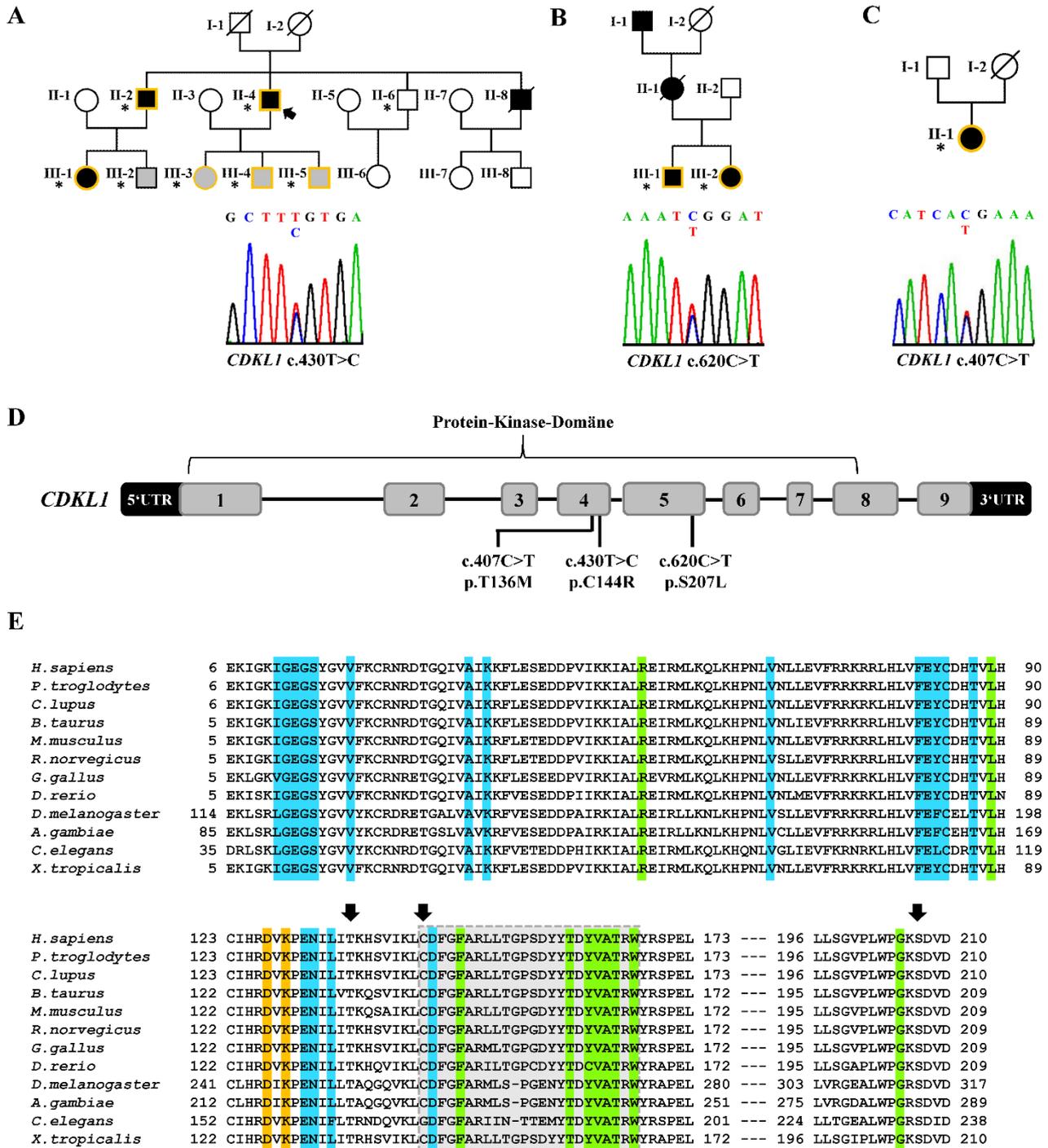


Abb. 16: Identifizierte Sequenzveränderungen in CDKL1 betreffen hoch konservierte Aminosäuren in der Protein-Kinase-Domäne. (Siehe Legende auf der nächsten Seite.)

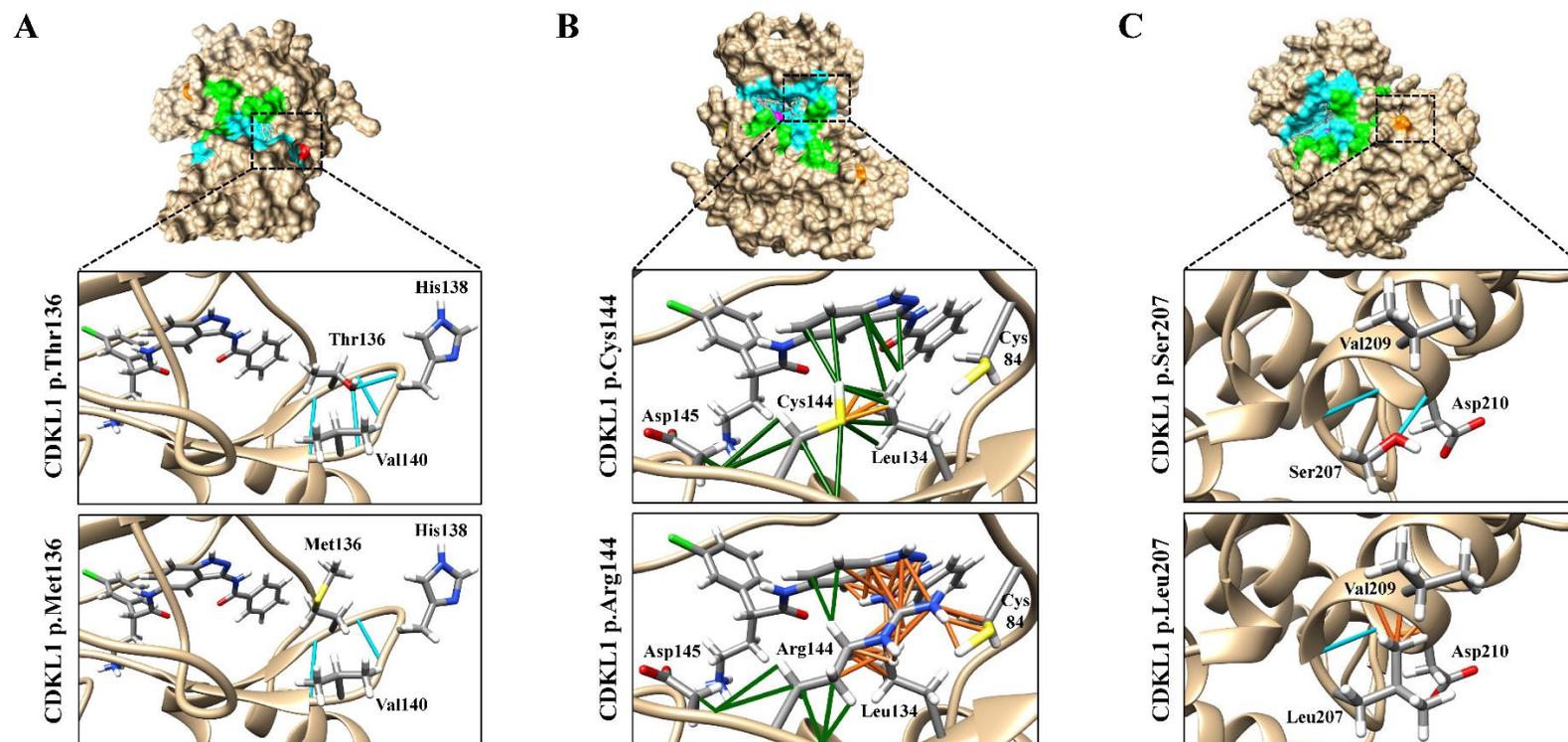
**Legende zur Abb. 16. A:** Die Sequenzveränderung *CDKLI* c.430T>C wurde mittels ES-Analyse in der Familie #1 identifiziert. Neben dem Indexpatienten (II-4) mit vorliegendem Verdacht auf Marfan Syndrom wurde die Sequenzveränderung *CDKLI* c.430T>C bei drei Kindern des Indexpatienten (III-3, III-4, III-5), seinem Bruder (II-2) sowie seiner Nichte (III-1) nachgewiesen (orange markiert). **B:** Mittels Sanger-Sequenzierung wurde die *CDKLI* c.620C>T Variante bei einem Geschwisterpaar (Familie #9) mit hereditärem Aortensyndrom identifiziert (orange markiert). **C:** In der zielgerichteten NGS-Gen-Panel-Analyse wurde die Variante *CDKLI* c.407C>T bei einer sporadischen Patientin (#200) mit TAAD aufgedeckt (orange markiert). Eine Segregationsanalyse wurde bislang nicht durchgeführt. **D:** Schematische Darstellung aller 9 Exons (grau) und der Introns (schwarze Linien) sowie der 5'- und 3'-UTR des *CDKLI* Gens. Die ersten sieben Exons sowie der 5'-Bereich von Exon 8 sind Teil der Protein-Kinase-Domäne.<sup>201</sup> Die Varianten *CDKLI* c.407C>T und c.430T>C befinden sich in Exon 4. Die Sequenzveränderung *CDKLI* c.620C>T liegt in Exon 5. **E:** Alignment partieller Sequenzbereiche von orthologen CDKLI-Proteinen in unterschiedlichen Spezies (übernommen aus PubMed, HomoloGene; NCBI CDD). Aminosäuren, die an der ATP- oder der Substrat-Bindung bzw. an der Bindung von ATP und des Substrates beteiligt sind, sind respektive in blauer, grüner und oranger Farbe hervorgehoben. Aminosäuren des Aktivierungs-Loops sind grau unterlegt.<sup>215</sup> Die Positionen der Aminosäuren Threonin 136, Cystein 144 und Serin 207 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das Alignment zeigt eine hohe Konservierung dieser Aminosäuren.

## 2.5 Interaktive Strukturmodellanalysen von CDKLI mittels UCSF Chimera

Das Alignment von orthologen CDKLI-Proteinen zeigte eine hohe Konservierung von Aminosäuren in der Protein-Kinase-Domäne auf. Die mittels NGS und Sanger-Sequenzierung identifizierten Varianten in *CDKLI* führen zu einem Austausch von Aminosäuren, die in direkter Nachbarschaft von Aminosäuren lokalisiert sind, die an der Bildung der ATP-Bindungstasche (Threonin 136 und Cystein 144) bzw. an der Substratbindung (Serin 207) beteiligt sind. Eine *in silico* Strukturanalyse sollte Aufschluss geben, inwieweit Aminosäure-Substitutionen an den Positionen 136, 144 und 207 die Struktur der ATP- und Substrat-Bindemotive beeinträchtigt.

Für eine interaktive Strukturanalyse wurde die kristallographische Struktur von humanem CDKLI (PDB ID: 4AGU)<sup>214</sup> mit einem ATP-Analogon als Template verwendet. In der Abb. 17 ist neben der Oberflächenstruktur von CDKLI aus unterschiedlichen Perspektiven eine Detailansicht der Aminosäuren Threonin 136 (Abb. 17A, oben), Cystein 144 (Abb. 17B, oben) und Serin 207 (Abb. 17C, oben) beziehungsweise der Aminosäuren Methionin 136 (Abb. 17A, unten), Arginin 144 (Abb. 17B, unten) und Leucin 207 (Abb. 17C, unten) im Kontext der dreidimensionalen Struktur gezeigt. Threonin 136 befindet sich in einer Loop-ähnlichen Struktur in Nachbarschaft zu der ATP-Bindungstasche und bildet insgesamt vier Wasserstoffbrückenbindungen zu den benachbarten Aminosäuren Histidin 138 und Valin 140 aus, zwei davon über das Sauerstoff-Atom der Aminosäure-Seitenkette des Threonins. Der *in silico* Aminosäureaustausch *CDKLI* p.(Thr136Met) führt zum Verlust von zwei

Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 17A). Die Strukturanalyse sagte keine Wechselwirkungen von Threonin 136 mit dem ATP-Analogen voraus, allerdings deutet schon allein die räumliche Nähe zur ATP Bindetasche auf eine Störung der molekularen Interaktion zwischen CDKL1 und dem ATP-Analogen durch die p.(Thr136Met) Aminosäuresubstitution hin. Das Cystein 144 weist VDW-Kontakte zu den benachbarten Aminosäuren Leucin 134 und Asparaginsäure 145 sowie zu Kohlenstoff-Atomen des Adenins von dem ATP-Analogen auf. Zudem wurden intramolekulare Überlappungen der VDW-Sphären von Cystein 144 und Leucin 134 beobachtet. Für den *in silico* Austausch CDKL1 p.(Cys144Arg) wurden zusätzliche intramolekulare VDW-Wechselwirkungen mit überlappenden VDW-Sphären von Kohlenstoff- und Stickstoffatomen des Arginins 144 und dem Adeninrest des ATP-Analogons vorhergesagt. Außerdem führt der Aminosäureaustausch zu dem Verlust von zwei VDWs zwischen Argin 144 und Leucin 134 (Abb. 17B, unten). Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass die räumliche Struktur der ATP-Bindungstasche und damit die Bindung von ATP beeinträchtigt wird. Die Aminosäure Serin 207 befindet sich in einer helikalen Struktur des CDKL1-Proteins und bildet zwei Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Asparaginsäure 210 und Glutamin 211 aus. Für den *in silico* Aminosäureaustausch CDKL1 p.(Ser207Leu) wird der Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zur Asparaginsäure 210 vorhergesagt. Außerdem wurden insgesamt vier zusätzliche VDW Kontakte mit überlappenden VDW-Sphären von Leucin 207 zu Valin 209 und Asparaginsäure 210 beobachtet (Abb. 17C, unten). Diese Veränderungen können durchaus zu Konsequenzen in der Kinase-Substrat-Bindung führen.



**Abb. 17: Strukturelle Auswirkungen der CDKL1 Mutanten p.Thr136Met, p.Cys144Arg und p.Ser207Leu.** Oberfläche des CDKL1 Proteins und die strukturellen Umgebungen der Aminosäuren Thr136 (A, oben), Cys144 (B, oben) und Ser207 (C, oben) bzw. Met136 (A, unten), Arg144 (B, unten) und Leu207 (C, unten). Die Kristallstruktur des humanen CDKL1 Proteins in Komplex mit einem ATP-Analogon (PDB ID: 4AGU) wurde als Template für die Strukturmodellanalyse verwendet<sup>214</sup> und mithilfe der Software UCSF Chimera visualisiert. Zum Austausch von Aminosäuren und der Analyse von nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen (VDW) wurden UCSF Chimera built-in Werkzeuge verwendet. Die Oberfläche von CDKL1 ist in beige dargestellt. Aminosäuren, die an der ATP- und Substrat-Bindung beteiligt sind, sind respektive in blau und grün hervorgehoben. Die Aminosäurepositionen 136, 144 und 207 sind rot, magenta und orange markiert. Die Detailansichten zeigen Threonin 136, Cystein 144 und Serin 207 mit strukturell benachbarten Aminosäuren. Die Elemente der Aminosäure-Seitenketten sowie vom ATP-Analogon sind farblich markiert (Wasserstoff: weiß; Sauerstoff: rot; Kohlenstoff: grau; Stickstoff: blau; Chloridatom). Für alle dargestellten Aminosäuren wurde ein Torsionswinkel gewählt, der am wahrscheinlichsten ist (Berechnungen von UCSF Chimera). Es wurden nicht-kovalente Van-der-Waals Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken: blaue Linien; Kontakte der VDW-Sphären: dunkelgrüne Linien; überlappende VDW-Sphären: orange Linien) innerhalb einer Umgebung von 5,0 Å identifiziert. Kontakte zwischen Atomen, die  $\leq 2$  Bindungen voneinander entfernt liegen, sowie Kontakte von Atomen innerhalb einer Aminosäure wurden ignoriert.

## 2.6 Funktionelle Mutationsanalysen zu CDKL1

Aufgrund der beschriebenen Informationen und Daten zu *CDKL1* wurden die Sequenzveränderungen in *CDKL1* als wahrscheinlich krankheitsursächlich für die hereditäre Aortopathie in Familie #1, dem Geschwisterpaar (Familie #9) und der sporadischen Patientin #200 angesehen. In der gnomAD-Datenbank sind etwa 203 heterozygote Anlageträger einer *CDKL1*-Variante, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon führen, verzeichnet. Daher scheint eine NMD (*nonsense mediated mRNA decay*)-bedingte funktionelle Haploinsuffizienz von CDKL1 für den Menschen unschädlich zu sein. U. a. deshalb wurde für die hier identifizierten CDKL1-Varianten ein Funktionsverlust der Kinase-Aktivität bzw. der Substratbindekazapazität vorgeschlagen und eine dominant-negative Auswirkung auf die Zellphysiologie postuliert. Um derartige Auswirkungen der Sequenzvarianten auf die Proteinfunktion zu untersuchen, wurden funktionelle Mutationsanalysen durchgeführt.

### 2.6.1 Analyse der Funktion von CDKL1 im TGF- $\beta$ -Signalweg

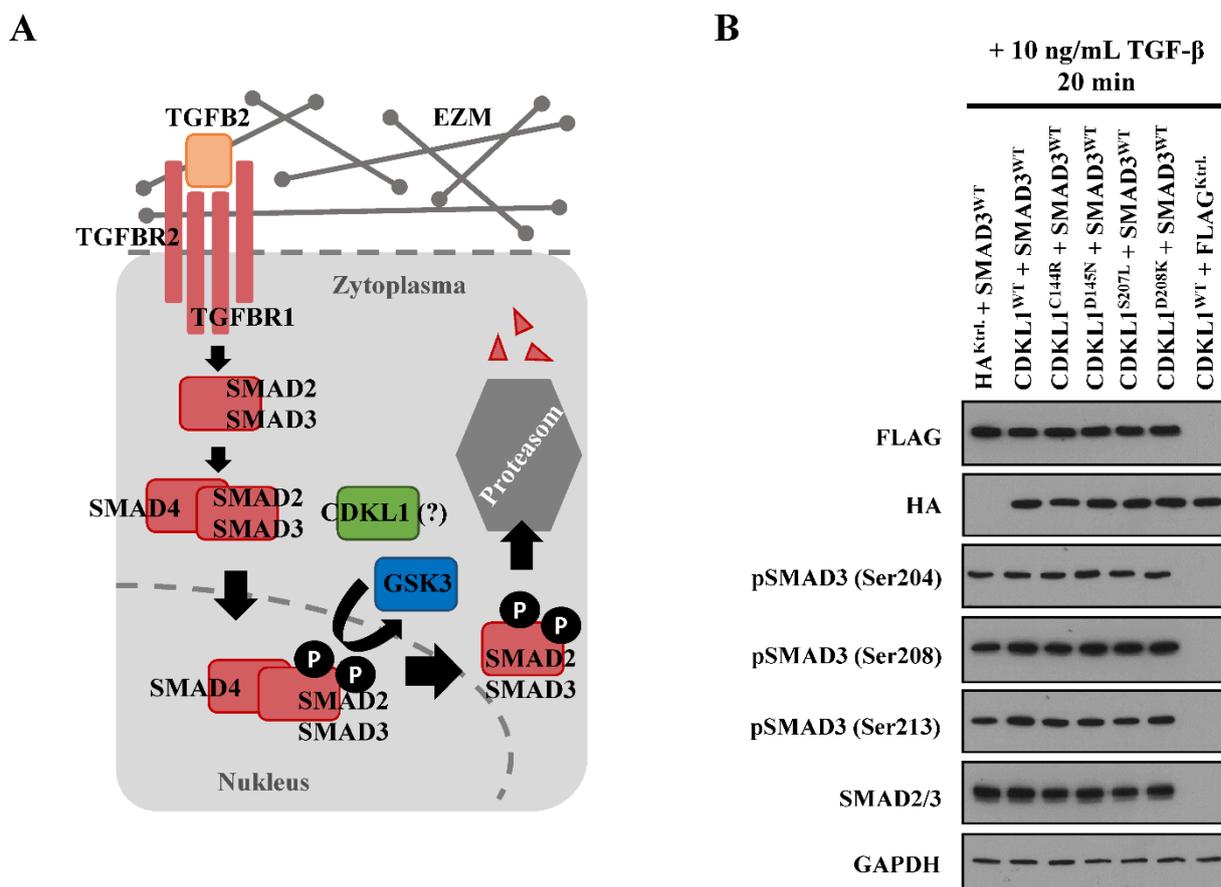
Das Protein CDKL1 weist Sequenzhomologien zu den Proteinen GSK3A und GSK3B auf, welche die Signalproteine SMAD2 und SMAD3 phosphorylieren. SMAD2 und SMAD3 sind im TGF- $\beta$ -Signalweg beteiligt. Die Phosphorylierung von SMAD3 an den Serinen 204, 208 und 213 führt zur Degradierung des SMAD3 Proteins im Proteasom. Im Rahmen von Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurde durch Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Rosenberger der Phosphorylierungs-Status von SMAD3 in eukaryotischen Zellen bei transienter Überexpression von WT- oder mutiertem CDKL1 untersucht. Die Arbeitshypothese, wie CDKL1 in den TGF- $\beta$ -Signalweg eingreifen könnte, ist in Abb. 18A skizziert.

Neben den Mutanten CDKL1<sup>C144R</sup> und CDKL1<sup>S207L</sup>, welche bei der Familie #1 und einem Geschwisterpaar (Familie #9) aufgedeckt wurden, wurden auch die Auswirkungen der Mutanten CDKL1<sup>D145N</sup> und CDKL1<sup>D208K</sup> untersucht. Letztere sind zwei dominant-negative Varianten, die für CDK2 (D145N) aus *H. sapiens* und CDK2 (D208K) aus *S. pombe* beschrieben sind und die homologen benachbarten Aminosäuren von CDKL1 (Aminosäuren 144 und 207) betreffen.<sup>267-</sup>

272,274

Die immunologische Detektion nach Western Blotting Analyse, zeigte keine Unterschiede in der Expression von CDKL1<sup>WT</sup> Protein und den CDKL1 mutanten Proteinen (Abb. 18B). FLAG-SMAD3 Protein war ebenfalls in allen Zelllysaten gleich stark exprimiert. Zudem wurden keine Unterschiede in der Expression von gesamten SMAD2/SMAD3 (d.h. sowohl überexprimiertes

SMAD3 als auch endogenes SMAD2 und SMAD3) zwischen den unterschiedlichen Zelllysaten beobachtet. Hinsichtlich der Phosphorylierung von SMAD3 an den Aminosäuren 204, 208 und 213 wurden keine Unterschiede zwischen WT- und mutiertes CDKL1 Protein exprimierenden Zellen festgestellt (Abb. 18B).



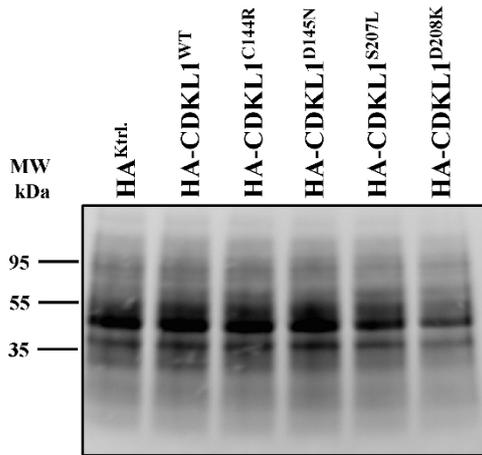
**Abb. 18: Funktionelle Analysen zur Phosphorylierung von SMAD3 durch CDKL1.** **A:** Skizzierte Darstellung der putativen Rolle von CDKL1 bei der Phosphorylierung/Degradierung von SMAD3 aufgrund beschriebener Homologien zu GSK3-Proteinen. SMAD3 ist ein Regulatorprotein des TGF- $\beta$ -Signalweges. Durch Phosphorylierung wird SMAD3 markiert und der proteasomalen Degradierung zugeführt. Der Verlust von GSK3 bzw. CDKL1 würde zur Verstärkung des TGF- $\beta$ -Signalweges führen. EZM, Extrazelluläre Matrix. **B:** Western Blotting Analyse von Zelllysaten aus HEK293T Zellen, die FLAG-konjugiertes SMAD3<sup>WT</sup> Protein und HA-konjugiertes CDKL1<sup>WT</sup> oder mutiertes CDKL1 Protein transient exprimieren. Nach transienter Transfektion der angegebenen Plasmid-Kombinationen (pMT2smHA<sup>Leervektor</sup>+pCMV4-FLAG-SMAD3<sup>WT</sup>, pMT2smHA-CDKL1<sup>WT</sup>+pCMV4-FLAG-SMAD3<sup>WT</sup>, pMT2smHA-CDKL1<sup>C144R</sup>+pCMV4-FLAG-SMAD3<sup>WT</sup>, pMT2smHA-CDKL1<sup>D145N</sup>+pCMV4-FLAG-SMAD3<sup>WT</sup>, pMT2smHA-CDKL1<sup>S207L</sup>+pCMV4-FLAG-SMAD3<sup>WT</sup>, pMT2smHA-CDKL1<sup>D208K</sup>+pCMV4-FLAG-SMAD3<sup>WT</sup>, pMT2smHA-CDKL1<sup>WT</sup>+pCMV4-FLAG<sup>Leervektor</sup>) wurden HEK293T Zellen mit 10 ng/mL TGF- $\beta$  für 20 Minuten stimuliert. Nach Lyse und PAA-Gelelektrophorese und Westernblotting erfolgte die immunologische Detektion mithilfe spezifischer Primärantikörper für FLAG, HA, SMAD2/3, pSMAD3-Ser204, pSMAD3-Ser208, pSMAD3-Ser213 sowie GAPDH und HRP-konjugierter Sekundärantikörper. Die anschließende HRP-vermittelte Enzymreaktion wurde autoradiographisch ausgewertet. Ktrl., HA- bzw. FLAG-Leervektor-Kontrolle.

## 2.6.2 Analyse der Proliferation und von Regulatoren des Zellzyklus

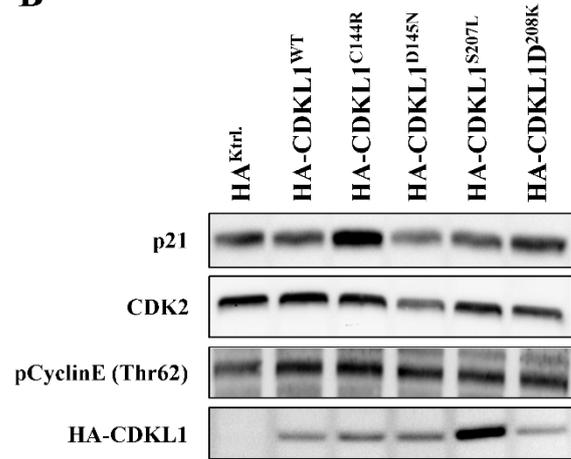
CDKL1 ist ein Mitglied der CDC2-assoziierten Serin-Threonin Proteinkinase Familie. Im Rahmen von Forschungsarbeiten zur Funktion von CDKL1 bei malignen Brust- und Darmtumoren wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown von *CDKL1* durchgeführt.<sup>275</sup> Mittels Western Blotting Analyse wurde beobachtet, dass durch den Knockdown von *CDKL1* in A375 und MV3 Zellen die endogene Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21 gesteigert sowie die endogene Expression von CDK2 vermindert ist.<sup>275</sup>

Daher wurde untersucht, ob die aufgedeckten Sequenzveränderungen in *CDKL1* zu einer Veränderung der Proteinexpression von p21 und CDK2 führen. Zudem wurde der Phosphorylierungs-Zustand des endogenen Proteins CyclinE analysiert. CyclinE ist ebenfalls ein Akteur am Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus. Es wird durch CDK2 phosphoryliert (u. a. an der Position Thr62).<sup>276</sup> Für die Analyse wurden HA-CDKL1<sup>WT</sup> bzw. mutantes HA-CDKL1 Protein in HeLa Zellen stabil exprimiert. Zur Synchronisation der HeLa-Zellen in der G1/S-Phase des Zellzyklus wurde ein doppelter Thymidin-Block durchgeführt. In 5 unabhängigen Experimenten wurden im Anschluss Zelllysate hergestellt, die in einer Western Blotting Analyse hinsichtlich der endogenen Expression von p21 und CDK2 sowie dem Phosphorylierungs-Zustand von CyclinE (pCyclinE Thr62) untersucht wurden (Abb. 19B). Es war eine stärkere Expression von HA-CDKL1<sup>S207L</sup> im Vergleich zu der Expression des WT Proteins und den Mutanten C144R, D145N und D208K zu beobachten (Abb. 19B). Die Signalintensitäten aus der Western Blotting Analyse wurden auf die Gesamtproteinmenge eines Zelllysates normalisiert. Hierzu wurde die *stain-free* Technologie der Firma Bio-Rad verwendet, mittels derer die Gesamtheit aller Proteine eines Zelllysates in einem *stain-free* Blot (Bio-Rad) nach dem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran detektiert werden konnte (Abb. 19A). Bei dieser Analyse wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede der Expression von p21 (Abb. 19C) und CDK2 (Abb. 19D) bzw. des Phosphorylierungs-Zustandes von CyclinE zwischen Zellen, die HA-CDKL1<sup>WT</sup>, HA-CDKL1<sup>C144R</sup>, HA-CDKL1<sup>D145N</sup>, HA-CDKL1<sup>S207L</sup> oder HA-CDKL1<sup>D208K</sup> exprimieren (Abb. 19E), errechnet.

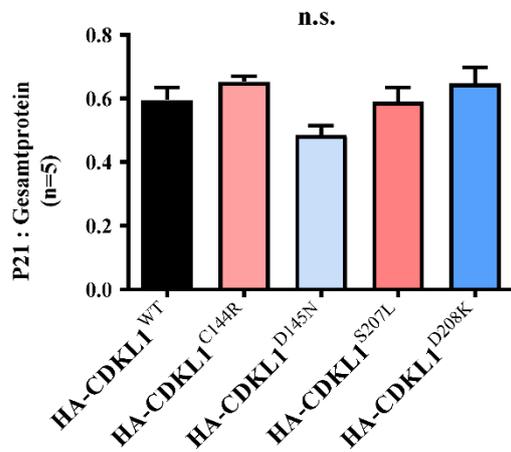
A



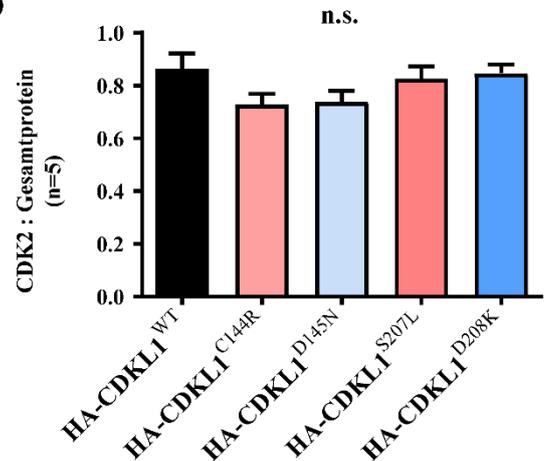
B



C



D



E

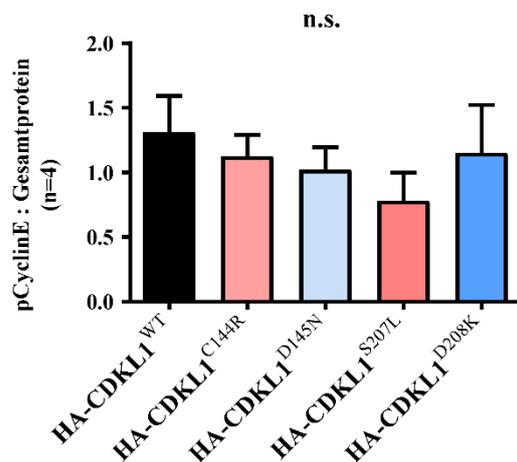
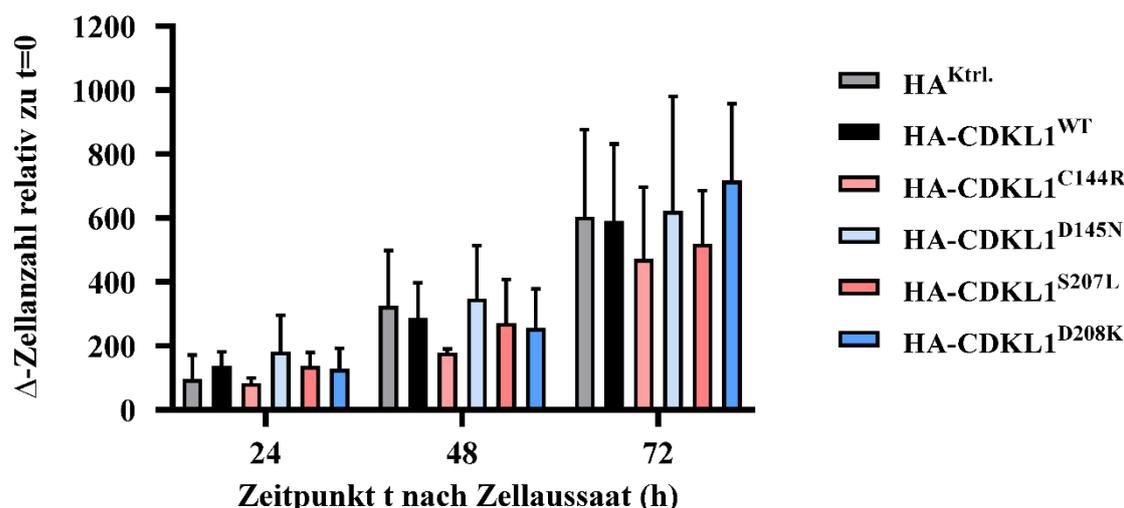


Abb. 19: Auswirkungen von CDK1<sup>WT</sup> und CDK1 Mutanten auf die endogene Expression und die Phosphorylierung von Regulatoren des Zellzyklus. (Siehe Legende auf der nächsten Seite.)

**Legende zur Abb. 18.** Es wurde die endogene Expression der Zellzyklus-Proteinen p21 und CDK2 sowie der Phosphorylierungs-Zustand von Cyclin E (Thr62) mittels Western Blotting in 5 bzw. 4 unabhängigen Experimenten untersucht. HA-CDKL1<sup>WT</sup> (schwarz) bzw. HA-CDKL1<sup>C144R</sup> (hellrot), HA-CDKL1<sup>D145N</sup> (hellblau), HA-CDKL1<sup>S207L</sup> (rot) oder HA-CDKL1<sup>D208K</sup> (blau) wurden in HeLa Zellen stabil exprimiert und Zelllysate wurden hergestellt. **A:** Repräsentative *stain-free* Analyse (Bio-Rad) zur Detektion der Gesamtproteinmenge in Zelllysaten. **B:** Repräsentative Western Blots zur Analyse der Expression von p21, CDK2, pCyclin E und HA-konjugierten CDKL1 Fusionsproteinen. Die Expression von HA-CDKL1<sup>WT</sup> und der HA-CDKL1 Mutanten wurde mithilfe eines HRP-konjugierten HA-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Die Detektion von p21, CDK2 und pCyclinE (Thr62) wurde mit Epitop-spezifischen Primärantikörpern und einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper durchgeführt. Die HRP-vermittelte Enzymreaktion wurde mittels Autoradiographie ausgewertet. **C:** Auswertung von 5 unabhängigen Experimenten zur Analyse der endogenen Expression von p21. **D:** Auswertung von 5 unabhängigen Experimenten zur Analyse der endogenen Expression von CDK2. **E:** Auswertung von 4 unabhängigen Experimenten zur Analyse der Phosphorylierung von Cyclin E an der Position Thr 62. **A-E:** Die Signalintensitäten aus der Autoradiographie hinsichtlich der Expression von p21, CDK2 und pCyclinE-Thr62 wurden jeweils auf die Gesamtproteinmenge in dem gleichen Zelllysate normalisiert. Für die statistische Auswertung wurde ein One-Way-ANOVA mit einem Dunnett Post-Hoc Mehrfachvergleichstest durchgeführt. n.s., nicht signifikant. Ktrl., HA-Leervektor-Kontrolle.

In einem weiteren Experiment wurde die Proliferation von HeLa Zellen bei stabiler Expression von HA-CDKL1<sup>WT</sup> bzw. mutanten HA-CDKL1 Proteinen in einer FACS-basierten Analyse untersucht. Es wurden keine statistisch signifikant Proliferationsunterschiede zwischen Zellen, die HA-CDKL1<sup>WT</sup> oder mutantes HA-CDKL1 Protein exprimieren festgestellt ( $p=0,8685$ ). Das Ergebnis aus dieser Analyse ist in Abb. 20 zusammengefasst.



**Abb. 20: Analyse der Proliferation von HeLa Zellen in Abhängigkeit von CDKL1.** (Siehe Legende auf der nächsten Seite.)

**Legende zur Abb. 20.** Stabil transfizierte HeLa-Zellen (HA-CDKL1<sup>WT</sup>, HA-CDKL1<sup>C144R</sup>, HA-CDKL1<sup>D145N</sup>, HA-CDKL1<sup>S207L</sup> oder HA-CDKL1<sup>D208K</sup>) wurden in eine 12-Loch Kulturplatte ausgelegt und kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Zellzahlen wurden in einer FACS-basierten Analyse bei Zugabe von AccuCheck Counting Beads (Invitrogen, Karlsruhe) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für jede Messung wurden exakt 2000 Beads am FACS-Gerät akquiriert und die absolute Anzahl von HeLa Zellen, die währenddessen die Messzelle passierten, bestimmt. Zur Auswertung wurden die Differenzen zwischen den Zellzahlen zum Zeitpunkt t=0 und t=24, t=48 und t=72 Stunden errechnet. In dem Balkendiagramm sind jeweils die Veränderungen der Zellanzahlen über 24, 48 und 72 Stunden gezeigt. Für die statistische Auswertung wurden ein Two-Way-ANOVA und ein Dunnett Post-Hoc Mehrfachvergleichstest durchgeführt. Δ, Differenz. Ktrl., HA-Leervektor-Kontrolle.

### 2.6.3 Analyse der Kinase-Aktivität von CDKL1 mit dem *in vitro* ADP-Glo™ Kinase System

CDKL1 ist ein Mitglied der CDK1-assoziierten Serin-/Threonin-Proteinkinase Familie, welche einen hohen Grad an Sequenzhomologien zu CDKs aufweisen. Außerdem besitzen CDKLs ein den MAP Kinasen ähnliches TXY-Phosphorylierungsmotif zur Aktivierung<sup>266</sup> und eine putative Cyclin-Bindungsdomänen; eine Interaktion mit Cyclinen wurde jedoch nicht nachgewiesen.<sup>267</sup>

In dieser Arbeit wurde die Kinaseaktivität des CDKL1-Proteins sowie der Mutanten CDKL1<sup>C144R</sup> und CDKL1<sup>S207L</sup> in einem *in vitro* Kinase-Aktivitäts-Test untersucht. Ein exaktes Substrat von CDKL1 war zum Zeitpunkt dieses Promotionsvorhabens nicht bekannt. In der Literatur ist beschrieben, dass Ime2, eine CDK-assoziierte Kinase aus *S.cerevisiae*, bekannte Substrate von CDK1 *in vitro* phosphoryliert.<sup>277</sup> Mittels eines positionellen Peptid-Arrays wurde ein idealisiertes Substratpeptid zur Phosphorylierung durch Ime2 ermittelt (Peptidsequenz: RPRSRGARR).<sup>277</sup> Die Arbeitsgruppe um Canning *et al.* (2018) führte Analysen zur Bestimmung der Kinase-Aktivität von CDKL1-Proteinen in Hefen durch. In einem radiometrischen *in vitro* Kinase-Assay wurde ein artifizielles Ime2 Peptidsubstrat mit der Peptidsequenz RPRSPGARR verwendet.<sup>264</sup> Dieses unterschied sich lediglich in einem Prolin statt eines Arginins an der Peptidposition 5 zu dem idealisierten Peptid von Holt *et al.* (2007). Das in dieser Arbeit für die Durchführung der ADP-Glo™ Kinase Analyse verwendete Substrat war ein artifizielles Peptid mit der Sequenz RPRSPGARR (wie auch bei Canning *et al.*), welches eine Acetyl-Gruppe am N-Terminus sowie eine Amid-Gruppe am C-Terminus des Peptides trug. Die Aktivitäts-Analyse eines HA- bzw. EGFP-konjugierten Ime2 Fusionsproteins diente als Positivkontrolle für die Kinase-Aktivität gegenüber dem artifiziellem Peptidsubstrat (Abb. 21, grün).

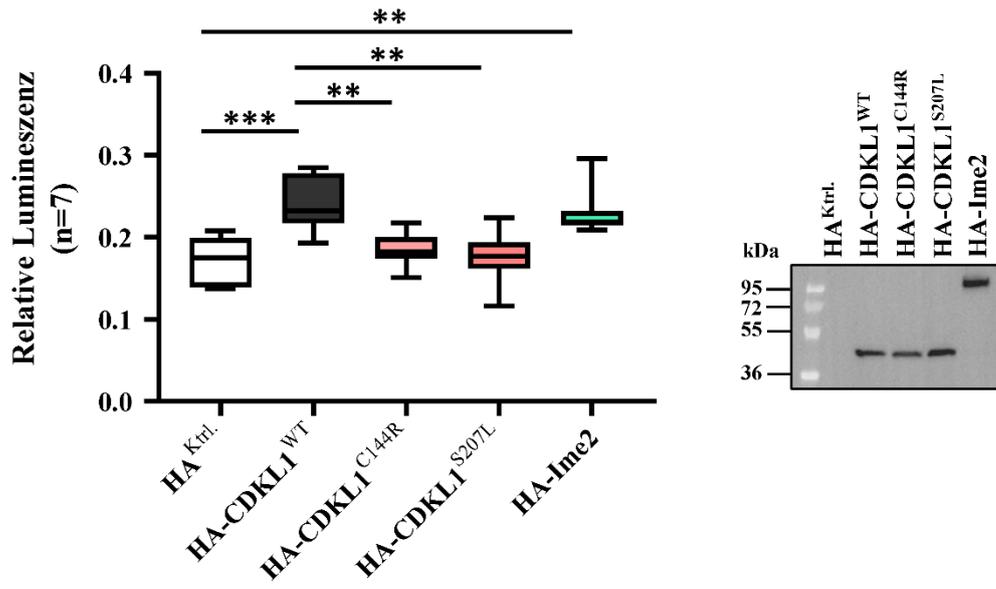
In Abb. 21A ist das Ergebnis aus der Analyse von HA-konjugierten Fusionsproteinen dargestellt. Die HA-CDKL1<sup>WT</sup> und mutanten HA-CDKL1 Proteine wurden in HeLa Zellen transient exprimiert und anschließend mithilfe HA-spezifischer Antikörper, die auf magnetischen

Dynabeads (Invitrogen) immobilisiert waren, aus den Zellen isoliert (Abb. 21A). Es wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen HA-CDKL1<sup>WT</sup> Proteins (Abb. 21A, schwarz) und der HA-Kontrolle (Leervektor) (Abb. 21A, weiß) errechnet ( $p=0,0006$ ): Für das CDKL1<sup>WT</sup> Protein wurde eine erhöhte Lumineszenz-Intensität gemessen, was auf eine CDKL1 Kinase Aktivität schließen lässt. Das HA-Ime2 Protein (Abb. 21A, grün) wies ebenfalls eine höhere Lumineszenz-Intensität im Vergleich zur HA-Kontrolle ( $p=0,0049$ ) auf. Für die beiden mutanten Proteine HA-CDKL1 C144R ( $p=0,0056$ ) und HA-CDKL1 S207L ( $p=0,0012$ ) wurde eine geringere Lumineszenz-Intensität im Vergleich zum HA-CDKL1<sup>WT</sup> Protein gemessen (Abb. 21A, rot).

In einer weiteren Experimenten-Reihe aus 4 unabhängigen Experimenten wurden EGFP-konjugierte CDKL1-Proteine nach transients Überexpression in HEK293T Zellen für die Analyse der Kinaseaktivität verwendet (Abb. 21B). Im Vorfeld dieser Analyse wurde die Expression von EGFP-CDKL1 Fusionsproteinen in HeLa Zellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Appendix, Abb. 29). In der in Abb. 21B dargestellten Analyse wurden zudem eine putative Kinase-inaktivierende Mutante (CDKL1<sup>K34R</sup>; grau) sowie die Mutante CDKL1<sup>T136M</sup> (rot) hinsichtlich ihrer Kinase-Aktivität untersucht. Die Kinase-inaktivierende Mutante CDKL1<sup>K34R</sup> basiert auf den Mutationsanalysen von Canning *et al.*<sup>264</sup> Die Mutante CDKL1<sup>T136M</sup> (CDKL1 c.407C>T) wurde bei einer Patientin mit sporadischer TAAD identifiziert (siehe Kapitel 2.4 des Ergebnisteils). Es wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kinase-Aktivität des EGFP-CDKL1<sup>WT</sup> Fusionsproteins (schwarz) und des EGFP-Kontrollproteins (weiß) beobachtet ( $p=0,0342$ ). Außerdem wurde eine signifikante Reduktion der Kinase-Aktivität bei den Mutanten EGFP-CDKL1<sup>K34R</sup> ( $p=0,0053$ ), EGFP-CDKL1<sup>T136M</sup> ( $p=0,0015$ ) und EGFP-CDKL1<sup>C144R</sup> ( $p=0,0020$ ) im Vergleich zum EGFP-CDKL1<sup>WT</sup> Protein festgestellt. Zwischen der Mutante EGFP-CDKL1<sup>S207L</sup> und dem EGFP-CDKL1<sup>WT</sup> Protein wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede der Kinase-Aktivität beobachtet ( $p=0,4653$ ). Das EGFP-Ime2 Fusionsprotein (Abb. 21B, grün) wies keine statistisch signifikant veränderte Kinase-Aktivität im Vergleich zur EGFP-Kontrolle auf [ $p=0,8972$ ]; Abb. 21B].

Zusammengefasst zeigte sich für die Proteinmutante CDKL1<sup>C144R</sup> konsistent eine reduzierte Kinaseaktivität in HEK293T und HeLa Zellen, während die Mutante CDKL1<sup>S207L</sup> nur in einer Versuchsreihe (in HeLa Zellen) eine reduzierte Kinaseaktivität aufwies (Abb. 21A und 21B). Die Kinaseaktivität von CDKL1<sup>K34R</sup> und CDKL1<sup>T136M</sup> war ebenfalls – gemessen in HEK293T Zellen -beeinträchtigt (Abb. 21B).

A



B

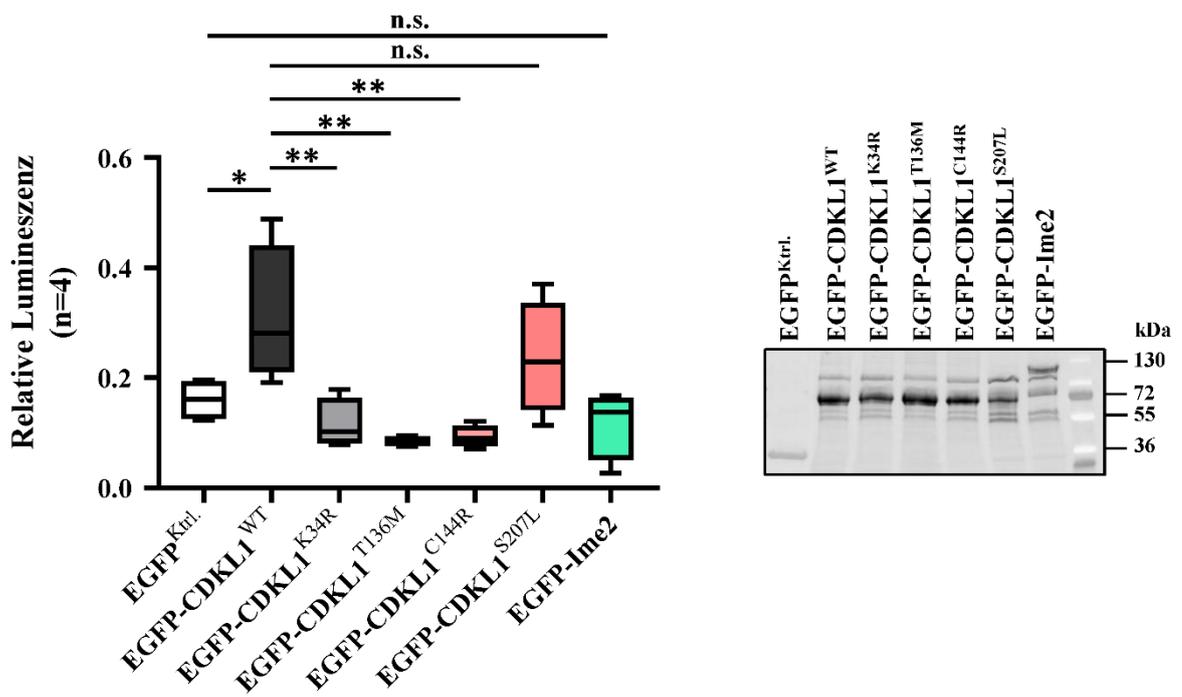


Abb. 21: Analyse der Kinase-Aktivität von CDKL1 mit dem *in vitro* ADP-Glo™ Kinase System. (Siehe Legende auf der nächsten Seite.)

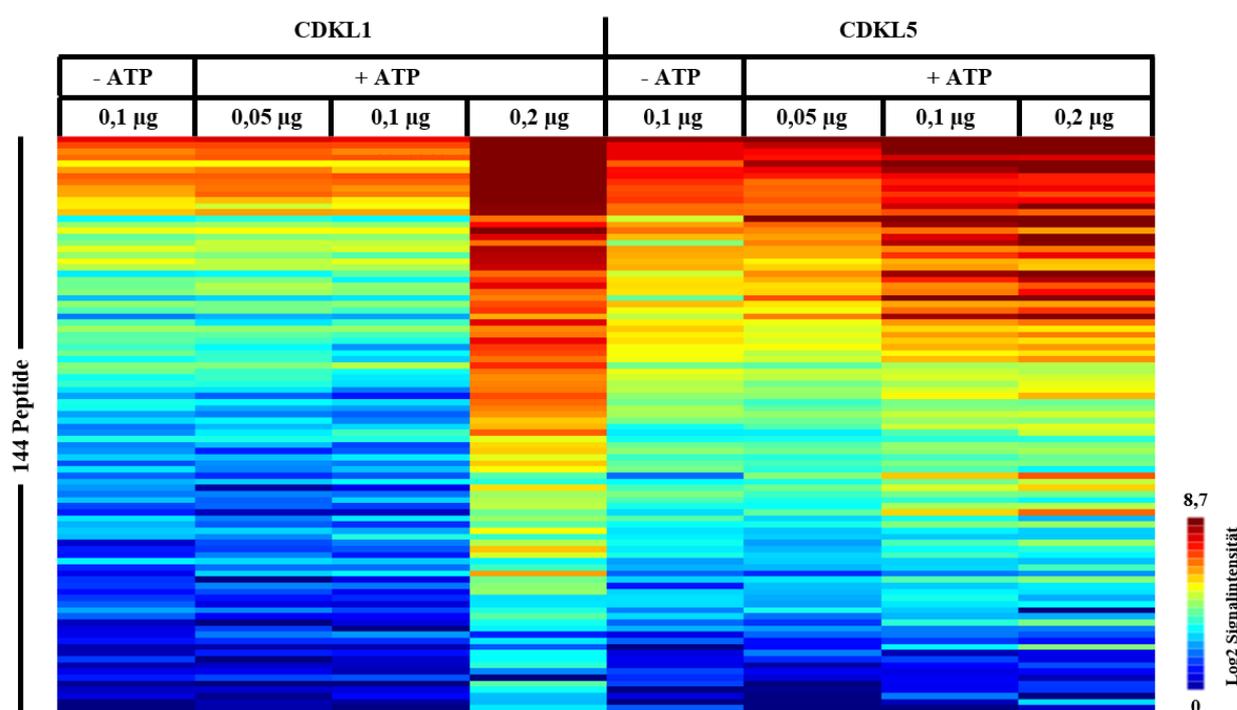
**Legende zur Abb. 21.** Die Kinase-Aktivität gegenüber dem artifiziellen Peptid-Substrat RPRSPGARR wurde mithilfe des ADP-Glo™ Kinase Assays (Promega) untersucht. In diesem Analysesystem korreliert die Intensität aus einer Lumineszenzreaktion mit der Aktivität von CDKL1. HeLa bzw. HEK293T Zellen wurden transient mit CDKL1 bzw. Ime-Konstrukten transfiziert und die Fusionsproteine (HA- bzw. EGFP-Kontrolle, weiß; HA- bzw. EGFP-CDKL1<sup>WT</sup>, schwarz; HA- bzw. EGFP-CDKL1<sup>K34R</sup>, grau; HA- bzw. EGFP-CDKL1<sup>C144R</sup>, HA- bzw. EGFP-CDKL1<sup>T136M</sup>, HA- bzw. EGFP-CDKL1<sup>S207L</sup>, rot; HA- bzw. EGFP-Ime2, grün) wurden mittels Immunpräzipitation aus den Lysaten isoliert. Im Anschluss wurde die Kinasereaktion durch Zugabe von ATP und des Peptid-Substrates gestartet. **A:** Analyse der Kinase-Aktivität von HA-konjugierten CDKL1 Proteinvarianten in HeLa Zellen. Die Lumineszenz-Intensitäten einzelner Messpunkte wurden auf das gesamte Lumineszenz-Signal eines Experimentes normalisiert (n=7). In den Boxen sind 25% (untere Linie der Box) bis 75% (obere Linie der Box) der Messpunkte dargestellt. Der Median ist durch 50% (Linie in der Box) der Messpunkte gegeben. Die 5. und 95. Perzentile entspricht den Whisker-Grenzen. Es ist eine exemplarische Western Blotting Analyse unter Verwendung eines anti-HA Antikörpers gezeigt, um die erfolgreiche Isolierung von HA-CDKL1 und HA-Ime2 aus HeLa Zellen darzustellen. **B:** Analyse der Kinase-Aktivität von EGFP-konjugierten CDKL1 Proteinvarianten in HEK293T Zellen. Die Lumineszenz-Intensitäten einzelner Messpunkte wurden auf das gesamte Lumineszenz-Signal eines Experimentes und auf die Menge von immunpräzipitiertem Protein normalisiert (n=4). In den Boxen sind 25% (untere Linie der Box) bis 75% (obere Linie der Box) der Messpunkte dargestellt. Der Median ist durch 50% (Linie in der Box) der Messpunkte gegeben. Die 5. und 95. Perzentile entspricht den Whisker-Grenzen. Es ist eine exemplarische Western Blotting Analyse unter Verwendung eines anti-GFP Antikörpers gezeigt, um die erfolgreiche Isolierung von EGFP-CDKL1 und EGFP-Ime2 aus HEK293T Zellen nachzuweisen. Für die statistische Auswertung wurde ein One-Way-ANOVA mit einem Dunnett Post-Hoc Mehrfachvergleichstest durchgeführt. **A, B:** Die Signifikanzen sind über dem Box-Whiskers-Plot dargestellt. n.s., nicht signifikant; \*, p≤0,05; \*\*, p≤0,01, \*\*\*, p≤0,001. Ktrl., HA- bzw. EGFP Leervektor-Kontrolle.

#### 2.6.4 Analyse des Phosphorylierungsmotifes von CDKL1

Die exakten Substratproteine von CDKL1 sind nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde mithilfe eines PamGene®4 Mikroarrays ein Kinase-Aktivitäts-Profil von CDKL1 erstellt, um Hinweise auf das spezifische Phosphorylierungsmotif und somit auf mögliche Proteinsubstrate von CDKL1 zu erhalten. Die technische Durchführung erfolgte durch Dr. Malte Kriegs und Konstantin Hoffer im Labor für Strahlenbiologie & experimentelle Radioonkologie (UKE).

Es wurde aus Sf9 Insektenzellen aufgereinigtes, rekombinantes CDKL1 und CDKL5 untersucht und die Signalintensitäten phosphorylierter Peptide wurden miteinander verglichen. Zuvor wurden in einem PamGene®4-Experiment unterschiedliche Konzentrationen der beiden zu untersuchenden Proteine austitriert (Abb. 22). Es wurden jeweils 0,05 µg, 0,1 µg und 0,2 µg rekombinantes Protein in Kinasereaktionen mit bzw. ohne Zugabe von ATP getestet und die Signalintensitäten phosphorylierter Peptide bestimmt. Die Peptidsequenzen repräsentieren bekannte Phosphorylierungsmotife von Serin-/Threonin-Kinasen. Die *heat map* in Abb. 22 zeigt, welche der 144 Peptide des Mikroarrays von CDKL1 oder CDKL5 phosphoryliert wurden. Für

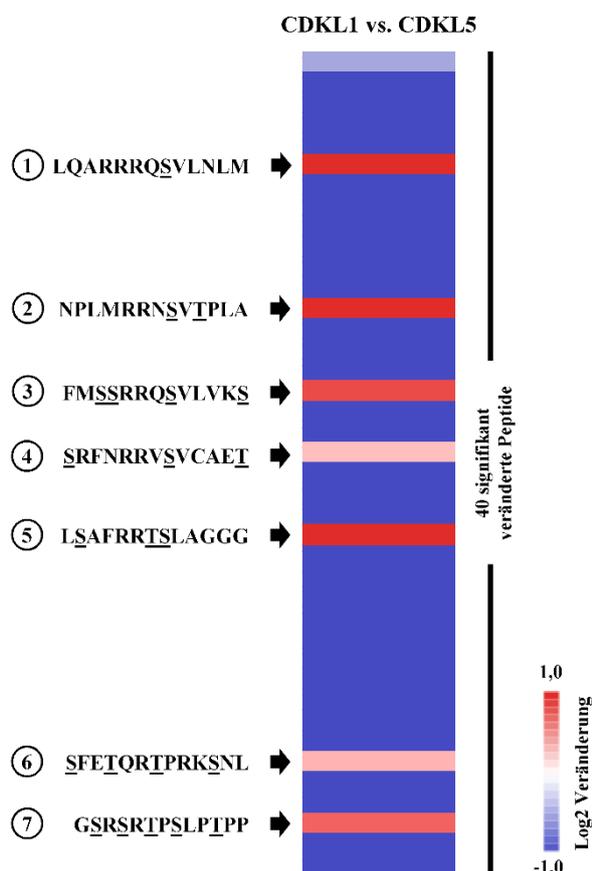
jedes Peptid ist eine Signalintensität gezeigt. In der Analyse von rekombinantem CDKL5 wurde für einige Peptide ein gradueller Anstieg der Signalintensitäten mit der CDKL5-Konzentration beobachtet (Abb. 22, rote Felder). Der Reaktionsansatz ohne Zugabe von ATP (0,5  $\mu\text{g}$  CDKL5) führte ebenfalls zur Phosphorylierung einiger Peptide, jedoch mit geringerer Signalintensität im Vergleich zu dem äquivalenten Reaktionsansatz (0,1  $\mu\text{g}$  CDKL5) mit ATP (Abb. 22, rote Felder). In der Analyse von rekombinantem CDKL1 wurde ebenfalls ein Anstieg der Signalintensität phosphorylierter Peptide mit ansteigender CDKL1-Konzentration beobachtet. Der Reaktionsansatz mit 0,2  $\mu\text{g}$  CDKL1 führte zu deutlich erhöhten Signalintensitäten im Vergleich zu 0,1  $\mu\text{g}$  CDKL1 (Abb. 22, dunkelrote Felder).



**Abb. 22: Analyse unterschiedlicher Konzentrationen von rekombinantem CDKL1 und CDKL5 in einem PamGene<sup>®</sup>4-Experiment.** Es ist eine *heat map* gezeigt, welche die Log<sub>2</sub>-transformierten Phosphorylierungsintensitäten von 144 untersuchten Peptiden aus der Analyse von rekombinantem CDKL1 und CDKL5 Protein widerspiegelt. Stärker und schwächer phosphorylierte Peptide sind respektive in rot und blau dargestellt. Es wurden Reaktionsansätze mit 0,05  $\mu\text{g}$ , 0,1  $\mu\text{g}$  und 0,2  $\mu\text{g}$  CDKL1 bzw. CDKL5 mit/ohne ATP in einer Einfachbestimmung getestet.

Für das anschließende PamGene<sup>®</sup>4-Experiment zur Analyse des Phosphorylierungsmotifes von CDKL1 und CDKL5 wurden jeweils 0,2  $\mu\text{g}$  rekombinantes Protein in einem Kinaseaktionsmix mit bzw. ohne ATP eingesetzt. Die Signalintensitäten phosphorylierter Peptide wurden in einem dreifachen Ansatz bestimmt und signifikant unterschiedlich phosphorylierte Motife von CDKL1 im Vergleich zu CDKL5 ermittelt. In diesem Experiment wurden insgesamt 40 Peptide mit signifikant veränderter Phosphorylierungsintensität zwischen CDKL1 und CDKL5 beobachtet,

wobei 7 Peptide durch CDKL1 stärker als durch CDKL5 phosphoryliert wurden (Abb. 23; Peptide 1-7, rot). Diese Beobachtung deutete auf 7 CDKL1-spezifische Phosphorylierungsmotive. Die Peptidsequenzen aus jeweils 13 Aminosäuren beinhalten mindestens ein Serin und/oder Threonin (Abb. 23; Peptide 1-7, unterstrichen). Die 7 verstärkt phosphorylierten Peptide entsprechen Proteinmotiven des cAMP-abhängigen Clorid-Kanals CFTR (Abb. 23, Peptid 1; Uniprot P13569), der 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-biphosphatase 3 PFKFB3 (Abb. 23, Peptid 2; Uniprot Q16875), des ionotropen Glutamatrezeptors GRIK2 (Abb. 23, Peptid 3; Uniprot Q13002), der cAMP-abhängigen Proteinkinase PRKAR2A (Abb. 23, Peptid 4; Uniprot P13861), des Myosin-Bindeproteins MYBPC3 (Abb. 23, Peptid 5; Uniprot Q14896), des Retinoblastom-assoziierten Proteins RB1 (Abb. 23, Peptid 6; Uniprot P06400) sowie des Mikrotubuli-assoziierten Proteins TAU MAPT (Abb. 23, Peptid 7; Uniprot P10636).

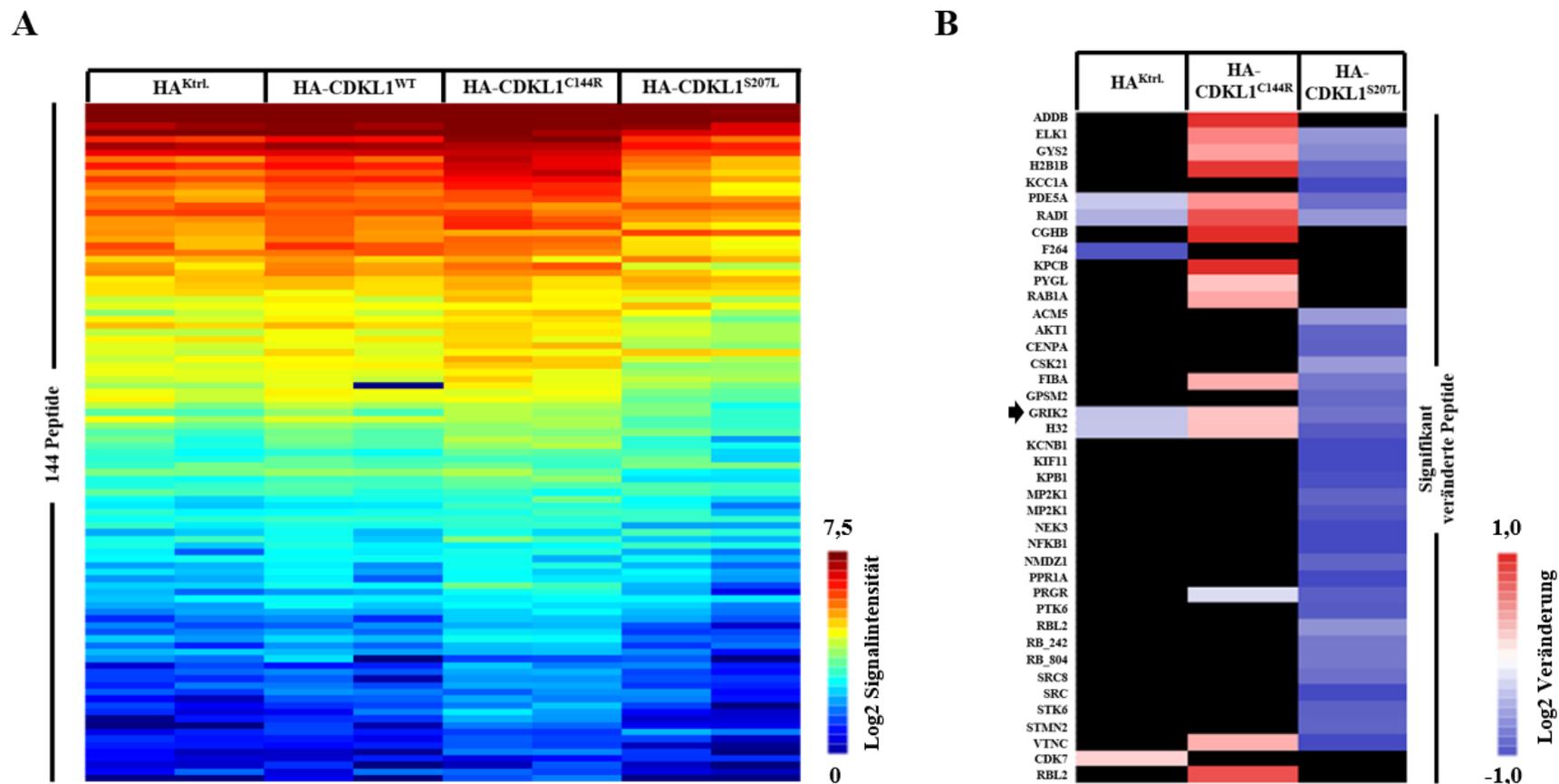


**Abb. 23: Peptide mit einer signifikant veränderten Phosphorylierung durch rekombinantes CDKL1 in einem PamGene<sup>®</sup>4-Experiment.** Die Abbildung zeigt 40 Peptide, die eine stärkere (rot) bzw. schwächere (blau) Log<sub>2</sub>-transformierte Signalintensität in dem Reaktionsmix mit rekombinatem CDKL1 im Vergleich zu dem Ansatz mit CDKL5 aufweisen. Die Sequenzen der 7 Peptide mit einer höheren Phosphorylierungsintensität sind mit einem Pfeil markiert; Serine sowie Threonine sind unterstrichen. Die Phosphorylierungsmotive entsprechen Sequenzen in CFTR (1), PFKFB3 (2), GRIK2 (3), PRKAR2A (4), MYBPC3 (5), RB1 (6) und MAPT (7).

Im Anschluss an die Analyse der Phosphorylierungsmotives von rekombinatem CDKL1 und CDKL5 wurde ein PamGene<sup>®</sup>4-Experiment mit in HeLa-Zelllysaten transient exprimiertem HA-CDKL1<sup>WT</sup>, HA-CDKL1<sup>C144R</sup> und HA-CDKL1<sup>S207L</sup> durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Zelllysate aus Zellen transient transfiziert mit HA-Leervektor (HA<sup>Ktrl.</sup>) verwendet. Die *heat map* in

Abb. 24A zeigt die Signalintensitäten aller 144 Peptide des Mikroarrays aus einer Doppelbestimmung. Statistisch signifikant veränderte Peptide im Vergleich zum Reaktionsansatz mit HA-CDKL1<sup>WT</sup> Protein sind in Abb. 24B dargestellt. Es wurde beobachtet, dass in dem Kontroll-Reaktionsansatz (Zellen transient transfiziert mit HA-Leervektor) 5 Peptide schwächer und 1 Peptid stärker im Vergleich zu dem Reaktionsansatz mit HA-CDKL1<sup>WT</sup> Protein phosphoryliert wurde. Der Reaktionsansatz mit transient exprimiertem HA-CDKL1<sup>C144R</sup> führte zu einer stärkeren Phosphorylierung von 15 Peptiden im Vergleich zum Reaktionsansatz mit HA-CDKL1<sup>WT</sup> Protein. Hingegen wurden in der Analyse des HA-CDKL1<sup>S207L</sup> Proteins 33 Peptide detektiert, die eine geringere Signalintensität im Vergleich zum Reaktionsmix mit HA-CDKL1<sup>WT</sup> Protein aufwiesen. Bezüglich der Peptide, welche im vorigen PamGene<sup>®</sup>4-Experiment mit rekombinantem CDKL1 und CDKL5 eine signifikant veränderte Phosphorylierungsintensität aufwiesen, wurde in diesem Experiment für das Peptid 3 (Abb. 23 und Abb. 24; Sequenz: FMSSRRQSVLVKS; Protein: GRIK2), eine signifikante Veränderung der Phosphorylierung beobachtet: Im Vergleich zu HA-CDKL1<sup>WT</sup> Protein war das Substratpeptid im Reaktionsansatz mit HA-CDKL1<sup>C144R</sup> stärker und im Ansatz mit HA-CDKL1<sup>S207L</sup> schwächer phosphoryliert.

Zusammengefasst deuten die mittels PamGene<sup>®</sup>4-Assay generierten Daten auf eine durch die CDKL1 Varianten p.(Cys144Arg) und p.(Ser207Leu) veränderte Substratphosphorylierung hin, sei es aufgrund einer veränderten Kinaseaktivität oder einer beeinträchtigten Substratbindung. Die Spezifität des PamGene<sup>®</sup>4 Assays scheint allerdings optimierbar zu sein.



**Abb. 24: PamGene<sup>®</sup>4-Experiment mit in HeLa-Zelllysaten transient exprimierten CDKL1 Proteinvarianten.** **A:** Heat map von Log<sub>2</sub>-transformierten Phosphorylierungsintensitäten an 144 untersuchten Peptiden. HA-CDKL1<sup>WT</sup>, HA-CDKL1<sup>C144R</sup> und HA-CDKL1<sup>S207L</sup> wurden in HeLa Zellen transient exprimiert und Zelllysate wurden jeweils in einer Doppelbestimmung eingesetzt; Mit dem HA-Leervektor (HA<sup>Ktrl.</sup>) transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Stärker und schwächer phosphorylierte Peptide sind respektive in rot und blau dargestellt. **B:** Es sind alle Peptide mit einer signifikant veränderten Phosphorylierungsintensität (stärker: rot; schwächer: blau) im Vergleich zu dem Reaktionansatz mit HA-CDKL1<sup>WT</sup> Protein (nicht gezeigt) dargestellt. Schwarze Bereiche in der Abbildung weisen darauf hin, dass ein Peptid im Vergleich zum Experiment mit HA-CDKL1<sup>WT</sup> Protein nicht signifikant verändert phosphoryliert wurde. Das Peptid aus dem Protein GRIK2, welches in dem PamGene<sup>®</sup>4-Experiment mit rekombinantem CDKL1 eine signifikant verstärkte Phosphorylierung aufwies, ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. Ktrl., HA-Leervektor Kontrolle.

### 2.6.5 Immunhistologische Untersuchung der Aorta

Die Aortenwand setzt sich aus drei Gewebsschichten zusammen. Die äußerste Schicht ist die *Tunica adventitia* (Abb. 25A), welche Fibroblasten, Zellen des Immunsystems, Adipozyten, dendritische Zellen sowie kleinste Arterien und Venen, die *Vasa vasorum*, enthält. In der mittleren Schicht der Aortenwand, der *Tunica media*, befinden sich glatte Muskelzellen. Zu der inneren Schicht, der *Intima*, gehören Endothelzellen und eine innere elastische Lamina (Abb. 25A).

Es wurde untersucht, ob CDKL1 in Zellen der Aortenwand exprimiert ist. Hierzu wurde Aortengewebe einer Patientin mit einem Aneurysma der *Aorta ascendens* und mittelgradiger Aortenklappeninsuffizienz immunhistologisch analysiert. Die Färbungen wurden von Dr. Susanne Krasemann und Kristin Hartmann in der Mauspathologie Facility des UKEs durchgeführt. Neben der immunhistologischen Darstellung, von CDKL1, wurden als Markerproteine für glatte Muskelzellen *actin-smooth-muscle* (ASM) bzw. Calponin gefärbt (Abb. 25B und 25C; Abb. 30 im Appendix). In der Abb. 25 sind repräsentative Bilder aus Doppelfärbungen des Aortengewebes von CDKL1 mit ASM (Abb. 25B; CDKL1: rot; ASM: braun) bzw. Calponin (Abb. 25C; CDKL1: braun; Calponin: rot) gezeigt. CDKL1 ist in Zellinseln der *Tunica adventitia* exprimiert ist. (Abb. 25B1 und 25C1) Eine Kolokalisation von CDKL1 mit ASM bzw. Calponin, die auf die Expression von CDKL1 in glatten Muskelzellen in der *Tunica media* hindeuten könnte, wurde nicht beobachtet. Zudem wurde keine Expression von CDKL1 in der *Intima* detektiert (Abb. 25B3 und 25C3).

Ausgehend von Progenitorzellen in der *Tunica adventitia* erfolgt die Differenzierung zu verschiedenen aortenrelevanten Zelltypen (Abb. 25A, grüne Zellen); diese Progenitorzellen sind essenziell bei der Reparatur von kardiovaskulärem Gewebe.<sup>278-280</sup> Zudem sind Progenitorzellen in TAAD-Gewebe häufiger als in Kontrollgewebe, was als Hinweise auf eine Involvierung bei der reparativen bzw. destruktiven Remodellierung des TAAD Gewebes gedeutet wurde.<sup>281</sup> In dieser Arbeit wurde untersucht, ob CDKL1 in Progenitorzellen exprimiert ist; als Markerproteine für Progenitorzellen wurden CD34 bzw. STRO-1 gewählt. Die immunhistologischen Doppelfärbungen in Abb. 25 zeigen CDKL1 und CD34 (Abb. 25D; CDKL1: rot; CD34: braun) bzw. STRO-1 (Abb. 25E; CDKL1: rot; STRO-1: braun): Sowohl CDKL1 und CD34 als auch CDKL1 und STRO-1 lokalisieren jeweils in derselben Zellpopulation (Abb. 25D1,2 und 25E1).

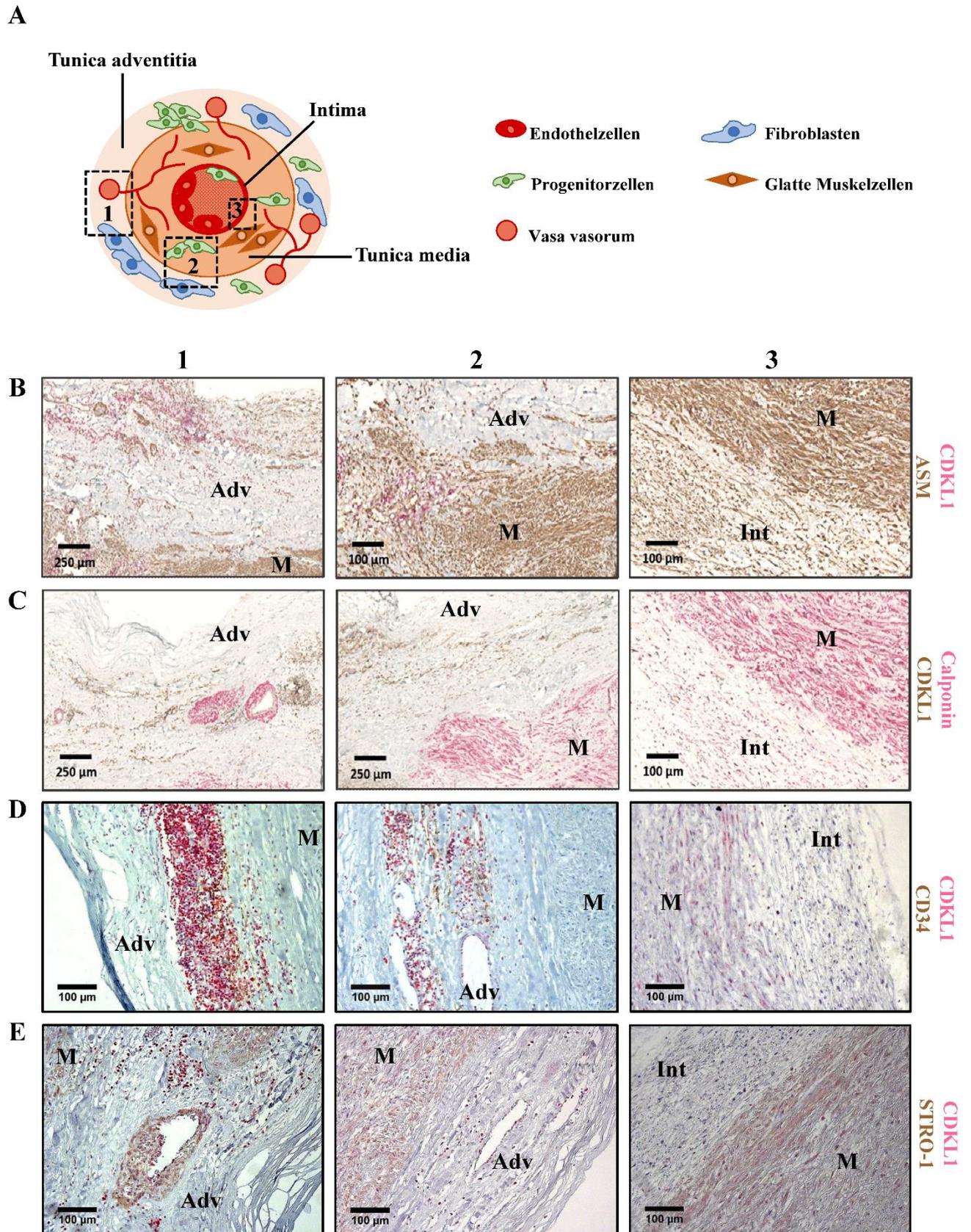


Abb. 25: Immunhistologische Analyse der Expression von CDKL1 in Aortenwandgewebe. (Siehe Legende auf der nächsten Seite.)

**Legende zur Abb. 25. A:** Aufbau der Aortenwand aus *Tunica adventitia*, *Tunica media* und *Intima*. In der *Tunica adventitia* sind neben Fibroblasten (blaue Zellen) Immunzellen, Adipozyten und dendritische Zellen lokalisiert (nicht gezeigt). Kleinste Venen und Arterien, die *Vasa vasorum*, versorgen die *Tunica Adventitia* und die *Tunica media* mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die *Tunica media* besteht aus einer kompakten Schicht aus glatten Muskelzellen (braune Zellen), die der Aortenwand Stabilität und Kontraktilität verleihen. Die *Intima* ist die innerste Schicht der Aortenwand mit einer Schicht aus Endothelzellen (rote Zellen), die die Aortenwand zum Lumen der Aorta abgrenzt. **B:** Repräsentative Bilder der immunhistologischen Doppelfärbung von CDKL1 und *actin-smooth-muscle* (ASM). Es wurden CDKL1- bzw. ASM-spezifische Primärantikörper sowie ein AP(Alkalische Phosphatase, rote Färbung)- und ein HRP(*Horseradish* Peroxidase, braune Färbung)-konjugierter Sekundärantikörper zur Detektion von CDKL1 und ASM verwendet. **C:** Repräsentative Bilder der immunhistologischen Doppelfärbung von CDKL1 und Calponin. Es wurden CDKL1- bzw. Calponin-spezifische Primärantikörper sowie ein HRP (braune Färbung)- und ein AP (rote Färbung)-konjugierter Sekundärantikörper zur Detektion von CDKL1 und Calponin verwendet. **D:** Repräsentative Bilder der immunhistologischen Doppelfärbung von CDKL1 und CD34. Es wurden CDKL1- bzw. CD34-spezifische Primärantikörper sowie ein AP (rote Färbung)- und ein HRP (braune Färbung)-konjugierter Sekundärantikörper zur Detektion von CDKL1 und CD34 verwendet. **E:** Repräsentative Bilder der immunhistologischen Doppelfärbung von CDKL1 und CD34. Es wurden CDKL1- bzw. STRO-1-spezifische Primärantikörper sowie ein AP (rote Färbung)- und ein HRP (braune Färbung)-konjugierter Sekundärantikörper zur Detektion von CDKL1 und STRO-1 verwendet. **B-E:** Zur Identifizierung der Zellkerne wurde das Gewebe mit Hämatoxylin (blaue Färbung) kogefärbt (D, E). Es wurden die drei Bereiche *Tunica Adventitia* (Adv), *Tunica Adventitia* und *Tunica media* (2) und *Tunica media* und *Intima* (3) untersucht. Die visuelle Analyse wurde mithilfe eines *Slidescanner Nano Zoomer 2.OHT* (Hamamatsu) und mithilfe der Software *NanoZoomer Digital Pathology* (Hamamatsu) durchgeführt (B, C). Bildaufnahmen zur Darstellung der Expression von CDKL1, CD34 und STRO-1 wurden am Apotome.2 (Zeiss) gemacht (D, E). Adv, *Tunica adventitia*; M, *Tunica media*; Int, *Intima*.

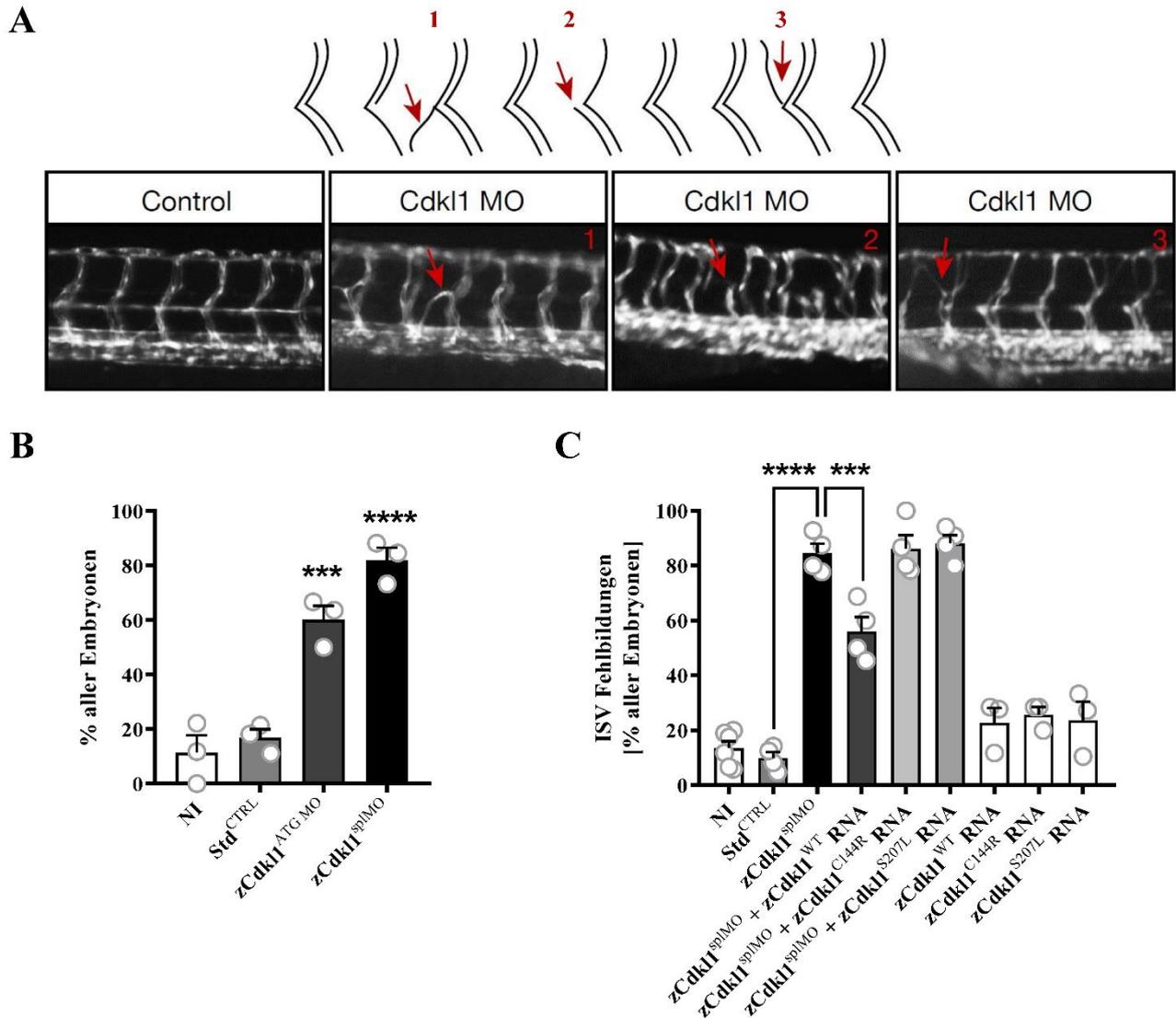
### 2.6.6 Knockdown und Mutationsanalysen von *zcdkl1* in Zebrafärbliingen

Im Rahmen einer Kooperation bei diesem Forschungsprojekt wurden von Frau PD Dr. Melanie Philipp aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Ulm Mutationsanalysen zur Funktion von CDKL1 im vaskulären System im Modellorganismus *D. rerio* durchgeführt. Hierzu gehörte der Morpholino-vermittelte Knockdown von *zcdkl1* sowie anschließende *Rescue*-Experimente nach Injektion von RNA kodierend für *zCdk11<sup>WT</sup>* bzw. *zCdk11<sup>C144R</sup>* und *zCdk11<sup>S207L</sup>* Protein in Zebrafärbliingen. Es wurden die Auswirkungen eines Knockdowns auf das intersomatische Gefäßsystem (ISV) untersucht. Die experimentelle Durchführung war nicht Teil dieser Dissertation.

Der Knockdown von *zcdkl1* in Zebrafärbliingen durch Injektion verschiedener Morpholinos führte zu Fehlbildungen von intersomatischen Gefäßen (ISV). Dies sind Blutgefäße, welche die dorsale Aorta bzw. die hintere Kardinalvene mit den dorsal gelegenen longitudinalen anastomotischen Gefäßen verbinden.<sup>188</sup> Die Fehlbildungen äußerten sich in „zu kurzen“ Gefäßen und einer beeinträchtigten Aufrechterhaltung der Gefäße (Abb. 26A). Es war eine signifikante Zunahme von Embryonen mit IVS Fehlbildungen durch den Knockdown von *zcdkl1* mit einem ATG MO ( $p=0,0008$ ) oder einem splMO ( $p<0,0001$ ) zu beobachten (Abb. 26B).

In *Rescue*-Experimenten wurde im Anschluss an den Knockdown von *zcdkl1* eine RNA kodierend für *zCdk11<sup>WT</sup>*, *zCdk11<sup>C144R</sup>* bzw. *zCdk11<sup>S207L</sup>* Protein injiziert (Abb. 25C). Injektion der *zCdk11<sup>WT</sup>* RNA führte zu einem Rückgang der Zebrafärbliing-Embryonen mit ISV Fehlbildungen (Abb. 25 C;  $p=0,0002$ ). Nach Injektion von *zCdk11<sup>C144R</sup>* und *zCdk11<sup>S207L</sup>* RNA wurde keine Reduktion von Embryonen mit IVS Fehlbildungen festgestellt (Abb. 26C).

Außerdem wurde die Expression von *zCdk11* in Zebrafärbliingen untersucht (Appendix, Abb. 31). *zCdk11* ist in der Chorda dorsalis (Notochord), dem Neuralrohr, der Niere, der Nase und in Kupferschen Vesikeln beobachtet. Eine Expression in intersomatischen Gefäßen wurde nicht festgestellt (Appendix, Abb. 31).



**Abb. 26: ISV Fehlbildungen in Zebrafärblingen nach *zcdkl1*-Knockdown.** **A:** Mikroskopische Darstellung des intersomatischen Gefäßsystems von exemplarischen Zebrafärblingen-Embryonen, in die ein Morpholino (MO) für den Knockdown von *zcdkl1* injiziert wurde. Morphologische Veränderungen der ISV sind durch Pfeile gekennzeichnet und in der Skizze über den mikroskopischen Aufnahmen schematisch dargestellt. **B:** Statistische Auswertung der ISV-Fehlbildungen in Zebrafärbling-Embryonen nach Morpholino-vermitteltem *zcdkl1*-Knockdown. Der prozentuale Anteil von ISV Fehlbildungen in Zebrafärblingen nach Injektion eines Cdk11 ATG MO bzw. Cdk11 splMO wurde mit Zebrafärblingen verglichen, die nicht behandelt (NI) oder in die ein Standard Kontrollmorpholino (Std CTRL) injiziert wurde. **C:** Rescue-Experimente nach *zcdkl1*-Knockdown. Im Anschluss an *zcdkl1*-Knockdown wurde RNA kodierend für *zCdk11*<sup>WT</sup>, *zCdk11*<sup>C144R</sup> bzw. *zCdk11*<sup>S207L</sup> Protein in Zebrafärblinge injiziert und der prozentuale Anteil von ISV Fehlbildungen bestimmt. **A-C:** Alle Rohdaten wurden statistisch mit einem One-Way-ANOVA und einem Sidak Multivergleichstest ausgewertet. MO, Morpholino; NI, ungeteilt (*not injected*); ATG MO; Morpholino bindet an das Startcodon von *zCdk11*; splMO, Morpholino beeinträchtigt Spleißen der *zcdkl1*-prä-mRNA; ISV, intersomatische Gefäße (*intersomitic vessels*).

## VII. Diskussion

### 1. NGS-basierte Analyse von 32 Genen in 199 Patienten mit einer hereditären Aortopathie oder assoziierten Erkrankungen des Bindegewebes

#### 1.1 Diagnostische Ausbeute

Das Wissen um die genetischen Ursachen von erblichen Aortopathien und Bindegewebserkrankungen nimmt stetig zu. Dennoch kann bei vielen Patienten keine pathogene Mutation in einem der bislang bekannten Krankheitsgene identifiziert werden. In der hier untersuchten Studienkohorte wurde bei insgesamt 17,1% der Patienten eine als P oder LP klassifizierte Variante detektiert. In der Gruppe von Patienten mit einer syndromalen Form von HCTD mit vaskulärer Beteiligung (MFS, EDS, LDS und CCA) wurde bei 26,9% (18/67) der Probanden eine PV oder LPV identifiziert. Die diagnostische Ausbeute hinsichtlich einer PV/LPV in der Subkohorte von TAAD Patienten betrug 16,9% (12 von 71 Patienten). Es wurde schon über einige Studien berichtet, bei denen NGS in der molekularen Diagnostik von TAAD angewendet wurde.<sup>282-289</sup> Nur PV und LPV berücksichtigend wurden in anderen Studien diagnostische Ausbeuten von 3,9% (21 Gene in 102 Patienten analysiert)<sup>289</sup>, 4,9% (15 Gene in 1025 Patienten analysiert)<sup>287</sup>, 8,1% (21 Gene in 810 Patienten analysiert)<sup>284</sup>, 10,3% (10 Gene in 175 Patienten analysiert)<sup>288</sup>, 13% (7 Gene in 264 Patienten analysiert)<sup>282</sup>, 18,6% (11 Gene in 70 Patienten analysiert)<sup>283</sup>, 27% (14 Gene in 55 Patienten analysiert)<sup>286</sup> und 35,3% (10 Gene in 51 Patienten analysiert)<sup>285</sup> erzielt. Die Kriterien für den Einschluss von Patienten in die hier beschriebene Studie waren relativ permeabel und resultierten so in einer klinisch vergleichsweise heterogenen Studienkohorte; dahingehend ist die in dieser Arbeit erzielte gesamte diagnostische Ausbeute von 17,1% angemessen. Die Unterschiede in den diagnostischen Ausbeuten zwischen den veröffentlichten Studien sind u.a. auf unterschiedliche Einschlusskriterien für Studienprobanden zurückzuführen.<sup>285,286</sup> In der Tat wurden relativ hohe diagnostische Ausbeuten erzielt, wenn bevorzugt Patienten mit positiver Familienanamnese, früh manifestierender Aortenerkrankung oder mit einer syndromalen Form von TAAD in die Untersuchungskohorte aufgenommen wurden.<sup>285-287</sup> In der hier durchgeführten Studie war jedoch die diagnostische Ausbeute bei Patienten mit positiver Familienanamnese nicht erhöht. In drei vorhergehenden Studien wurden zwar hauptsächlich Patienten mit eindeutigem TAAD-Phänotyp untersucht, allerdings waren die diagnostischen Ausbeuten in diesen Studien nicht konsistent hoch.<sup>283,287,289</sup> Die diagnostische Ausbeute wird auch durch unterschiedliche Kriterien zur Variantenbewertung beeinflusst: In dieser Arbeit wurde die Prävalenz der mit einem Gen-assoziierten Erkrankung als maximale MAF

für zu berücksichtigende Varianten definiert. In anderen Studien wurden hingegen mildere bzw. willkürlich gewählte maximale MAFs zwischen 0,1% und 0,5% als Cut-Offs definiert.<sup>285-287,289</sup> Außerdem wurden die Varianten in dieser, wie auch in einigen vorherigen Studien,<sup>283,287,288</sup> nach ACMG/AMP-Richtlinien klassifiziert.<sup>179,290</sup> Im Gegensatz dazu führte eine weniger strikte Variantenklassifizierung in anderen Studien zu einer höheren Anzahl von P/LP-Varianten und damit zu einer höheren diagnostischen Ausbeute.<sup>285,286</sup> Schließlich können die Pathogenitätsvorhersagen aus unterschiedlichen *in silico* Programmen stark voneinander abweichen.<sup>291</sup> Die Wahl der Pathogenitäts-Programme kann daher ebenfalls Einfluss auf die diagnostische Ausbeute nehmen. In dieser Studie wurden REVEL, M-CAP und ClinPred verwendet. Jedes dieser Werkzeuge integriert Bewertungen aus mehreren individuellen Bewertungsmethoden (u. a. SIFT, PolyPhen, etc.). Generell übertreffen solche kombinatorischen Methoden die individuellen Vorhersageprogramme.<sup>195-197,291</sup> Im Gegensatz zu der hier beschriebenen Studie wurden in anderen Studien überwiegend Kombinationen aus individuellen Bewertungswerkzeugen angewendet.<sup>283,285-289</sup> Zusammengefasst sollten Einschlusskriterien in die Studienkohorte, Variantenklassifizierung und Pathogenitätsbewertungen standardisiert werden, um Studien untereinander besser vergleichbar zu machen. Die relativ geringen diagnostischen Ausbeuten (<< bis <40%), welche in allen bisherigen Studien beobachtet wurden (Mittelwert 15,4%), sind ein Hinweis darauf, dass bei vielen Patienten die vorliegende Erkrankung durch bislang unbekannte Faktoren verursacht wird.<sup>283,285-289</sup> Dieses können genetische Faktoren in kodierenden oder nicht-kodierenden Bereichen sein, die sich auf mono-, oligo- oder polygene Weise auf die Pathogenese auswirken. Das zuletzt genannte Vererbungsmuster kann sich auf seltene aber auch relative häufige Varianten mit einer relativ hohen MAF (z.B. >0,5%) beziehen. Solche Varianten wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt.

Es wurde diskutiert, dass die Inklusion weiterer Gene in die NGS-basierte Analyse die diagnostische Ausbeute erhöhen kann.<sup>285,288</sup> Im Vergleich zu anderen Studien wurden in dieser Studie mindestens 11 weitere Gene analysiert.<sup>282-289</sup> Dennoch war die diagnostische Ausbeute nicht erhöht. Es wurden lediglich eine LPV und 18 VUS in bislang nicht berücksichtigten Genen identifiziert. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass unter der Annahme einer monogenen Pathogenese, pathogene Varianten in bisher unbeschriebenen oder unbekanntem Krankheitsgenen jeweils nur einen Bruchteil von HCTD/TAAD Fällen erklären.<sup>43,158,292</sup> Nicht-genetische Faktoren, z.B. Umwelteinflüsse oder einem gewissen Lebensstil geschuldete Faktoren, verursachen ebenfalls eine beträchtliche Anzahl von TAAD Fällen. Solche Faktoren limitieren demnach auch die diagnostische Ausbeute von genetischen Analysen.

## 1.2 Klinische Sensitivität und Klassifizierung von Varianten

Die Klassifizierung von Varianten bestimmt die klinische Sensitivität, d. h. die Rate der echt positiven Varianten, und ist damit ein wichtiger Schritt in der NGS-basierten Diagnostik. Die Neubewertung von bekannten Varianten ist essenziell, um Variantenklassifizierungen zu verifizieren oder zu falsifizieren. Dadurch werden immer mehr tatsächliche genetische Risikofaktoren definiert und die klinische Sensitivität verbessert. Die Reevalierung der Variantenklassen resultierte in dieser Arbeit in 22 Neubewertungen. Für diese Klassifizierungen wurden die ACMG/AMG-Richtlinien angewendet und Segregationsanalysen, Pathogenitätsvorhersagen, funktionelle Analysen, einhergehende PV/LPV, klinische Daten sowie unabhängige Bewertungen aus anderen Studien berücksichtigt. Aus ähnlichen Gründen wurden Varianten auch in vorhergehenden Studien neu bewertet.<sup>283,287,288</sup> Im Kontext einer Neubewertung sei angemerkt, dass der Einfluss von Varianten auf das prä-mRNA Spleißen experimentell oder zumindest durch Anwendung von *in silico* Vorhersageprogrammen untersucht werden sollte.<sup>179</sup> In dieser Studie war die Beurteilung der Einflüsse auf das Spleißen insbesondere hilfreich, um zwischen VUS und LBV zu unterscheiden. Zusammengenommen gibt es kein perfektes *a priori* Klassifizierungssystem für Varianten. Stichhaltige Klassifizierungen hängen vielmehr von einer kontinuierlichen *a posteriori* Reevaluierung der Variantenbewertung ab. Dies impliziert einen notwendigen Austausch von Daten innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft und das Einpflegen von reevaluierten Varianten in Datenbanken.

## 1.3 Genotyp und Phänotyp

Ähnlich zu den Resultaten in dieser Arbeit wurden bei TAAD Kohorten anderer Studien die meisten pathogenen und wahrscheinlich pathogenen Varianten in den Genen *ACTA2*, *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A2*, *FBN1*, *NOTCH1*, *MYH11*, *MYLK*, *SLC2A10*, *TGFBR1* und *TGFBR2* identifiziert.<sup>284,286,287,289</sup> Diese Tatsache reflektiert wahrscheinlich die bereits ohnehin gut dokumentierte Beteiligung der genannten Gene an der Pathogenese von Aortopathien und ähnlichen Erkrankungen des Bindegewebes.<sup>183</sup> Auf der anderen Seite sind diese Gene und ihre jeweiligen Genprodukte besser charakterisiert als die meisten anderen, die analysiert wurden. Dies mag zu der hohen Anzahl von PV/LPV in den o. e. Genen geführt haben. Varianten in den anderen Genen wurden möglicherweise unterschätzt und unterklassifiziert, da ihre Pathogenität nicht ausreichend durch wissenschaftliche Hinweise gestützt wird. Zum Beispiel wurde die *LOX* c.995A>G (p.Tyr332Cys) Variante basierend auf den ACMG-Richtlinien als VUS klassifiziert.<sup>179</sup>

Die Mutation betrifft die katalytische Domäne des LOX Proteins. Alle bisher beschriebenen pathogenen Missense-Varianten in LOX liegen ebenfalls in dieser funktionellen Domäne.<sup>114,116</sup> Charakteristisch für diese Domäne sind 10 hoch konservierte Cysteine, die an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind und dem extrazellulären Enzym seine Stabilität verleihen.<sup>293</sup> Daher ist sehr plausibel, dass der Aminosäureaustausch eines Tyrosins gegen ein zusätzliches Cystein die Struktur der katalytischen Domäne in LOX beeinträchtigt, sodass eine pathogene Konsequenz der LOX p.(Tyr332Cys) Variante wahrscheinlich ist. Auch mag die Pathogenität von *FBN2* Varianten aufgrund nur weniger vorhandener Beweise für pathogene *FBN2* Varianten unterschätzt worden sein. Es wurden 1 LPV und 6 VUS in *FBN2* bei 7 Patienten der Studienkohorte identifiziert. Proband #151 mit der primären klinischen Diagnose HCTD trägt eine *FBN2* Variante [c.1610A>G (p.Asp537Gly)], welche zunächst als VUS klassifiziert wurde (PM1+PP3+PP4). Die 13-jährige Patientin hatte eine marfanoide Gestalt, ein positives Daumenzeichen, Plattfüße, Gelenküberbeweglichkeit, eine milde Skoliose, Astigmatismus und eine Myopie (-0,75 dioptr). Es wurde die Differentialdiagnose CCA geäußert. 3 Verwandte ersten Grades wiesen ebenfalls eine marfanoide Gestalt, Aneurysmen des Aortenbulbus und der aufsteigenden Aorta, einen Mitralklappenprolaps, erhöhtes Verhältnis von Armlänge zu Körpergröße, Legg-Calvé-Perthes Erkrankung, einen verstauchten Knöchel, Hernia der Bandscheibe, einen Leistenbruch und/oder Dehnungsstreifen auf. Mittels Segregations-Analysen wurde die *FBN2* Variante [c.1610A>G (p.Asp537Gly)] bei allen betroffenen Familienangehörigen identifiziert und die Variante wurde als LP reklassifiziert [PM1+PP1<sub>moderat</sub> (äquivalent zu PM)+PP3+PP4]. Pathogene Varianten in *FBN2* verursachen CCA.<sup>294</sup> Verglichen zu MFS mit einer großen Anzahl an bekannten pathogenen Varianten, die über das ganze *FBN1* Gen verteilt sind, wird die seltene CCA von überwiegend Missense-Varianten und das Spleißen verändernde Varianten in der sogenannten neonatalen Region (Exon 23-36; Aminosäuren 955-1572) des *FBN2* Gens verursacht. Derzeit ist unklar, ob Varianten außerhalb dieser Region CCA-untypische, dem Marfan Syndrom, TAAD oder HCTD ähnliche klinische Merkmale verursachen, wenngleich auch schon seltene Varianten in *FBN2* mit schwerer juveniler idiopathischer Skoliose assoziiert wurden.<sup>294,295</sup> Die *FBN2* Variante [c.7144C>T (p.Arg2382\*)] wurde bei einer 49-jährigen Patientin mit der primären Diagnose TAAD identifiziert. Sie hatte eine Aortendissektion (Stanford, Typ A) und wiederkehrende Subluxationen der Patella. Sie wies einen marfanoiden Habitus mit erhöhtem Verhältnis von Armlänge zu Körpergröße und langen, schlanken Fingern auf. Später wurde die Differentialdiagnose CCA gestellt. Trotz des *FBN2*-spezifischen Phänotyps der Patientin, wurde die p.Arg2382\*-Variante als VUS klassifiziert [PVS1<sub>moderat</sub> (äquivalent zu PM)+PM2+PP4], denn

*loss-of-function* ist keine bekannte krankheitsrelevante Konsequenz für *FBN2* Varianten; lediglich 1 pathogene Nonsense-Variante in *FBN2* ist beschrieben.<sup>204</sup>

Bei 17 (29,8%) von 57 Patienten mit der klinischen Diagnose MFS, bestätigte die Identifizierung einer PV/LPV in *FBN1* diese Diagnose. Bei 40 (70,2%) von 57 Patienten mit der Initialdiagnose MFS wurde jedoch keine PV oder LPV in *FBN1* detektiert. Dementsprechend war bei einer anderen kürzlich veröffentlichten Studie bei 40% der Patienten mit einer PV oder LPV in *FBN1* die Verdachtsdiagnose MFS gewesen.<sup>287</sup> Diese Daten weichen stark ab von den Detektionsraten pathogener *FBN1* Varianten >90% bei Patienten mit MFS basierend auf der Ghent Nosologie.<sup>77,296</sup> In der klinischen Diagnostik wird ggf. bei klinisch unklaren Fällen mit hereditärer Aortopathie (z.B. TAAD), aber nicht offensichtlichem MFS dennoch die Verdachtsdiagnose MFS oder MFS-ähnlich gestellt. Dies trifft auch für das in dieser Arbeit beschriebene Patientenkollektiv zu und hat natürlich mindernde Auswirkungen auf die *FBN1* Detektionsrate. Daher sollte die diagnostische Aufarbeitung *a priori* genetische Tests miteinbeziehen, um bei der wachsenden Heterogenität und Pleiotropie von HCTDs mit vaskulärer Beteiligung die Vorteile einer molekulargenetischen Diagnostik zu nutzen. Darüber hinaus ist aufgrund der sehr variablen Expressivität und der klinischen Überlappungen von Bindegewebserkrankungen eine eher weitgefaste klinische Bewertung von Patienten, gefolgt von einer obligatorischen stringenten Multigen-Analyse empfehlenswert, um Fehldiagnosen zu verhindern.<sup>288</sup>

In dieser Studie wurden bei 25 Patienten mehr als eine PV, LPV oder VUS aufgedeckt. Einhergehende Varianten in unterschiedlichen Genen wurden kürzlich auch in anderen Studien für Patienten mit TAAD beschrieben und die Schwierigkeiten bei der Variantenklassifizierung und -priorisierung wurden hervorgehoben.<sup>283,297</sup> Bei 3 Patienten mit einhergehenden Varianten in unterschiedlichen Genen wurden schwere klinische Manifestationen beschrieben.<sup>283</sup> Dennoch blieb unklar, ob mehrere Varianten in verschiedenen Genen den Schweregrad einer Erkrankung mitbestimmen. In dieser Arbeit wurden 4 Patienten mit jeweils einer berichtenswerten Variante in *FBN1* und *NOTCH1* beschrieben. Bei diesen Probanden wurden jedoch keine atypischen oder schwerwiegenden klinischen Merkmale beschrieben. Diese Beobachtung suggeriert, dass die identifizierten Varianten in *NOTCH1* keine oder nur eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen, und/oder dass die *NOTCH1* Varianten überklassifiziert wurden. Letzteres mag aus der ausgeprägten Intoleranz von *NOTCH1* gegenüber Variation und *loss-of-function* resultieren (Missense Z-Score = 3,95, pLI-Score = 1,00).

## 2. Identifizierung neuer Krankheitsgene für erbliche Aortenerkrankungen

### 2.1 Sequenzvarianten in dem Kandidatengen *CDKLI*

Zur Identifizierung neuer Kandidatengene wurden ES-Analysen bei 8 Familien mit erblichen Erkrankungen des Bindegewebes durchgeführt. Bei 6 Verwandten einer Familie (Familie #1) wurde eine Sequenzveränderung in *CDKLI* [c.430T>C (p.Cys144Arg)] detektiert. Betroffene Familienmitglieder hatten ein Aneurysma bzw. eine Dissektion der *Aorta ascendens*, des Aortenbulbus, der *Aorta descendens* und/oder der Carotiden, einen Hypertelorismus, einen hohen Gaumen, Plattfüße, eine starke Myopie, eine Skoliose, ein positives Daumen-Unterarm-sowie Daumen-Handgelenkszeichen und/oder eine grenzwertige Duraektasie (Tab. 5, Familie #1). Eine mögliche Beteiligung der *CDKLI* c.430T>C p.(Cys144Arg)-Variante an der Pathogenese der Aortenerkrankung in Familie #1 wurde durch *in silico* Pathogenitätsvorhersagen, die Lage der Mutation in einer funktionellen Proteindomäne, veröffentlichte Studien an Modellorganismen, Homologien zu Proteinen des TGF- $\beta$ -Signalweges sowie Daten über verwandte Proteinkinasen bzw. zu anderen Mitgliedern der CDKL-Proteinfamilie untermauert.

**Tab. 5: Klinische Merkmale von Patienten mit einer *CDKLI*-Variante**

Stammbaum	klinische Manifestationen				
	vaskulär	skelettal	ophthal- mologisch	dural	Familien- anamnese
<b>Familie #1</b> 	+	+	+	+	+
	(II-4, II-2, III-2)	(II-4, III-1, III-2)	(II-2, III-1)	(III-3, III-4, III-5)	(TAAD)
<b>Familie #9</b> 	-	+	-	+	+
		(III-1, III-2)		(III-1, III-2)	(TAAD)
<b>Patientin #200</b> 	+	-	-	-	-
	(II-1)				

Orange, *CDKLI*-Variante vorhanden, \*, DNA Probe vorhanden und Segregationsanalyse durchgeführt; ●■, erkrankt, ○□, Klinik (noch) unklar, ○□, gesund; Pfeil: Indexpatient, +/-, klinische Manifestation liegt in der Familie vor/ist abwesend.

Mittels Sanger-Sequenzierung und NGS-Gen-Panel-Analyse wurden zwei weitere Varianten in *CDKLI* bei einem Geschwisterpaar [F#200; *CDKLI* c.620C>T (p.Ser207Leu)] und einer einzelnen Patientin [F#201; *CDKLI* c.407C>T (p.Thr136Met)] identifiziert (Tab. 5). Das Geschwisterpaar (Familie #9; 47 und 33 Jahre alt) wies skelettale und neurologische Merkmale eines Marfan Syndroms auf: Überstreckbarkeit der Knie- und Ellenbogengelenke, positives Daumen-Unterarm- und/oder Daumen-Handgelenkszeichen, leichte linkskonvexe Lumbalskoliose und/oder lumbosakrale Duraektasie. Klinische Manifestationen an der Aorta wurden nicht beobachtet. Die Mutter und der Großvater des Geschwisterpaares verstarben an einer Aortendissektion bzw. an einem plötzlichen Herztod beide im Alter von 54 Jahren (Tab. 5, Familie #9). In der Familie der Patientin #200 waren keine Aortenerkrankungen oder plötzlichen Herztode bekannt. Die Patientin (53 Jahre alt) wies eine Dissektion der *Aorta ascendens*, der linksseitigen *Arteria carotis communis* sowie eine Erweiterung der *Aorta descendens* und der Nierenarterie auf. Bei einem operativen Eingriff wurden die *Aorta ascendens* und die Aortenklappe ersetzt und eine Reinsertion der linken Koronararterie vorgenommen. Die Patientin hatte keine skelettalen, pulmonalen, ophthalmologischen oder neurologischen Auffälligkeiten (Tab. 5, #200). Bei der Familie #1 und dem Geschwisterpaar (Familie #9) wurden eine positive Familienanamnese hinsichtlich eines Aortensyndroms und/oder vaskuläre Komplikationen festgestellt (Tab. 5). Betroffene Angehörige der Familie #1 und das Geschwisterpaar (Familie #9) wiesen außerdem skelettale und neurologische Merkmale einer syndromalen Bindegewebserkrankung auf (Tab. 5).

Zusammengenommen sind dies gute Hinweise auf eine gemeinsame genetische Ätiologie, wie etwa pathogene *CDKLI*-Sequenzveränderungen [p.(Ser207Leu) und p.(Cys144Arg)]. Im Gegensatz dazu sprechen die lediglich starke vaskuläre Manifestation, jedoch das Fehlen klinischer Auffälligkeiten in anderen Geweben bei der Patientin #200 nicht für *CDKLI* als gemeinsames ursächliches Krankheitsgen in allen hier dargelegten Fällen. Demnach wäre die *CDKLI* c.407C>T p.(Thr136Met)-Variante klinisch möglicherweise nicht relevant. Andererseits ist für TAAID-Spektrumerkrankungen eine hohe klinische Variabilität beschrieben.<sup>42</sup>

## 2.2 Strukturelle Auswirkungen und veränderte Kinase-Aktivität von *CDKLI*-Mutanten

Die identifizierten Varianten in *CDKLI* betreffen Aminosäuren in direkter Nachbarschaft von Aminosäuren, die an der ATP-Bindung (Threonin 136 und Cystein 144) bzw. an der Substratbindung (Serin 207) beteiligt sind:

Die *CDKL1* c.430T>C Veränderung führt zum Austausch der Aminosäure Cystein 144 für ein Arginin. Cystein 144 befindet sich im funktionell sehr wichtigen sogenannten Aktivierungs-Loop, auch Mg<sup>2+</sup>-binding loop genannt,<sup>215</sup> der für die Phosphatpositionierung am Phosphatdonor (ATP) bzw. am Phosphattransfer an ein Substratmolekül beteiligt ist.<sup>268</sup> Für eine hohe funktionelle Relevanz der Aminosäure 144 sprechen auch Berichte über Mutationen der homologen benachbarten Aminosäure in CDK2 und CDK1 (Asp 145 bzw. 146), welche zum Verlust der Kinaseaktivität („*kinase-dead mutants*“) führen und die als dominant-negative Mutanten postuliert wurden.<sup>267-272</sup> Das *CDKL1* homologe CDKL5 gilt als Krankheitsgen für eine Form der epileptischen Enzephalopathie (OMIM #300672), und eine beschriebene pathogene Mutation betrifft exakt das dem Codon 144 in CDKL1 entsprechende Codon 152 in CDKL5, wodurch es zum Austausch des homologen Cys zu einem Phe kommt.<sup>273</sup> Zusammengenommen sind die Hinweise auf eine schädliche Wirkung der CDKL1 p.(Cys144Arg)-Veränderung als äußerst stark zu werten. Dementsprechend zeigte sich in einem *in vitro* Kinase-Aktivitäts-Test, in welchem der ATP-Umsatz gemessen wurde, für die Proteinmutante CDKL1<sup>C144R</sup> konsistent eine reduzierte Kinaseaktivität in HEK293T und HeLa Zellen.

Für die p.(Thr136Met) Variante stehen keine derartig schlagkräftigen Primärdaten zur Verfügung, dennoch lassen die *in silico* Strukturanalysen darauf schließen, dass die p.(Thr136Met) Aminosäuresubstitution die räumliche Struktur der ATP-Bindungstasche und damit die molekulare Interaktion von CDKL1 und dem ATP-Analogen beeinträchtigt. Die Kinaseaktivität von CDKL1<sup>T136M</sup> war – gemessen in HEK293T Zellen – beeinträchtigt. Äquivalent zur Proteinmutante CDKL1<sup>C144R</sup> spricht die reduzierte Kinaseaktivität von CDKL1<sup>T136M</sup> für eine veränderte molekulare Interaktion von CDKL1 und dem ATP-Analogen.

Die CDKL1 p.(Ser207Leu) Aminosäuresubstitution zeigte strukturelle Veränderungen in einem helikalen Bereich von CDKL1, die zu Konsequenzen in der Kinase-Substrat-Bindung führen können. Serin 207 befindet sich innerhalb der CDKL1 Kinasedomäne im hochkonservierten GKSDVD-Proteinbindemotiv und ist laut strukturellen Daten für homologe Proteine (am Beispiel von CDK2 mit dem entsprechenden homologen Bindemotiv GDSEID; PDB ID: 1FQ1) an Interaktionen mit Regulatorproteinen und/oder Substraten beteiligt.<sup>298,299</sup> Bemerkenswerterweise wurde schon vor mehr als 25 Jahren über eine dominant-negative Mutation der zur angrenzenden CDKL1-Aminosäure (Position 208) analogen Aminosäure in *S. pombe* *cdk2* berichtet.<sup>274</sup> Die Mutante CDKL1<sup>S207L</sup> wies in einer Versuchsreihe in HeLa Zellen eine reduzierte Kinaseaktivität auf. Hinsichtlich der Fragestellung, ob der p.(Ser207Leu) Aminosäureaustausch Auswirkungen auf die Substrat-Bindung hat, sind die Ergebnisse dieser Analyse wenig informativ.

Da ATP nur in Anwesenheit eines Substrates umgesetzt wird, könnte die reduzierte Kinaseaktivität in HeLa Zellen auf eine beeinträchtigte Substrat-Bindung zurückgeführt werden.

Zusammengenommen betreffen alle drei Veränderungen stark konservierte Proteinmotive, was für eine pathogene Relevanz für *CDKL1* spricht. Generell finden sich die meisten schädlichen Mutationen in bekannten Krankheitsgenen in sogenannten *constraint regions*, welche mit hochkonservierten funktionell essenziellen Proteinregionen einhergehen.<sup>178,300</sup> Da in der gnomAD-Datenbank etwa 203 heterozygote Träger einer trunkierenden *CDKL1*-Variante verzeichnet sind, scheint eine funktionelle Haploinsuffizienz von *CDKL1* für den Menschen unschädlich zu sein. Daher postulieren wir für die *CDKL1*-Varianten p.(Cys144Arg), p.(Thr136Met) und p.(Ser207Leu) zusätzlich zu einer *loss-of-function* Konsequenz (bezüglich der Kinase-Aktivität) eine dominant-negative Auswirkung auf die Zellphysiologie.

Im durchgeführten Kinase-Assay wurden verhältnismäßig geringe Unterschiede zwischen der Kinaseaktivität von *CDKL1*<sup>WT</sup> Protein und den Kontrollen (HA- bzw. EGFP-Leervektor) gemessen, was an einer möglicherweise inkompletten Aktivierung von *CDKL1* oder am artifiziellen, für *CDKL1* nicht spezifischen Peptidsubstrat liegt. Nur geringe Aktivitäten von *CDKL*-Proteinen wurden auch in einer anderen Studie gemessen, in welcher das gleiche Peptidsubstrat zur Analyse der Kinaseaktivität verwendet wurde.<sup>264</sup> Um Hinweise auf das spezifische Phosphorylierungsmotif und somit auf mögliche spezifische Proteinsubstrate von *CDKL1* zu erhalten, wurde mithilfe eines PamGene<sup>®</sup>4 Mikroarrays ein Kinase-Aktivitäts-Profil von *CDKL1* erstellt. Es wurden 7 verstärkt phosphorylierte Peptide für *CDKL1* detektiert, unter anderem aus dem ionotropen Glutamatrezeptors *GRIK2* (Uniprot Q13002). In der anschließenden Analyse war dieses Peptid aus dem Glutamatrezeptor *GRIK2* bei Überexpression von HA-*CDKL1*<sup>C144R</sup> und HA-*CDKL1*<sup>S207L</sup> im Vergleich zu HA-*CDKL1*<sup>WT</sup> respektive stärker bzw. schwächer phosphoryliert. Dies deutete auf eine durch die *CDKL1* Varianten p.(Cys144Arg) und p.(Ser207Leu) veränderte Substratphosphorylierung hin, sei es aufgrund einer veränderten Kinaseaktivität oder einer beeinträchtigten Substratbindung. Generell sei jedoch gesagt, dass in dieser Studie eine Spezifität des PamGene<sup>®</sup>4 Tests nicht deutlich wurde, und daher die aus diesem Test hervorgegangenen Ergebnisse wissenschaftlich nicht verlässlich sind.

### 2.3 *CDKL1* und die Pathogenese von HCTDs mit vaskulärer Beteiligung

Das *CDKL1* Protein weist Sequenzhomologien zu den Proteinen *GSK3A* und *GSK3B* auf<sup>301</sup>, welche die Signalmoleküle *SMAD2* und *SMAD3* des TGF- $\beta$ -Signalweges phosphorylieren. Bei der Analyse des Phosphorylierungs-Status von *SMAD3* in eukaryotischen Zellen bei transients

Überexpression von WT- oder mutiertem CDKL1 wurde keine veränderte Expression bzw. Phosphorylierung des SMAD3 Proteins beobachtet. Es konnte damit in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, dass CDKL1 an der Markierung von SMAD3 zur proteasomalen Degradierung beteiligt ist und dass der TGF- $\beta$ -Signalweg durch CDKL1-Mutanten beeinträchtigt wird.

CDKL1 ist ein Mitglied der CDC2-assoziierten Serin-Threonin Proteinkinase Familie. Das CDC2-Protein (CDK1; *cell-dependent kinase 1*) ist ein Schlüsselregulator im Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase.<sup>263</sup> Dahingehend war es denkbar, dass CDKL1 eine Funktion im Zellzyklus erfüllt. In einer anderen Studie führte der Knockdown von *CDKL1* in eukaryotischen Zellen zu einer gesteigerten Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21 sowie zu einer verminderten Expression von CDK2.<sup>275</sup> Die Expression dieser beiden Proteine sowie der Phosphorylierungs-Status von CyclinE wurden in dieser Arbeit in Abhängigkeit von der Expression des CDKL1<sup>WT</sup>- oder der mutanten Proteine untersucht. Dabei wurde keine veränderte Expression von p21 und CDK2 sowie keine veränderte Phosphorylierung von CyclinE beobachtet. Dies spricht gegen eine Beeinträchtigung des Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase durch die untersuchten CDKL1-Mutanten. Zudem wurde keine veränderte Proliferation von HeLa Zellen, die CDKL1<sup>WT</sup>- oder mutantes Protein stabil exprimieren, festgestellt. Somit ist ein deregulierter Zellzyklus als potenzieller Pathomechanismus unwahrscheinlich.

Mittels Immunhistologie wurde untersucht, ob und in welchen Zelltypen der Aortenwand CDKL1 Protein in Aortengewebe exprimiert ist. Es zeigte sich, dass CDKL1 in Zellinseln der *Tunica adventitia* exprimiert ist. Eine Kolokalisation von CDKL1 mit ASM bzw. Calponin, die auf die Expression von CDKL1 in glatten Muskelzellen in der *Tunica media* hindeuten könnte, wurde nicht beobachtet. CDKL1 lokalisierte jeweils in derselben Zellpopulation wie CD34- und STRO-1-exprimierende Zellen der Aortenwand. Eine Aussage zur Koexpression von CDKL1 mit CD34 bzw. mit STRO-1 in denselben Zellen konnte mittels der hier durchgeführten immunhistologischen Techniken nicht getroffen werden. CD34 und STRO-1 sind Markerproteine für Progenitorzellen. Diese sind essenziell bei der Reparatur von kardiovaskulärem Gewebe; sie können in verschiedene aortenrelevante Zelltypen differenzieren.<sup>278-280</sup> Progenitorzellen treten in TAAD-Gewebe häufiger auf als in Kontrollgewebe,<sup>281</sup> was auf eine Aktivierung dieser bei Gewebeschädigungen hinweist. Es ist denkbar, dass CDKL1 in Progenitor-Zellverbänden eine Funktion einnimmt und CDKL1-Funktionsverlust zum Verlust der Regenerationsfähigkeit führt; dies wäre ein neuer, bislang unbeschriebener Pathomechanismus für hereditäre Aortenerkrankungen.

Der Knockdown von *zcdkl1* in Zebrabärblingen durch Injektion verschiedener Morpholinos führte zu verkürzten Gefäßen und einer beeinträchtigten Aufrechterhaltung der Gefäße. Injektion der *zCdkl1*<sup>WT</sup> RNA, nicht aber die Injektion der *zCdkl1*<sup>C144R</sup> und *zCdkl1*<sup>S207L</sup> RNA, führte zu einem Rückgang der Zebrabärbling-Embryonen mit ISV Fehlbildungen. Dies spricht für pathogene Auswirkungen der *zCdkl1*<sup>C144R</sup> und *zCdkl1*<sup>S207L</sup> Mutanten im vaskulären System des Zebrabärblings. *zCdkl1* war in der Chorda dorsalis (Notochord), dem Neuralrohr, der Niere, der Nase und in Kupferschen Vesikeln, nicht aber in ISV von Zebrabärbling-Embryonen exprimiert. Diese Organe besitzen primäre Zilien, welche mechanische Stimuli (z.B. durch den Blutstrom verursachte Scherkräfte) wahrnehmen können.<sup>302,303</sup> In dem Modellorganismus *C. elegans* wurde gezeigt, dass CDKL1 in Zilien exprimiert ist und dass die Expressionsstärke von CDKL1 über die Zilien-Länge entscheidet.<sup>264</sup> Schließlich wurde beschrieben, dass primäre Zilien eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der vertebratischen Vaskulatur spielen.<sup>304</sup> Zusammengefasst könnten CDKL1-bedingte Defekte primäre Zilien betreffend durchaus hereditäre Aortenerkrankungen verursachen. Allerdings weisen die Patienten, welche die CDKL1-Varianten p.(Cys144Arg), p.(Thr136Met) oder p.(Ser207Leu) tragen, keine Ziliopathie-typischen klinischen Merkmale (z.B. polyzystische Nieren<sup>305</sup>) auf.

## VIII. Ausblick

Die exakte mechanistische Beteiligung von *CDKL1* an der Pathogenese von HCTD mit vaskulären Komplikationen wurde noch nicht vollständig geklärt. Jedoch konnten wahrscheinlich krankheitsverursachende Varianten in *CDKL1* identifiziert, und deren negativen funktionellen Auswirkungen in dieser Arbeit dargestellt werden. Für die letztendliche Verifikation von *CDKL1* als neues Krankheitsgen für HCTDs mit vaskulärer Beteiligung wäre die Identifizierung von *CDKL1* Varianten bei weiteren Patienten von Vorteil. Daher soll die Suche nach Varianten in *CDKL1* u. a. mittels tNGS-Gen-Panel-Analyse fortgesetzt werden. Außerdem sollen weiterführende funktionelle Analysen zum Genprodukt von *CDKL1* den Zusammenhang zwischen Sequenzveränderungen, Proteinfunktion und Erkrankung, d.h. den Pathomechanismus, aufklären. Essenziell erscheint hierfür die Identifikation der tatsächlichen zellulären Proteinsubstrate von *CDKL1* mithilfe zum PamGene<sup>®</sup>4-Assay alternativer Analysetechniken. Die Kandidatengene, welche in der ES-Analyse der Familien #2 bis #8 identifiziert wurden, sollen ebenfalls u. a. mittels tNGS in einer größeren Patientenkohorte mit HCTD und/oder vaskulärer Beteiligung verifiziert werden.

Schließlich sollen Analysen zur Bürde (i.e. *burden analysis*) von genetischen Faktoren (Sequenzveränderungen) durchgeführt werden, um weitere putative Krankheitsgene insbesondere unter der Annahme einer oligo- bzw. polygenen Ätiologie zu definieren.

## IX. Appendix

Tab. 6: Liste der 32 mittels zielgerichteter NGS-Analyse untersuchten Gene.

<b>Gen</b>	<b>Analysierte Transkriptvariante(n)</b>	<b>Anzahl der abgedeckten Exons</b>
<i>ACTA2</i>	NM_001613	8
<i>ADAMTS10</i>	NM_030957	24
<i>COL1A1</i>	NM_000088	51
<i>COL2A1</i>	NM_001844	54
<i>COL3A1</i>	NM_000090	51
<i>COL4A5</i>	NM_033380	51
<i>COL5A2</i>	NM_000393	54
<i>DCHS1</i>	NM_003737	20
<i>EFEMP2</i>	NM_016938	10
<i>ELN</i>	NM_000501	33
<i>FBN1</i>	NM_000138	65
<i>FBN2</i>	NM_001999	65
<i>FLNA</i>	NM_001110556	47
<i>GATA5</i>	NM_080473	6
<i>LOX*</i>	NM_002317	7
<i>LTBP2</i>	NM_000428	36
<i>MAT2A</i>	NM_005911	9
<i>MFAP5</i>	NM_003480	9
<i>MYH11</i>	NM_001040113	42
<i>MYLK</i>	NM_053025	31
<i>NOTCH1</i>	NM_017617	34
<i>PLOD1</i>	NM_000302	19
<i>PRKG1</i>	NM_006258, NM_001098512	18
<i>SKI</i>	NM_003036	7
<i>SLC2A10</i>	NM_030777	5
<i>SMAD3</i>	NM_005902, NM_001145103	9
<i>SMAD4</i>	NM_005359	11
<i>TGFB2</i>	NM_001135599	8
<i>TGFB3</i>	NM_003239	7
<i>TGFBR1</i>	NM_004612	9
<i>TGFBR2</i>	NM_001024847	8

Für jedes Gen sind die in dieser Studie analysierten Transkriptvarianten (NM\_Nummern) sowie die Anzahl der Exons, welche mittels zielgerichteter NGS-Analyse abgedeckt wurden, beschrieben.

\*, *LOX* wurde nicht mittels tNGS-Analyse, sondern mittels ES-Analyse untersucht.

<b>Populationsdatenbanken</b>	MAF $\geq$ 5% oder MAF $\geq$ Prävalenz der Erkrankung <b>oder</b> Detektion in gesunden Kontrollen ist inkonsistent mit der Penetranz der Erkrankung.	BA1/BS1 <b>oder</b> BS2
	Nicht in Populationsdatenbanken verzeichnet	PM2
	Prävalenz der Variante ist in Erkrankten statistisch höher als in gesunden Kontrollen.	PS4
<b><i>in silico</i> Pathogenitätsvorhersagen</b>	Mehrere <i>in silico</i> Programme sagen keinen Effekt auf das Gen/Genprodukt voraus.	BP4
	Missense-Variante in einem Gen, für das ausschließlich trunkierende Varianten als krankheitsursächlich beschrieben sind.	BP1
	Stille Variante mit keinem Effekt auf das Spleißen.	BP7
	In-frame Indels in einem Nukleotid-Stretch ohne/mit bekannter Funktion.	BP3
	Mehrere <i>in silico</i> Programme sagen einen schädlichen Effekt auf das Gen/Genprodukt voraus.	PP3
	Missense-Variante betrifft eine Aminosäure, für die bereits ein anderer pathogener Missense-Austausch beschrieben ist.	PM5
	Variante führt zur Veränderung der Proteinelänge.	PM4
	Aminosäureaustausch ist bereits als pathogene Variante beschrieben.	PS1
Vorhergesagte Null-Variante in einem Gen, für das loss-of-function ein bekannter Pathomechanismus ist.	PVS1	
<b>Funktionelle Analysen</b>	Etablierte funktionelle Analysen zeigen keinen schädlichen Effekt.	BS3
	Missense-Variante in einem Gen, für das wenige gutartige Missense-Varianten beschrieben sind und in dem Missense-Varianten ein üblicher Pathomechanismus sind.	PP2
	Variante betrifft einen <i>hot spot</i> von Mutationen oder eine gut charakterisierte funktionelle Domäne.	PM1
	Etablierte funktionelle Analysen zeigen einen schädlichen Effekt.	PS3
<b>Segregationsanalysen</b>	keine Segregation mit der Erkrankung	BS4
	Kosegregation mit der Erkrankung in mehreren betroffenen Familienangehörigen	PP1
<b>De novo Varianten</b>	De novo (Vaterschaft und Mutterschaft nicht bestätigt)	PM6
	De novo (Vaterschaft und Mutterschaft sind bestätigt)	PS2
<b>Varianten in <i>cis</i> oder in <i>trans</i></b>	Pathogene Variante in <i>trans</i> beobachtet (bei vollständiger Penetranz des Gens/der Erkrankung)	BP2
	Pathogene Variante in <i>cis</i> beobachtet (unabhängig vom Vererbungsmuster)	BP2
	Für rezessiv-vererbte Erkrankungen: pathogene Variante in <i>trans</i> beobachtet.	PM3
<b>Genotyp-Phänotyp-Datenbanken</b>	Namhafte Quelle, ggf. mit evidenzbasierten Daten, beschreibt Variante als gutartig.	BP6
	Namhafte Quelle beschreibt Variante als pathogen.	PP5
<b>Weitere Daten</b>	Variante wurde bei einem anderen Fall (Patienten) beobachtet, bei dem eine andere Variante als krankheitsursächlich gefunden wurde.	BP5
	Der Phänotyp des Patienten ist sehr spezifisch für Mutationen in dem entsprechenden Gen.	PP4

**Abb. 27: Bewertung von Sequenzvarianten nach ACMG/AMP Richtlinien.** Zu den Bewertungskriterien zählen die Allelfrequenz, *in silico* Pathogenitäts-Vorhersagen, funktionelle Analysen, Segregationsanalysen, einhergehende Varianten, Informationen aus Datenbanken zu Genotyp/Phänotyp Beziehungen und weitere Daten (z.B. der klinischen Manifestation). Kriterien zur Bewertung von pathogenen Varianten werden als PVS1 (sehr stark; rot), PS1-PS4 (stark; rot), PM1-PM6 (moderat; orange) und PP1-PP5 (unterstützend; grün) gewichtet. Kriterien zur Bewertung von gutartigen Varianten werden als BA1 (sehr stark; lila), BS1-BS4 (stark; lila) und BP1-BP7 (unterstützend; blau) gewichtet.

Tab. 7: Berichtswerte Varianten, identifiziert in 199 Patienten mit hereditären Aortopathien oder verwandten Erkrankungen des Bindegewebes.

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variante <sub>GEN</sub> )	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b>ACTA2</b>	<b>misZ=3,35; pLI=0,93</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>				
c.420G>A p.=	n.v./VUS VUS <sub>PP3+BS4</sub>	0,005623% (14/0/248998)	n.a./n.a./n.a.	Akzetor Gewinn (HSF, MaxEnt)	#95	HCTD FA neg.
<b>ADAMTS10</b>	<b>misZ=3,61; pLI=0,84</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:100.000 (0,001%)</b>				
c.3002G>A p.Arg1001His	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+PP2+PP3</sub>	0	0,295/0,399/0,995	n.f.	#46 (+VUS <sub>FBN2</sub> )	HCTD FA pos. (ARUP)
<b>COL2A1</b>	<b>misZ=3,25; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:7.500 (0,013%)</b>				
c.2625+10G>C n.a.	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#139 (+VUS <sub>COL3A1</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD)
c.4095T>C p.=	n.v./VUS VUS <sub>BP7</sub>	0,005663% (16/0/282554)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#128 (+VUS <sub>LTBP2</sub> )	MFS, MVP FA n.f.
<b>COL3A1</b>	<b>misZ=4,40; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:50.000 (0,002%)</b>				
c.773G>C p.Gly258Ala	n.v./n.v. LPV <sub>PM1+PM2+PP2+PP3+PP4*</sub>	0	0,977/0,937/0,997	n.f.	#146	HCTD, EDS (VASK) FA n.f.
c.805G>C p.Asp269His	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+PP2+PP3+BS4</sub>	0	0,544/0,214/0,606	n.f.	#151 (+LPV <sub>FBN2</sub> )	HCTD, CCA FA pos. (HCTD, MFS)
c.1201G>A p.Ala401Thr	n.v./n.v. VUS <sub>PP2+PP3+PP4</sub>	0,0007963% (2/0/251172)	0,275/0,042/0,564	n.f.	#64 (+VUS <sub>MYH11</sub> )	TAAD, EDS (VASK) FA neg.
c.1348-28T>G n.a.	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#121	TAAD FA neg.
c.1761+7T>A n.a.	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#50	HCTD, IA FA n.f.
c.1978-18A>G n.a.	n.v./n.v. VUS <sub>BP4</sub>	0,0003982% (1/0/251150)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#103 (+VUS <sub>NOTCH1</sub> , +LBV <sub>NOTCH1</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD)
c.2229G>A p.=	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+PP3</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	Donor Verlust (NetGene, MaxEnt)	#152	HCTD, CAAD FA n.f.
c.3593G>A p.Gly1198Asp	n.v./n.v. VUS <sub>PP2+BP4</sub>	0,001989% (5/0/251366)	0,271/0,053/0,344	n.f.	#139 (+VUS <sub>COL2A1</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD)

Tab. 7: Fortsetzung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variantegen)	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b>COL5A1</b>	<b>misZ=2,25; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:20.000 (0,005%)</b>				
c.2285C>T p.Pro762Leu	n.v./VUS VUS <sub>PP3+BP1+BS4</sub>	0,004951% (14/0/282756)	0,594/0,495/0,629	n.f.	#15 (+VUS <sub>DCHS1</sub> )	HCTD, CAAD FA neg.
c.3344C>T p.Pro1115Leu	n.v./VUS VUS <sub>PP3+BP1</sub>	0,003903% (6/0/153730)	0,642/0,295/0,646	n.f.	#88 (+VUS <sub>MYLK</sub> )	TAAD, BAV FA neg.
c.3605C>T p.Pro1202Leu	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+PP3+BP1</sub>	0	0,729/0,427/0,987	n.f.	#57	TAAD FA pos. (IA)
<b>COL5A2</b>	<b>misZ=2,73; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:20.000 (0,005%)</b>				
c.31C>A p.Leu11Ile	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP4</sub>	0	0,255/0,032/0,439	n.f.	#113	EDS (HMB/KSKL) FA neg.
c.1618-7G>A p.?	n.v./n.v. VUS <sub>PP3</sub> ††	0,001595% (4/0/250796)	n.a./n.a./n.a.	Gewinn eines krypt. Akzeptors (HSF, NetGene2) Verlust des Wildtyp Akzeptors (MaxEnt)	#166 (+VUS <sub>TGFBRI</sub> )	LDS, BAV FA neg.
c.2229+10A>G n.a.	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#5 (+LBV <sub>FBN1</sub> )	TAAD FA n.f.
<b>DCHS1</b>	<b>misZ=2,62; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:40 (2,5%)</b>				
c.252G>C p.Glu84Asp	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PM2+BP4</sub>	0,0003998% (1/0/250098)	0,185/0,015/0,514	n.f.	#195	TAAD, MFS FA pos. (MFS)
c.590C>T p.Pro197Leu	DM <sup>d.c.</sup> /n.v. VUS <sub>PM1+PM2+BP4</sub> ¶	0,05423% (153/0/282142)	0,129/0,029/0,054	n.f.	#102	HCTD FA neg.
c.2730G>A p.=	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP7</sub>	0,004258% (12/0/281844)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#111 (+VUS <sub>DCHS1</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD)
c.3414A>G p.=	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP7</sub>	0,00387% (8/0/206702)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#125 (+VUS <sub>DCHS1</sub> )	TAAD FA pos. <sup>203</sup>
c.5972G>A p.Arg1991His	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PM2+BP4</sub>	0,0443% (125/0/282198)	0,193/0,022/0,298	n.f.	#182 (+VUS <sub>NOTCH1</sub> ) #181 (+VUS <sub>TGFB3</sub> )	HCTD FA pos. (TAAD) MFS FA pos. (MFS)

Tab. 7: Fortsetzung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variantegen)	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b><i>DCHS1</i></b>	<b>misZ=2,62; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:40 (2,5%)</b>				
c.7136G>A p.Ser2379Asn	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PM2+BP4</sub>	0,002254% (6/0/266158)	0,067/0,008/0,124	n.f.	#145 (+VUS <sub>FBN2</sub> )	TAAD, CCA FA pos. (IA)
c.8060T>G p.Phe2687Cys	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PM2+BP4</sub>	0	0,242/0,017/0,835	n.f.	#111 (+VUS <sub>DCHS1</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD)
c.8612G>T p.Arg2871Leu	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PM2+BP4</sub>	0	0,273/0,009/0,659	n.f.	#15 (+VUS <sub>COL5A1</sub> )	HCTD, CAAD FA neg.
c.8971C>T p.Arg2991Trp	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+PP3</sub>	0,001646% (4/0/243060)	0,222/0,052/0,753	n.f.	#191	TAAD, AI FA neg.
c.9201A>G p.=	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP7</sub>	0,003863% (7/0/181204)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#125 (+VUS <sub>DCHS1</sub> )	TAAD FA pos. (ARUP)
c.9466G>A p.Glu3156Lys	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+PP3</sub>	0	0,353/0,084/0,982	n.f.	#174	TAAD, MVP FA pos. (TAAD, IA)
c.9609C>G p.=	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP7</sub>	0,089% (250/0/280910)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#138 (+LPV <sub>TGFB2</sub> )	TAAD FA neg.
<b><i>ELN</i></b>	<b>misZ=0,07; pLI=0,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:20.000 (0,005%)</b>				
c.140G>C p.Gly47Ala	n.v./n.v. VUS <sub>PP3+BP1</sub>	0,0003979% (1/0/251294)	0,435/0,520/0,562	n.f.	#67	TAAD FA pos. (TAAD, SAH)
c.1339G>T p.Ala447Ser	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+PP3+BP1</sub>	0	0,157/0,095/0,624	n.f.	#19	MFS, LDS FA n.f.
<b><i>FBN1</i></b>	<b>misZ=5,45; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:7.500 (0,013%)</b>				
c.304T>C p.Cys102Arg	DM(p.Cys102Tyr)/n.v. LPV <sub>PM1+PM2+PM5+PP2+PP3+PP4</sub>	0	0,932/0,801/0,995	n.f.	#137	MFS FA neg.
c.640G>A p.Gly214Ser	DM, DM(p.Gly214Arg), DM(p.Gly214Asn)/P PV <sub>PS1+PM1+PM2+PP3+PP2</sub>	0	0,919/0,807/0,999	n.f.	#62	TAAD FA neg.
c.718C>T p.Arg240Cys	DM <sup>d.c.</sup> , DM(p.Arg240His/P <sup>d.c.</sup> ) LPV <sub>PS1+PM2+PP2+PP3+PP4</sub>	0	0,829/0,293/0,998	n.f.	#141	MFS FA n.f.
c.974_983del p.Gly325Alafs*2	n.v./n.v. PV <sub>PVS1+PM2+PP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#53	MFS FA n.f.

Tab. 7: Fortsetzung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variantegen)	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b><i>FBNI</i></b>	<b>misZ=5,45; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:7.500 (0,013%)</b>				
c.1211C>G p.Pro404Arg	n.v./VUS VUS <sub>PP2+PP1+BP4</sub>	0,001771% (5/0/282376)	0,262/0,071/0,146	n.f.	#124	HCTD FA neg.
c.1570dupA p.Thr524Asnfs*9	DM/P-LP PV <sub>PVS1+PS4+PM2+PP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#130	MFS FA pos. (MFS)
c.1589-14A>G p.Ile531Phefs*6	n.v./n.v. LPV <sub>PS3+PM2+PP3+PP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	Gewinn eines krypt. Akzeptors (HSF, MaxEnt; exp. best.)	#14 (+VUS <sub>NOTCHI</sub> )	MFS FA pos. (TAAD)
c.2242T>C p.Cys748Arg	DM?, DM(p.Cys748Tyr)/LP LPV <sub>PM1+PM2+PM5+PP2+PP3+PP4</sub>	0	0,984/0,965/1,000	n.f.	#133	MFS FA neg.
c.2557T>C p.Cys853Arg	DM, DM(p.Cys853Ser)/n.v. PV <sub>PS1+PM1+PM2+PP2+PP3+PP4</sub> †	0	0,953/0,893/0,999	n.f.	#162 (+VUS <sub>NOTCHI</sub> )	MFS FA pos. (MFS)
c.2592C>A p.=	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP7</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#112	TAAD FA neg.
c.3012C>A p.Tyr1004*	DM/P PV <sub>PVS1+PM2+PP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#161 (+VUS <sub>MYH11</sub> )	MFS, LDS FA pos. (MFS, LDS)
c.3332G>A p.Cys1111Tyr	DM, DM(p.Cys1111Arg)/n.v. PV <sub>PS1+PM1+PM2+PP2+PP3+PP4</sub> †	0	0,877/0,556/1,000	n.f.	#41	MFS FA n.f.
c.3599A>T p.Glu1200Val	DM(p.Glu1200Gly)/n.v. LPV <sub>PM1+PM2+PM5+PP2+PP3+PP4</sub>	0	0,962/0,903/0,999	n.f.	#74	MFS FA n.f.
c.3712G>A p.Asp1238Asn	DM? <sup>d.c.</sup> , DM(p.Asp1238Gly)/P PV <sub>PS1+PM1+PM2+PP2+PP3+PP4</sub>	0	0,895/0,686/0,997	n.f.	#122	HCTD, MFS FA pos. (HCTD)
c.3937G>A p.Gly1313Ser	DM <sup>d.c.</sup> /n.v. LPV <sub>PS1mod.+PM1+PP2+PP3</sub> ‡	0,0003981% (1/0/251176)	0,827/0,719/0,780	n.f.	#127 (+LPV <sub>FBNI</sub> )	TAAD FA neg.
c.4036T>G p.Phe1346Val	DM, DM(p.Phe1346Leu,Cys)/n.v. PV <sub>PS1+PM1+PM2+PP3+PP4</sub> †	0	0,984/0,890/0,995	n.f.	#172	MFS FA neg.
c.4218T>C p.=	n.v./n.v. VUS <sub>BP7</sub>	0,001193% (3/0/251422)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#91 (+PV <sub>FBNI</sub> )	TAAD FA neg.

Tab. 7: Fortsetzung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variantegen)	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b><i>FBN1</i></b>	<b>misZ=5,45; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:7.500 (0,013%)</b>				
c.4568G>A p.Arg1523Gln	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PP2+PP3</sub>	0,001770% (5/0/282514)	0,412/0,275/0,638	n.f.	#142 (+VUS <sub>NOTCH1</sub> , +2LPV <sub>SMAD3</sub> )	HCTD, TAAD, SAH FA neg.
c.4781delG p.Gly1594Valfs*46	n.v./n.v. PV <sub>PVS1+PM2+PP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#42	MFS FA n.f.
c.5066-1G>A p.?	DM/n.v. PV <sub>PVS1+PM2+PP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	Akzeptor Verlust (HSF, MaxEnt)	#69	MFS FA pos. (MFS)
c.5495G>A p.Arg1832His	DM(p.Arg1832Pro)/VUS <sup>d.c.</sup> LPV <sub>PM1+PM5+PP2+PP3</sub>	0,003185% (1/0/31398)	0,793/0,387/0,996	n.f.	#127 (+LPV <sub>FBN1</sub> )	TAAD FA neg.
c.5905delA p.Arg1969Glyfs*11	n.v./n.v. PV <sub>PVS1+PM2+PP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#126 (+VUS <sub>FBN2</sub> , +VUS <sub>NOTCH1</sub> )	MFS FA pos. (MFS)
c.6386A>G p.Asp2129Gly	DM(p.Asp2129Val)/VUS <sup>d.c.</sup> LPV <sub>PM1+PM2+PM5+PP2+PP3+PP4</sub>	0	0,857/0,624/0,930	n.f.	#99	MFS FA pos. (MFS)
c.6613dupG p.Glu2205Glyfs*5	n.v./n.v. PV <sub>PVS1+PM2+PP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#54	MFS FA pos. (MFS)
c.7119C>T p.=	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP7</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#6	TAAD, AAA FA n.f.
c.7582T>C p.Cys2528Arg	DM, DM(p.Cys2528Phe,Tyr)/n.v. PV <sub>PS1+PM1+PM2+PP2+PP3</sub> †	0	0,990/0,940/1,000	n.f.	#91 (+VUS <sub>FBN1</sub> )	TAAD FA neg.
c.7694G>A p.Cys2565Tyr	DM, DM(p.Cys2565Phe)/n.v. PV <sub>PS1+PM1+PM2+PP2+PP3+PP4</sub> †	0	0,952/0,960/0,999	n.f.	#27	MFS FA pos. (MFS)
c.7754T>C p.Ile2585Thr	DM <sup>d.c.</sup> /P-LP LPV <sub>PS1+PM1+PP2+PP3</sub>	0,001594% (4/0/250918)	0,642/0,040/0,383	n.f.	#119	TAAD, MFS FA neg.
<b><i>FBN2</i></b>	<b>misZ=1,99; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:20.000 (0,005%)</b>				
c.1093A>G p.Met365Val	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PP3+PP4</sub> ‡‡	0,001594% (4/0/250990)	0,259/0,017/0,189	Donor Gewinn (HSF, MaxEnt)	#52	HCTD, CCA FA n.f.
c.1120C>T p.Arg374Cys	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PP3</sub>	0,001062% (3/0/282386)	0,889/0,160/0,994	n.f.	#126 (+PV <sub>FBN1</sub> , +VUS <sub>NOTCH1</sub> )	MFS FA pos. (MFS)
c.1610A>G p.Asp537Gly	n.v./n.v. LPV <sub>PM1+PP1mod.+PP3+PP4</sub> §	0,0007103% (2/0/281554)	0,917/0,249/0,995	n.f.	#151 (+VUS <sub>COL3A1</sub> )	HCTD, CCA FA pos. (HCTD, MFS)

Tab. 7: Fortsetzung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variantegen)	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b><i>FBN2</i></b>	<b>misZ=1,99; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:20.000 (0,005%)</b>				
c.2363G>A p.Arg788His	n.v./LB <sup>d.c.</sup> VUS <sub>PM1+PP3</sub>	0,003583% (9/0/251178)	0,594/0,128/0,378	n.f.	#188 (+LPV <sub>LOX</sub> )	TAAD FA neg.
c.2825C>T p.Pro942Leu	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PM2+PP3</sub>	0	0,364/0,098/0,866	n.f.	#167	TAAD, MVP FA n.f.
c.7137T>G p.=	n.v./LB <sup>d.c.</sup> VUS <sub>BP7</sub>	0,004384% (11/0/250884)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#46 (+VUS <sub>ADAMTS10</sub> )	HCTD FA pos. (ARUP)
c.7144C>T p.Arg2382*	n.v./n.v. VUS <sub>PVS1mod.+PM2+PP4</sub> **	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#145 (+VUS <sub>DCHSI</sub> )	TAAD, CCA FA pos. (IA)
<b><i>FLNA</i></b>	<b>misZ=3,84; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung unbekannt</b>				
c.2449C>T (hemizyg.) p.Pro817Ser	n.v./VUS VUS <sub>PM1+PM2+BP4</sub>	0,04442% (90/0/44/202612)	0,320/0,171/0,088	n.f.	#45	TAAD FA neg.
c.3915G>A (hemizyg.) p.=	n.v./B-LB <sup>d.c.</sup> VUS <sub>PM2+BP7</sub>	0,04147% (84/0/34/202550)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#40	TAAD, MFS FA pos. (TAAD)
<b><i>GATA5</i></b>	<b>misZ=1,34; pLI=0,67</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:100 (1%)</b>				
c.932C>T p.Ser311Leu	n.v./n.v. VUS <sub>BP4</sub>	0,01371% (38/0/277076)	0,238/0,328/0,016	n.f.	#177	MFS FA pos. <sup>203</sup>
c.1159C>T p.Arg387Cys	DM? <sup>d.c.</sup> /VUS VUS <sub>PP3</sub>	0,01476% (41/0/277724)	0,727/0,771/0,946	n.f.	#197	TAAD FA pos. (TAAD)
<b><i>LOX</i></b>	<b>misZ=0,81; pLI=0,99</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>				
c.125G>A p.Trp42*	DM <sup>d.c.</sup> /P <sup>d.c.</sup> LPV <sub>PVS1strong+PM2§</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#188 (+VUS <sub>FBN2</sub> )	TAAD FA neg.
c.995A>G p.Tyr332Cys	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PM2+BP4</sub>	0	0,210/0,008/0,973	n.f.	#13	LDS FA neg.
<b><i>LTP2</i></b>	<b>misZ=0,38; pLI=0,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:100.000 (0,001%)</b>				
c.5333G>A p.Cys1778Tyr	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PM2+PP3</sub>	0	0,955/0,788/1,000	n.f.	#128 (+VUS <sub>COL2A1</sub> )	MFS, MVP FA n.f.

Tab. 7: Fortsetzung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variante <sub>GEN</sub> )	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b>MYH11</b>	<b>misZ=1,54; pLI=0,88</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>				
c.(?_1)_(*1_?)dup n.a.	DP/VUS VUS <sub>PM2</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#64 (+VUS <sub>COL3A1</sub> )	TAAD, EDS (VASK) FA neg.
c.654+10T>C n.a.	n.v./B-LB <sup>d.c.</sup> VUS <sub>BP4</sub>	0,03958% (111/1/280416)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#29	TAAD FA pos. (TAAD)
c.2026C>T p.Arg676Cys	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PP3+BS2+BP5</sub> §§	0,06755% (191/0/282762)	0,847/0,526/0,086	n.f.	#161 (+PV <sub>FBNI</sub> )	MFS, LDS FA pos. (MFS, LDS)
c.3787_3789delAAG p.Lys1263del <sup>ll</sup>	DM <sup>d.c.</sup> /VUS <sup>d.c.</sup> LPV <sub>PS4+PM4</sub>	0,004607% (13/0/282182)	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#97 (+VUS <sub>MYLK</sub> ) #117	TAAD FA pos. (TAAD) TAAD FA pos. (TAAD)
c.5424C>T p.=	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+BP7</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#140 (+VUS <sub>PRKG1</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD, IA)
<b>MYLK</b>	<b>misZ=1,34; pLI=0,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>				
c.59A>C p.Asp20Ala	n.v./n.v. VUS <sub>BP4</sub>	0,0003978% (1/0/251376)	0,036/0,034/0,081	n.f.	#88 (+VUS <sub>COL5A1</sub> )	TAAD, BAV FA neg.
c.2461C>T p.Arg821Thr	n.v./VUS VUS <sub>PM1+BP4</sub>	0,01768% (50/0/282790)	0,188/0,057/0,125	n.f.	#97 (+LPV <sub>MYH11</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD)
c.4292C>T p.Pro1431Leu	n.v./VUS VUS <sub>PM1+BP4</sub>	0,006024% (17/0/282188)	0,034/0,009/0,073	n.f.	#123	TAAD FA neg.
c.4620-7C>T n.a.	n.v./n.v. VUS <sub>BP4</sub>	0,0003987% (1/0/250826)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#189	TAAD FA pos. (AAA)
<b>NOTCH1</b>	<b>misZ=3,95; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:500 (0,2%)</b>				
c.79C>T p.Pro27Ser	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PM2+PP2+BP4</sub>	0	0,021/0,009/0,238	n.f.	#183	HCTD FA pos. (AAA)
c.2833G>A p.Asp945Asn	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+PP2+PP3</sub>	0,0004020% (1/0/248772)	0,504/0,302/0,992	n.f.	#142 (+VUS <sub>FBNI</sub> , +2LPV <sub>SMAD3</sub> )	HCTD, TAAD, SAH FA neg.
c.5224G>T p.Ala1742Ser	n.v./VUS VUS <sub>PP2+BP4</sub>	0,007345% (19/0/258674)	0,239/0,346/0,086	n.f.	#182 (+VUS <sub>DCHS1</sub> )	HCTD FA pos. (TAAD)
c.5476G>A p.Glu1826Lys	n.v./n.v. VUS <sub>PP2+PP3</sub>	0,002835% (7/0/246880)	0,506/0,768/0,838	n.f.	#14 (+LPV <sub>FBNI</sub> )	MFS FA pos. (TAAD)

Tab. 7: Fortsetzung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Voerhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variante <sub>GEN</sub> )	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b>NOTCH1</b>	<b>misZ=3,95; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:500 (0,2%)</b>				
c.6083-4G>A n.a.	n.v./LB <sup>d.c.</sup> VUS <sub>BP4</sub>	0,004638% (13/0/280312)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#103 (+VUS <sub>COL3A1</sub> , +LBV <sub>NOTCH1</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD)
c.6770C>T p.Ala2257Val	n.v./n.v. VUS <sub>PP2+BP4</sub>	0,001260% (3/0/238118)	0,090/0,085/0,017	n.f.	#162 (+PV <sub>FBN1</sub> )	MFS FA pos. (MFS)
c.7130C>T p.Pro2377Leu	n.v./n.v. VUS <sub>PP2+BP4</sub>	0,003632% (9/0/247826)	0,434/0,075/0,225	n.f.	#126 (+PV <sub>FBN1</sub> , +VUS <sub>FBN2</sub> )	MFS FA pos. (MFS)
<b>PRKG1</b>	<b>misZ=3,10; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>				
c.-38_-36dupGCC n.a.	n.v./n.v. VUS <sub>PM2</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#140 (+VUS <sub>MYH11</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD, IA)
<b>SMAD3</b>	<b>misZ=3,47; pLI=0,84</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>				
c.738_741dupGACA p.Phe248Aspfs*64	n.v./n.v. LPV <sub>PVS1+PM2</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#153	TAAD FA pos. (TAAD)
c.803G>A p.Arg268His	DM <sup>7d.c.</sup> , DM(p.Arg268Leu)/VUS <sup>d.c.</sup> PV <sub>PS4+PM1+PM2+PP2+PP3</sub>	0	0,987/0,631/1,000	n.f.	#156	TAAD, MFS, LDS FA pos. (TAAD)
c.848T>A p.Val283Glu	n.v./n.v. LPV <sub>PM1+PM2+PP2+PP3</sub>	0	0,985/0,797/0,998	n.f.	#142 (+VUS <sub>FBN1</sub> , +VUS <sub>NOTCH1</sub> , +LPV <sub>SMAD3</sub> )	HCTD, TAAD, SAH FA neg.
c.851A>G p.Glu284Gly	n.v./n.v. LPV <sub>PM1+PM2+PP2+PP3</sub>	0	0,979/0,728/0,997	n.f.	#142 (+VUS <sub>FBN1</sub> , +VUS <sub>NOTCH1</sub> , +LPV <sub>SMAD3</sub> )	HCTD, TAAD, SAH FA neg.
c.1091A>G p.Tyr364Cys	DM <sup>d.c.</sup> /VUS <sup>d.c.</sup> LPV <sub>PS1+PM1+PM2+PP2</sub>	0	0,900/0,429/0,997	n.f.	#135	TAAD FA n.f.
<b>SKI</b>	<b>misZ=1,73; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000.000 (0,0001%)</b>				
c.230C>G p.Pro77Arg	n.v./n.v. VUS <sub>PM2+PP3</sub>	0	0,423/0,602/0,591	n.f.	#147	TAAD FA pos. (AAA)
<b>TGFB2</b>	<b>misZ=2,25; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:40.000 (0,0025%)</b>				
c.835G>T p.Ala279Ser	n.v./n.v. VUS <sub>PM1+BP4</sub>	0,001203% (3/0/249378)	0,244/0,021/0,508	n.f.	#176	TAAD, MFS, LDS FA neg.

Tab. 7: Fortsetzung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variantegen)	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b>TGFB3</b>	<b>misZ=1,78; pLI=0,99</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:40.000 (0,0025%)</b>				
c.487C>T	n.v./VUS	0,001768%				MFS
p.Arg163Trp	VUS <sub>PM1+PP3</sub>	(5/0/282756)	0,338/0,067/0,915	n.f.	#181 (+VUS <sub>DCHS1</sub> )	FA pos. (MFS)
c.527C>T	n.v./VUS	0,0003979%				HCTD, TAAD, AAA
p.Pro176Leu	VUS <sub>PM1+PP3</sub>	(1/0/251320)	0,297/0,070/0,632	n.f.	#180	FA pos. (TAAD)
<b>TGFBRI</b>	<b>misZ=2,90; pLI=0,83</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:40.000 (0,0025%)</b>				
c.-54T>C	n.v./n.v.	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#132	HCTD
n.a.	VUS <sub>PM2</sub>					FA pos. (HCTD)
c.575G>A	n.v./n.v.	0	0,901/0,478/0,995	n.f.	#131	EDS
p.Gly192Asp	LPV <sub>PM1+PM2+PP2+PP3</sub>					FA pos. (EDS)
c.1387-4G>C	DM <sup>d.c.</sup> /n.v.	0	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#166 (+VUS <sub>COL5A2</sub> )	LDS, BAV
n.a.	VUS <sub>PM2+BP4</sub>					FA neg.
c.1457T>C	DM <sup>d.c.</sup> /n.v.	0	0,815/0,149/0,995	n.f.	#71	TAAD
p.Leu486Ser	LPV <sub>PM1+PM2+PP2+PP3</sub>					FA n.f.
<b>TGFBRI2</b>	<b>misZ=2,39; pLI=0,15</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:40.000 (0,0025%)</b>				
c.-23T>C	n.v./n.v.	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#98	HCTD, BAV
n.a.	VUS <sub>PM2</sub>					FA neg.
c.530-5A>G	n.v./n.v.	0,0003979%	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#107	TAAD
n.a.	VUS <sub>BP4</sub>	(1/0/251306)				FA n.f.
c.1639G>A	n.v./P <sup>d.c.</sup>	0	0,463/0,069/0,999	n.f.	#138 (+VUS <sub>DCHS1</sub> )	TAAD
p.Asp547Asn	LPV <sub>PM1+PM2+PP2+PP3</sub>					FA neg.

Die Varianten in 23 von 32 analysierten Genen sind nach Genen sortiert. Für jedes Gen sind der misZ (Score für Missense-Varianten; Intoleranz gegenüber Variation) und der pLI Score der gnomAD Metriken (v.2.1) sowie die Prävalenz der jeweils häufigsten mit dem Gen assoziierten Erkrankung angegeben. Für jede Variante ist die Position in der cDNA und die Position der betroffenen Aminosäure in der Proteinsequenz gegeben. Die Annotation der Varianten beginnt mit +1 für das A des ATG-Translations-Initiations-Codons. Das Initiationscodon ist Codon 1. Einhergehende Varianten sind in der Spalte „Patient“ hinter der Patientenummer in Klammern angegeben.

HGMD (*Human Gene Mutation Database*) Varianten Kategorien: DM (*disease causing mutation*): krankheitsursächliche Mutation; DM? (*likely disease causing mutation*): wahrscheinlich krankheitsursächliche Mutation, FP (*functional polymorphism*): *in vitro* oder *in vivo* funktioneller Polymorphismus;

**Fortsetzung der Legende zur Tab. 7:**

DFP (*disease-associated functional polymorphism*): Krankheits-assoziiertes Polymorphismus mit funktionellen Daten; DP (*disease-associated polymorphism*): Krankheitsassoziiertes Polymorphismus. Varianten, welche die gleiche Aminosäure betreffen, sind in Klammern angegeben.

ClinVar (Datenbank zu Genotyp-Phänotyp-Korrelationen) Kriterien zur klinischen Relevanz einer Variante (gemäß den ACMG/AMP Richtlinien zur Interpretation von Varianten): B (*benign*), gutartig; LB (*likely benign*), wahrscheinlich gutartig; VUS (*variant of uncertain significance*), Variante mit unklarer Signifikanz; LP (*likely pathogenic*), wahrscheinlich pathogen; P (*pathogenic*), pathogen. Varianten, welche dieselben Aminosäuren betreffen, sind in Klammern angegeben.

Varianten-Klassifizierung in dieser Studie: PV (*pathogenic variant*), pathogene Variante; LPV (*likely pathogenic variant*), wahrscheinlich pathogene Variante; VUS (*variant of uncertain significance*), Variante mit unklarer Signifikanz; LBV (*likely benign variant*), wahrscheinlich gutartige Variante; pathogene Kriterien wurden als sehr stark (PVS1), stark (PS1-4), moderat (PM1-6) oder unterstützend (PP1-4) gewichtet; gutartige Kriterien gingen als Alleinstellungsmerkmal (BA1), stark (BS1-4) oder unterstützend (BP1-5) in die Bewertung ein.

gnomAD, *Genome Aggregation Database* (v2.1); MAF (*minor allele frequency*), Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung; het/hom/ $\Sigma$ , Anzahl heterozygoter Anlageträger/Anzahl homozygoter Anlageträger/Gesamtanzahl analysierter Allele.

REVEL, (*Rare exomevariant ensemble learner*); M-CAP, (*Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity*); ClinPred (Vorhersageprogramm zur Identifizierung von krankheitsrelevanten nicht-synonymen SNVs); Pathogenität Cut-Offs: REVEL ( $\geq 0,5$ ), M-CAP ( $\geq 0,025$ ), ClinPred ( $\geq 0,5$ ).

HSF, *Human Splicing Finder*; NetGene2, *Neural network predictions* von Spleißstellen; MaxEntScan, Maximale Entropie Kalkulation von kurzen Sequenzmotifen. HCTD (*hereditary connective tissue disorder*), erbliche Erkrankung des Bindegewebes; TAAD, Thorakale(s) Aortenaneurysma und Dissektion; ARUP (*aortic rupture*), Aortenruptur; MFS, Marfan Syndrom; EDS, Ehlers-Danlos Syndrom; VASK, vaskulärer Typ; HMB, Hypermobilität-Typ; KSKL, kyphoskoliotischer Typ; LDS, Loeys-Dietz Syndrom; CCA (*congenital connective arachnodaktylie*), kongenitale kontrakturale Arachnodaktylie; CAAD, Aneurysma und Dissektion der Carotidarterien; AAA, abdominales Aortenaneurysma; IA, intrakraniales Aneurysma; SAH (*subarachnoid hemorrhage*), subarachnoide Blutungen; MVP (*mitral valve prolapse*), Mitralklappenprolaps; BAV (*bicuspid aortic valve*), bikuspidale Aortenklappe; AI, Aorteninsuffizienz.

Familienanamnese: FA pos., positive Familienanamnese; FA neg., negative Familienanamnese; FA n.f., Familienanamnese nicht festgestellt. Im Falle einer positiven Familienanamnese, ist die Verdachts- oder bestätigte Diagnose für den zusätzlichen betroffenen Verwandten in Klammern beschrieben.

Weitere Abkürzungen: d.c. (*discordant classification*), diskordante Klassifizierung; n.v., nicht verzeichnet; n.a., nicht anwendbar; n.f., nicht festgestellt; mod., moderat.

**Fußnoten zur Tab. 7:**

\*, *COL3A1* c.773G>C (p.Gly258Ala) wurde als LP klassifiziert: PM1 (der Aminosäureaustausch betrifft ein Glycin eines Gly-X-Y *collagen-triple-helix* Motivs; die Mehrheit von pathogenen *COL3A1* Varianten sind heterozygote Missense-Varianten, welche ein Glycin in dieser Domäne aus [Gly-X-Y]<sub>343</sub> Wiederholungen betreffen)<sup>306,307</sup>+PM2+PP3+PP4 (der Phänotyp deutet mit hoher Wahrscheinlichkeit auf ein Ehlers-Danlos-Syndrom hin)

†, PS1 wurde dieser Variante zugeordnet, weil die gleiche Missense Variante sowie eine andere Missense-Variante, welche die gleiche Aminosäure betrifft in HGMD als DM verzeichnet sind.

‡, die Gewichtung von PS1 wurde auf moderat herabgesetzt (PS1<sub>moderat</sub>), denn diese Variante ist in HGMD als DM für einen anderen Phänotyp (schwere idiopathische Skoliose im Kindesalter) verzeichnet.<sup>295</sup>

**Fortsetzung der Fußnoten zur Tab. 7:**

§, Variante wurde reklassifiziert, nachdem sie das ACMG Bewertungsschema durchlaufen ist.

¶, in HGMD ist diese Variante als c.3766\_3768delAAG beschrieben, und bezieht sich auf die *MYH11* Isoform 1; die Bezeichnung c.3787\_3789delAAG bezieht sich auf die längste Isoform von *MYH11*, Isoform 2.

¶, *DCHS1* c.590C>T (p.Pro197Leu) wurde als DM in HGMD für autosomal rezessives van Maldergem Syndrom (*MIM* #601390) klassifiziert, was nicht dem Phänotypen von Patient #102 entspricht; daher wurde die Variante als VUS klassifiziert, was jedoch nicht ausschließt, dass die Variante krankheitsrelevant oder -modifizierend ist.

\*\* , LOF ist kein etablierter Pathomechanismus für *FBN2* Varianten; nur eine pathogene Nonsense-Variante wurde bisher für *FBN2* beschrieben.<sup>308</sup> Daher wurde diese Variante als VUS klassifiziert: PVS1<sub>moderat</sub> (äquivalent zu PM2)+PM2+PP4.

††, die Klassifizierung der Variante *COL5A2* c.1618-7G>A bei Patient #166 als VUS wurde durch dessen klinische Manifestation unterstützt (BAV, schwache skeletale Manifestationen und keine Hautanomalien).

‡‡, die Klassifizierung von *FBN2* c.1093A>G (Patient #52) als VUS wurde durch die Differentialdiagnose (CCA) des Patienten unterstützt.

§§, Patient #161 trägt eine PV in *FBN1*. Diese Beobachtung (BP5) untermauert die Klassifizierung der *MYH11* c.2026C>T Variante als VUS mit der Möglichkeit, dass sie krankheitsrelevant/-modifizierend ist; der *FBN1*-Variantenklassifizierung entsprechend wurde bei dem Patienten die Verdachtsdiagnose Marfan Syndrom geäußert.

**Tab. 8: Wahrscheinlich gutartige Varianten, identifiziert in 199 Patienten mit Aortopathien oder verwandten Erkrankungen des Bindegewebes.**

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variante <sub>GEN</sub> )	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b>ELN</b>	<b>misZ=0,07; pLI=0,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:20.000 (0,005%)</b>				
c.1942G>A p.Gly648Arg	n.v./n.v. LBV <sub>BP1+BP4</sub>	0,0003976% (1/0/251488)	0,217/0,780/0,440	n.f.	#184	HCTD, MVP FA pos. (HCTD)
<b>FBN1</b>	<b>misZ=5,45; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:7.500 (0,013%)</b>				
c.6852T>C p.=	n.v./VUS <sup>d.c.</sup> LBV <sub>BS2+BP7</sub>	0,004598% (13/0/282706)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#5 (+VUS <sub>COL5A2</sub> )	TAAD FA n.f.
<b>MYLK</b>	<b>misZ=1,34; pLI=0,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>				
c.3639G>A p.=	n.v./LB LBV <sub>BS2+BP7</sub>	0,02460% (64/0/260186)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#30	TAAD, MVP FA neg.
<b>NOTCH1</b>	<b>misZ=3,95; pLI=1,00</b>	<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:500 (0,2%)</b>				
c.186G>C p.=	n.v./B-LB LBV <sub>BS2+BP7</sub>	0,05798% (130/2/224234)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#103 (+VUS <sub>COL3A1</sub> , +VUS <sub>NOTCH1</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD)

Für jedes Gen sind der misZ (Score für Missense-Varianten; Intoleranz gegenüber Variation) und der pLI Score der gnomAD Metriken (v.2.1) sowie die Prävalenz der jeweils häufigsten mit dem Gen assoziierten Erkrankung angegeben. Für jede Variante ist die Position in der cDNA und die Position der betroffenen Aminosäure in der Proteinsequenz gegeben. Die Annotation der Varianten beginnt mit +1 für das A des ATG-Translations-Initiations-Codons. Das Initiationscodon ist Codon 1. Einhergehende Varianten sind in der Spalte „Patient“ hinter der Patientenummer in Klammern angegeben.

ClinVar (Datenbank zu Genotyp-Phänotyp-Korrelationen) Kriterien zur klinischen Relevanz einer Variante (gemäß den ACMG/AMP Richtlinien zur Interpretation von Varianten): B (*benign*), gutartig; LB (*likely benign*), wahrscheinlich gutartig; VUS (*variant of uncertain significance*).

Varianten-Klassifizierung in dieser Studie: LBV (*likely benign variant*), wahrscheinlich gutartige Variante; pathogene Kriterien wurden als sehr stark (PVS1), stark (PS1-4), moderat (PM1-6) oder unterstützend (PP1-4) gewichtet; gutartige Kriterien gingen als Alleinstellungsmerkmal (BA1), stark (BS1-4) oder unterstützend (BP1-5) in die Bewertung ein.

gnomAD, *Genome Aggregation Database* (v2.1); MAF (*minor allele frequency*), Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung; het/hom/ $\Sigma$ , Anzahl heterozygoter Anlageträger/Anzahl homozygoter Anlageträger/Gesamtanzahl analysierter Allele.

REVEL, (*Rare exomevariant ensemble learner*); M-CAP, (*Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity*); ClinPred (Vorhersageprogramm zur Identifizierung von krankheitsrelevanten nicht-synonymen SNVs); Pathogenität Cut-Offs: REVEL ( $\geq 0,5$ ), M-CAP ( $\geq 0,025$ ), ClinPred ( $\geq 0,5$ ).

HSF, *Human Splicing Finder*; NetGene2, *Neural network predictions* von Spleißstellen; MaxEntScan, Maximale Entropie Kalkulation von kurzen Sequenzmotifen.

**Fortsetzung der Legende zur Tab. 8:**

HCTD (*hereditary connective tissue disorder*), erbliche Erkrankung des Bindegewebes; TAAD, Thorakale(s) Aortenaneurysma und Dissektion; ARUP (*aortic rupture*), Aortenruptur; MVP (*mitral valve prolapse*), Mitralklappenprolaps.

Familienanamnese: FA pos., positive Familienanamnese; FA neg., negative Familienanamnese; FA n.f., Familienanamnese nicht festgestellt. Im Falle einer positiven Familienanamnese, ist die Verdachts- oder bestätigte Diagnose für den zusätzlichen betroffenen Verwandten in Klammern beschrieben.

Weitere Abkürzungen: d.c. (*discordant classification*), diskordante Klassifizierung; n.v., nicht verzeichnet; n.a., nicht anwendbar; n.f., nicht festgestellt; mod., moderat.

Tab. 9: Varianten mit diskordanter Klassifizierung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variante <sub>GEN</sub> )	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b><i>DCHS1</i></b>						
<b>misZ=2,62; pLI=1,00</b>						
<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:40 (2,5%)</b>						
c.590C>T	DM <sup>d.c.</sup> /n.v.	0,05423%				
p.Pro197Leu	VUS <sub>PM1+PM2+BP4</sub> <sup>¶</sup>	(153/0/282142)	0,129/0,029/0,054	n.f.	#102	HCTD FA neg.
<b><i>FBN1</i></b>						
<b>misZ=5,45; pLI=1,00</b>						
<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:7.500 (0,013%)</b>						
c.718C>T	DM <sup>d.c.</sup> , DM(p.Arg240His/P <sup>d.c.</sup>	0				
p.Arg240Cys	LPV <sub>PS1+PM2+PP2+PP3+PP4</sub>		0,829/0,293/0,998	n.f.	#141	MFS FA n.f.
c.3712G>A	DM <sup>?d.c.</sup> , DM(p.Asp1238Gly)/P	0				
p.Asp1238Asn	PV <sub>PS1+PM1+PM2+PP2+PP3+PP4</sub>		0,895/0,686/0,997	n.f.	#122	HCTD, MFS FA pos. (HCTD)
c.3937G>A	DM <sup>d.c.</sup> /n.v.	0,0003981%				
p.Gly1313Ser	LPV <sub>PS1mod.+PM1+PP2+PP3</sub> <sup>‡</sup>	(1/0/251176)	0,827/0,719/0,780	n.f.	#127 (+LPV <sub>FBN1</sub> )	TAAD FA neg.
c.5495G>A	DM(p.Arg1832Pro)/VUS <sup>d.c.</sup>	0,003185%				
p.Arg1832His	LPV <sub>PM1+PM5+PP2+PP3</sub>	(1/0/31398)	0,793/0,387/0,996	n.f.	#127 (+LPV <sub>FBN1</sub> )	TAAD FA neg.
c.6386A>G	DM(p.Asp2129Val)/VUS <sup>d.c.</sup>	0				
p.Asp2129Gly	LPV <sub>PM1+PM2+PM5+PP2+PP3+PP4</sub>		0,857/0,624/0,930	n.f.	#99	MFS FA pos. (MFS)
c.6852T>C	n.v./VUS <sup>d.c.</sup>	0,004598%				
p.=	LBV <sub>BS2+BP7</sub>	(13/0/282706)	n.a./n.a./n.a.	kein	#5 (+VUS <sub>COL5A2</sub> )	TAAD FA n.f.
c.7754T>C	DM <sup>d.c.</sup> /P-LP	0,001594%				
p.Ile2585Thr	LPV <sub>PS1+PM1+PP2+PP3</sub>	(4/0/250918)	0,642/0,040/0,383	n.f.	#119	TAAD, MFS FA neg.
<b><i>FBN2</i></b>						
<b>misZ=1,99; pLI=1,00</b>						
<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:20.000 (0,005%)</b>						
c.1610A>G	n.v./n.v.	0,0007103%				
p.Asp537Gly	LPV <sub>PM1+PP1mod.+PP3+PP4</sub> <sup>§</sup>	(2/0/281554)	0,917/0,249/0,995	n.f.	#151 (+VUS <sub>COL3A1</sub> )	HCTD, CCA FA pos. (HCTD, MFS)
c.2363G>A	n.v./LB <sup>d.c.</sup>	0,003583%				
p.Arg788His	VUS <sub>PM1+PP3</sub>	(9/0/251178)	0,594/0,128/0,378	n.f.	#188 (+LPV <sub>LOX</sub> )	TAAD FA neg.
c.7137T>G	n.v./LB <sup>d.c.</sup>	0,004384%				
p.=	VUS <sub>BP7</sub>	(11/0/250884)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#46 (+VUS <sub>ADAMTS10</sub> )	HCTD FA pos. <sup>203</sup>
<b><i>FLNA</i></b>						
<b>misZ=3,84; pLI=1,00</b>						
<b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung unbekannt</b>						
c.3915G>A (hemizyg.)	n.v./B-LB <sup>d.c.</sup>	0,04147%				
p.=	VUS <sub>PM2+BP7</sub>	(84/0/34/202550)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#40	TAAD, MFS FA pos. (TAAD)

Tab. 9: Fortsetzung

c. Annotation p. Annotation	Klassifizierung: HGMD/ClinVar ACMG	gnomAD MAF (het/hom/ $\Sigma$ )	Pathogenitäts- Scores: REVEL/ M-CAP/ ClinPred	Spleiß- auswirkungen (Vorhersage- programm)	Patient (Einhergehende Variante <sub>GEN</sub> )	Initiale und Differential- diagnose; Familien- anamnese (FA)
<b><i>GATA5</i></b> <b>misZ=1,34; pLI=0,67</b> <b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:100 (1%)</b>						
c.1159C>T p.Arg387Cys	DM <sup>d.c.</sup> /VUS VUS <sub>PP3</sub>	0,01476% (41/0/277724)	0,727/0,771/0,946	n.f.	#197	TAAD FA pos. (TAAD)
<b><i>LOX</i></b> <b>misZ=0,81; pLI=0,99</b> <b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>						
c.125G>A p.Trp42*	DM <sup>d.c.</sup> /p <sup>d.c.</sup> LPV <sub>PVS1strong+PM2§</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#188 (+VUS <sub>FBN2</sub> )	TAAD FA neg.
<b><i>MYH11</i></b> <b>misZ=1,54; pLI=0,88</b> <b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>						
c.654+10T>C n.a.	n.v./B-LB <sup>d.c.</sup> VUS <sub>BP4</sub>	0,03958% (111/1/280416)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#29	TAAD FA pos. (TAAD)
c.3787_3789delAAG p.Lys1263del <sup>ll</sup>	DM <sup>d.c.</sup> /VUS <sup>d.c.</sup> LPV <sub>PS4+PM4</sub>	0,004607% (13/0/282182)	n.a./n.a./n.a.	n.f.	#97 (+VUS <sub>MYLK</sub> ) #117	TAAD FA pos. (TAAD) TAAD FA pos. (TAAD)
<b><i>NOTCH1</i></b> <b>misZ=3,95; pLI=1,00</b> <b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:500 (0,2%)</b>						
c.6083-4G>A n.a.	n.v./LB <sup>d.c.</sup> VUS <sub>BP4</sub>	0,004638% (13/0/280312)	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#103 (+VUS <sub>COL3A1</sub> , +LBV <sub>NOTCH1</sub> )	TAAD FA pos. (TAAD)
<b><i>SMAD3</i></b> <b>misZ=3,47; pLI=0,84</b> <b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:1.000 (0,1%)</b>						
c.803G>A p.Arg268His	DM <sup>d.c.</sup> , DM(p.Arg268Leu)/VUS <sup>d.c.</sup> PV <sub>PS4+PM1+PM2+PP2+PP3</sub>	0	0,987/0,631/1,000	n.f.	#156	TAAD, MFS, LDS FA pos. (TAAD)
c.1091A>G p.Tyr364Cys	DM <sup>d.c.</sup> /VUS <sup>d.c.</sup> LPV <sub>PS1+PM1+PM2+PP2</sub>	0	0,900/0,429/0,997	n.f.	#135	TAAD FA n.f.
<b><i>TGFBR1</i></b> <b>misZ=2,90; pLI=0,83</b> <b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:40.000 (0,0025%)</b>						
c.1387-4G>C n.a.	DM <sup>d.c.</sup> /n.v. VUS <sub>PM2+BP4</sub>	0	n.a./n.a./n.a.	kein Einfluss	#166 (+VUS <sub>COL5A2</sub> )	LDS, BAV FA neg.
c.1457T>C p.Leu486Ser	DM <sup>d.c.</sup> /n.v. LPV <sub>PM1+PM2+PP2+PP3</sub>	0	0,815/0,149/0,995	n.f.	#71	TAAD FA n.f.
<b><i>TGFBR2</i></b> <b>misZ=2,39; pLI=0,15</b> <b>Prävalenz der assoziierten Erkrankung 1:40.000 (0,0025%)</b>						
c.1639G>A p.Asp547Asn	n.v./P <sup>d.c.</sup> LPV <sub>PM1+PM2+PP2+PP3</sub>	0	0,463/0,069/0,999	n.f.	#138 (+VUS <sub>DCHS1</sub> )	TAAD FA neg.

**Legende zur Tab. 9:**

Für jedes Gen sind der misZ (Score für Missense-Varianten; Intoleranz gegenüber Variation) und der pLI Score der gnomAD Metriken (v.2.1) sowie die Prävalenz der jeweils häufigsten mit dem Gen assoziierten Erkrankung angegeben. Für jede Variante ist die Position in der cDNA und die Position der betroffenen Aminosäure in der Proteinsequenz gegeben. Die Annotation der Varianten beginnt mit +1 für das A des ATG-Translations-Initiations-Codons. Das Initiationscodon ist Codon 1. Einhergehende Varianten sind in der Spalte „Patient“ hinter der Patientenummer in Klammern angegeben.

HGMD (*Human Gene Mutation Database*) Varianten Kategorien: DM (*disease causing mutation*): krankheitsursächliche Mutation; DM? (*likely disease causing mutation*): wahrscheinlich krankheitsursächliche Mutation, FP (*functional polymorphism*): *in vitro* oder *in vivo* funktioneller Polymorphismus; DFP (*disease-associated functional polymorphism*): Krankheits-assoziiertes Polymorphismus mit funktionellen Daten; DP (*disease-associated polymorphism*): Krankheitsassoziiertes Polymorphismus. Varianten, welche die gleiche Aminosäure betreffen, sind in Klammern angegeben.

ClinVar (Datenbank zu Genotyp-Phänotyp-Korrelationen) Kriterien zur klinischen Relevanz einer Variante (gemäß den ACMG/AMP Richtlinien zur Interpretation von Varianten): B (*benign*), gutartig; LB (*likely benign*), wahrscheinlich gutartig; VUS (*variant of uncertain significance*), Variante mit unklarer Signifikanz; LP (*likely pathogenic*), wahrscheinlich pathogen; P (*pathogenic*), pathogen. Varianten, welche dieselben Aminosäuren betreffen, sind in Klammern angegeben.

Varianten-Klassifizierung in dieser Studie: PV (*pathogenic variant*), pathogene Variante; LPV (*likely pathogenic variant*), wahrscheinlich pathogene Variante; VUS (*variant of uncertain significance*), Variante mit unklarer Signifikanz; LBV (*likely benign variant*), wahrscheinlich gutartige Variante; pathogene Kriterien wurden als sehr stark (PVS1), stark (PS1-4), moderat (PM1-6) oder unterstützend (PP1-4) gewichtet; gutartige Kriterien gingen als Alleinstellungsmerkmal (BA1), stark (BS1-4) oder unterstützend (BP1-5) in die Bewertung ein.

gnomAD, *Genome Aggregation Database* (v2.1); MAF (*minor allele frequency*), Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung; het/hom/ $\Sigma$ , Anzahl heterozygoter Anlageträger/Anzahl homozygoter Anlageträger/Gesamtanzahl analysierter Allele.

REVEL, (*Rare exomevariant ensemble learner*); M-CAP, (*Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity*); ClinPred (Vorhersageprogramm zur Identifizierung von krankheitsrelevanten nicht-synonymen SNVs); Pathogenität Cut-Offs: REVEL ( $\geq 0,5$ ), M-CAP ( $\geq 0,025$ ), ClinPred ( $\geq 0,5$ ).

HSF, *Human Splicing Finder*; NetGene2, *Neural network predictions* von Spleißstellen; MaxEntScan, Maximale Entropie Kalkulation von kurzen Sequenzmotifen. HCTD (*hereditary connective tissue disorder*), erbliche Erkrankung des Bindegewebes; TAAD, Thorakale(s) Aortenaneurysma und Dissektion; MFS, Marfan Syndrom; LDS, Loeys-Dietz Syndrom; CCA (*congenital connective arachnodaktylie*), kongenitale kontrakturale Arachnodaktylie; BAV (*bicuspid aortic valve*), bikuspidale Aortenklappe.

Familienanamnese: FA pos., positive Familienanamnese; FA neg., negative Familienanamnese; FA n.f., Familienanamnese nicht festgestellt. Im Falle einer positiven Familienanamnese, ist die Verdachts- oder bestätigte Diagnose für den zusätzlichen betroffenen Verwandten in Klammern beschrieben.

Weitere Abkürzungen: d.c. (*discordant classification*), diskordante Klassifizierung; n.v., nicht verzeichnet; n.a., nicht anwendbar; n.f., nicht festgestellt; mod., moderat

**Fußnoten zur Tab. 9:**

‡, die Gewichtung von PS1 wurde auf moderat herabgesetzt (PS1<sub>moderat</sub>), denn die Variante ist in HGMD als DM mit einem anderen Phänotyp assoziiert (d. h. schwere idiopathische Skoliose im Kindesalter).<sup>295</sup>

§, die Variante wurde reklassifiziert, nachdem sie das ACMG Bewertungsschema durchlaufen ist.

**Fortsetzung der Fußnoten zur Tab. 9:**

¶, in HGMD ist die Variante c.3766\_3768delAAG beschrieben. Diese c.Annotation korrespondiert mit der *MYH11* Isoform 1; die Variante c.3787\_3789delAAG korrespondiert mit der längsten Isoform von *MYH11* (Isoform 2)

¶, DCHS1 c.590C>T (p.Pro197Leu) wurde als DM in HGMD für autosomal rezessives van Maldergem Syndrom (*MIM* #601390) klassifiziert, was nicht dem Phänotypen von Patient #102 entspricht; daher wurde die Variante als VUS klassifiziert, was jedoch nicht ausschließt, dass die Variante krankheitsrelevant oder -modifizierend ist.

**Tab. 10: Zusammenfassung berichtenswerter Varianten in 32 HCTD Genen.**

Berichtenswerte Variante	Anzahl Patienten		
	tNGS	ES	tNGS/ES
min. 1 PV	11	4	15 (7.54%)
1 PV + 2 VUS	1	0	1
1 PV + 1 VUS	1	2	3
1 PV	9	2	11
min. 1 LPV	18	1	19 (9.55%)
2 LPV + 2 VUS	1	0	1
2 LPV	1	0	1
1 LPV + 1 VUS	4	1	5
1 LPV	12	0	12
min. 1 VUS	31	14	47 (23.6%)
2 VUS	11	3	14
1 VUS	22	11	33
keine Variante/ 1 LBV	92	28	118 (59.3%)
1 LBV	1	1	2
keine Variante	89	27	116
gesamt	152 (76.4%)	47 (23.6%)	199 (100%)

152 Patienten wurden mittels NGS-Gen-Panel und 47 Patienten mittels ES analysiert. Insgesamt hatten 15 Patienten eine PV, vier von ihnen hatten mindestens eine zusätzliche VUS. Bei 19 Patienten wurde mindestens eine LPV detektiert. Ein Patient wies zwei LPV und zwei VUS auf. Ein weiterer Patient hatte zwei LPVs und 5 Patienten trugen neben einer LPV eine zusätzliche VUS. 47 Patienten wiesen mindestens eine VUS auf. Bei 14 von ihnen wurden zwei VUS identifiziert. tNGS, zielgerichtete (*targeted*) NGS (*next-generation sequencing*) Gen-Panel-Analyse; ES, Exom-Sequenzierung. Prozentzahlen sind in Klammern angegeben.

Tab. 11: Mittels ES-Analyse eruierte Kandidatengene

Gen c.Annotation p.Annotation	Position der betroffenen Aminosäure (UniProt/pfam)	gnomAD- Metriken	Phänotypen von Knockout- Modellorganismen (MGI/ZFIN) <sup>188,202</sup>	assoziierte Erkrankungen beim Menschen (OMIM Eintragsnummer)	Proteinfunktionen und Beteiligung in bekannten Signalwegen
<i>MACROD1</i> c.673C>T p.His225Tyr	Macro-Domäne (PF01661)	misZ=0,96 pLI=0,57	n.b.	n.b.	ADP-Ribose Glykohydrolase <sup>211,309</sup>
<i>NUP210</i> c.3673C>T p.Arg1225Trp	Big-2 Domäne (PF02368)	misZ=0,95 pLI=0,00	<i>MGI</i> : Beeinträchtigung der T-Zell Entwicklung <i>ZFIN</i> : abnormale Struktur der Skelettmuskeln, Herzödeme	n.b.	Nukleusporen- Membran-Glykoprotein 210; Zellviabilität <sup>310</sup>
<i>F2RL2</i> c.1062T>A p.Asp354Glu	7-Transmembran Domäne (PF00001)	misZ=0,44 pLI=0,00	<i>MGI</i> : Beeinträchtigung der Thrombin- Antwort in Blutplättchen	n.b.	G-Protein gekoppelter Rezeptor; Rezeptor für Thrombin in glatten Muskelzellen <sup>311</sup>
<i>UBE2R2</i> c.713C>T p.Ser238Leu	Asp-/Glu-rich (PF00179)	misZ=2,85 pLI=0,98	n.b.	n.b.	Ubiquitylierung von Proteinen <sup>312</sup>
<i>CDKLI</i> c.430T>C p.Cys144Arg	Kinase-Domäne (PF00069)	misZ=0,90 pLI=0,00	<i>ZFIN</i> : Augenanomalien, abnormer Achsenformation, Gehirnfehlbildungen	n.b.	Proteinsequenz von CDKL1 ist homolog zu GSK3A/B, welche an der Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 im TGFβ- Signalweg beteiligt sind <sup>219,220</sup>
<i>MYO9A</i> c.3955C>T p.Arg1319Trp		misZ=1,97 pLI=0,91	<i>MGI</i> : Hydrozephalie	Myasthenia Syndrom (# 618198)	Unkonventionelles Myosin; Migration von Epithelzellen <sup>313</sup>

Tab. 11: Fortsetzung

Gen c.Annotation p.Annotation	Position der betroffenen Aminosäure (UniProt/pfam)	gnomAD-Metriken	Phänotypen von Knockout-Modellorganismen (MGI/ZFIN) <sup>188,202</sup>	assoziierte Erkrankungen beim Menschen (OMIM Eintragsnummer)	Proteinfunktionen und Beteiligung in bekannten Signalwegen
<i>MYBPC3</i> c.1568G>A p.Gly490Arg	Ig-1-Set Domäne (PF07679)	misZ=1,74 pLI=0,00	<i>MGI</i> : Kardiale Hyperthrophie, Kardiomyopathie, Anomalien der Herzmuskelkontraktion und -relaxation	Dilatierte Kardiomyopathie (# 615396); Hypertrophe Kardiomyopathie (# 115197); <i>Non-Compaction</i> Kardiomyopathie (# 615396)	Myosinbindeprotein in der gestreiften Muskulatur <sup>314</sup>
<i>FLNC</i> c.448G>A p.Asp150Asn		misZ=2,68 pLI=1,00	<i>MGI</i> : Neonatale Sterblichkeit, Fehlbildungen des respiratorischen Systems, reduzierte Masse an Skelettmuskeln, Anomalien der Skelettmuskulatur	Kardiomyopathie, familiär (# 617047); Myopathie, distal (# 614065); Myopathie, myofibrillär (# 609524)	muskelspezifisches Filamin; Bindung an Aktin <sup>315</sup>
<i>ILKAP</i> c.1016A>T p.Asn339Ile	PPM-Typ Phosphatase (PF00481)	misZ=2,24 pLI=0,98	<i>MGI</i> : verbesserte Koordination der Motorneuronen, erhöhtes Cholesterin-Level bei männlichen Mäusen	n.b.	Protein Phosphatase; Aufrechterhaltung von Zelladhäsionen; Regulation von GSK3B-abhängigen Signalwegen <sup>227</sup>
<i>MYLK3</i> c.211C>T p.Arg71Trp		misZ=0,55 pLI=0,00	<i>MGI</i> : Hypertrophie des Herzmuskels, beeinträchtigte Herzfunktion <i>ZFIN</i> : Anomalien des Herzens	n.b.	Kinase; <i>MYLK3</i> zeigt Homologien zu <i>MYLK</i> , welches ein Krankheitsgen für TAAD (MIM #613780) ist

Tab. 11: Fortsetzung

Gen c.Annotation p.Annotation	Position der betroffenen Aminosäure (UniProt/pfam)	gnomAD- Metriken	Phänotypen von Knockout- Modellorganismen (MGI/ZFIN) <sup>188,202</sup>	assoziierte Erkrankungen beim Menschen (OMIM Eintragsnummer)	Proteinfunktionen und Beteiligung in bekannten Signalwegen
<i>IGFN1</i> c.867G>C p.Gln289His		misZ=0,66 pLI=0,00	n.b.	n.b.	Bindet an eEF1A (Translations- Elongationsfaktor 1A in Eukaryoten) <sup>316</sup>
<i>FAM83G</i> c.1939C>T p.Arg647Trp		misZ=1,44 pLI=0,00	n.b.	n.b.	assoziiert mit SMAD1, putative Rolle bei dem BMP ( <i>bone morphogenic proteins</i> )- Signalweg <sup>317</sup>
<i>SMIM8</i> c.232_233delTA p.Tyr78fs*1		misZ=0,25 pLI=0,01	n.b.	n.b.	<i>Small integral membrane protein 8</i>
<i>TBC1D8</i> c.1733C>T p.Thr578Met	Rab-GAP TBC Domäne (PF00566)	misZ=1,44 pLI=0,00	n.b.	n.b.	GTPase-aktivierendes Protein für Rab- Proteine <sup>318</sup>
<i>KIAA1217</i> c.4348C>G p.Pro1450Ala		misZ=0,43 pLI=0,00	<i>MGI</i> : Fehlbildungen des Notochords, abnormale Bandscheiben, Knickschwänze	n.b.	putative Rolle bei der Entwicklung von Bandscheiben <sup>319</sup>
<i>TCF7</i> c.400G>C p.Asp134His		misZ=0,56 pLI=0,03	<i>MGI</i> : Fehlregulation der T-Zell Entwicklung	n.b.	TCF-Proteine sind Aktivatoren der Transkription; Differenzierung von T- Lymphozyten <sup>320</sup>
<i>SHROOM1</i> c.253C>T p.Pro85Ser		misZ=0,96 pLI=0,04	n.b.	n.b.	Rolle bei der Regulation des Aktin- Myosin- Zytosketts <sup>233-235</sup>

Tab. 11: Fortsetzung

Gen c.Annotation p.Annotation	Position der betroffenen Aminosäure (UniProt/pfam)	gnomAD- Metriken	Phänotypen von Knockout- Modellorganismen (MGI/ZFIN) <sup>188,202</sup>	assoziierte Erkrankungen beim Menschen (OMIM Eintragsnummer)	Proteinfunktionen und Beteiligung in bekannten Signalwegen
<i>MYH6</i> c.2383C>T p.Arg795Trp	IQ-Domäne (PRU00116)	misZ=0,96 pLI=0,00	<i>MGI</i> : Herzfehler, Fibrose	Atriumseptumdefekt (# 614089); Kardiomyopathie, dilatiert (# 613252); Kardiomyopathie, hypertroph (# 613251); Sick Sinus Syndrom (# 614090)	Myosin
<i>SLIT3</i> c.4021G>A p.Gly1341Ser	EGF-like7 (PF00008)	misZ=2,19 pLI=0,79	<i>MGI</i> : angeborene Zwerchfellhernie (CDH), Nierendefekte, vergrößerter rechter Herzventrikel	n.b.	Putative Rolle bei der Angiogenese; Ligand von ROBO-Rezeptoren <sup>245,246</sup>
<i>WDR17</i> c.1420C>T p.Arg474*	6 WD-repeats (7- 12) (PF00400) fehlen	misZ=0,69 pLI=0,00	n.b.	n.b.	Putative Rolle bei der Entwicklung der Retina <sup>321</sup>
<i>ITPR3</i> c.2274C>A p.Asp758Glu		misZ=4,66 pLI=0,00	<i>MGI</i> : Haarverlust	Neigung zu Diabetes Typ 1 (# 222100)	Rezeptor für Inositol 1,4,5-Trisphosphat <sup>322</sup>
<i>KIAA0408</i> c.824G>A p.Arg275Gln		misZ=0,16 pLI=0,00	n.b.	n.b.	
<i>RNPS1</i> c.878G>A p.Arg293His	Interaktion mit TRA2B	misZ=1,18 pLI=0,98	n.b.	n.b.	RNA-Bindeprotein; Teil des Multiprotein mRNP Komplexes <sup>323</sup>

Tab. 11: Fortsetzung

<b>Gen c.Annotation p.Annotation</b>	<b>Position der betroffenen Aminosäure (UniProt/pfam)</b>	<b>gnomAD- Metriken</b>	<b>Phänotypen von Knockout- Modellorganismen (MGI/ZFIN)<sup>188,202</sup></b>	<b>assoziierte Erkrankungen beim Menschen (OMIM Eintragsnummer)</b>	<b>Proteinfunktionen und Beteiligung in bekannten Signalwegen</b>
VAV3 c.307C>G p.Arg103Gly	Calponin- Homologie Domäne (PF11971)	misZ=1,24 pLI=0,00	<i>MGI</i> : Tachykardie, arterielle Hypertonie, Kardiovaskuläre Remodellierung, Hyperaktivität sympathischer Nerven, hohes Katecholamin-Level, erhöhtes Level von Nieren-assoziierten Hormonen	n.b.	Guanin-Nukleotid- Austausch-Faktor Angiogenese <sup>324</sup>
AGAP6 c.1549C>T p.Arg517*	Arf-GAP Domäne (PF01412)	misZ=-1,02 pLI=0,00	n.b.	n.b.	
LBP c.1237G>T p.Glu413*		misZ=-0,08 pLI=0,00	<i>MGI</i> : erhöhte Sensitivität gegenüber Infektionen durch Gram-negative Bakterien	n.b.	bindet Lipopolysaccharide; Rolle bei der angeborenen Immunantwort <sup>325</sup>
SLC13A4 c.1613C>T p.Thr538Met		misZ=2,08 pLI=0,82	<i>MGI</i> : Mäuse warden lethal geboren, fehlerhafte Verknöcherung, beeinträchtigte Entwicklung von Blutgefäßen, Blutungen, Lippen- Kiefer-Gaumenspalte	n.b.	Natrium/Sulfat Kotransporter; Sulfat Reabsorption in postkapillären Venolen <sup>326</sup>
GATA5 c.1159C>T p.Arg387Cys		misZ=1,34 pLI=0,67	<i>ZFIN</i> : Anomalien des Herzens	Kongenitale Herzfehler (# 617912)	Transkriptionsfaktor bei der Kardiovaskulären Entwicklung <sup>139,207,208</sup>

Tab. 11: Fortsetzung

Gen c.Annotation p.Annotation	Position der betroffenen Aminosäure (UniProt/pfam)	gnomAD- Metriken	Phänotypen von Knockout- Modellorganismen (MGI/ZFIN) <sup>188,202</sup>	assoziierte Erkrankungen beim Menschen (OMIM Eintragsnummer)	Proteinfunktionen und ggf. Beteiligung in bekannten Signalwegen
<i>ITGA1</i> c.1895T>G p.Phe632Cys	FG-GAP 7 (PF01839)	misZ=1,06 pLI=0,00	<i>MGI</i> : Nieren sind kleiner und neigen zu Verletzungen	n.b.	Rezeptor für Laminin und Kollagen; Regulation des EGF- stimulierten Zellwachstums <sup>327</sup>

Mittels ES-Analyse von 8 Familien mit einer erblichen Aortopathie identifizierte Kandidatengene und ihrer Genprodukte. Zur Priorisierung der Kandidatengene wurden folgende Bewertungskriterien angewendet: (i) die Position und funktionelle Wichtigkeit der von der Sequenzveränderung betroffenen Aminosäure(n), (ii) die Toleranz/Intoleranz eines Gens gegenüber genetischer Variation, (iii) Phänotypen von Knockout-Modellorganismen, (iv) in OMIM verzeichnete mit dem jeweiligen Gen assoziierte humane Erkrankungen und (v) die Funktion des Genproduktes und ggf. die Rolle in bekannten Signalwegen.

Für jede Variante ist die Position in der cDNA und die Position der betroffenen Aminosäure(n) in der Proteinsequenz aufgeführt. Die Annotation der Varianten beginnt mit +1 für das A des ATG-Translations-Initiations-Codons. Das Initiationscodon ist Codon 1.

Informationen zu Protein-Domänen und Motiven wurden aus den Datenbanken UniProt (Universal Protein Resource; <http://www.uniprot.org/>) und pfam (<http://pfam.xfam.org/>) bezogen.

gnomAD: Genome Aggregation Database (v.2.1); misZ: Z-Score für Missense-Varianten (Intoleranz gegenüber Variation); pLI (Intoleranz gegenüber *loss-of-function* Mutationen).

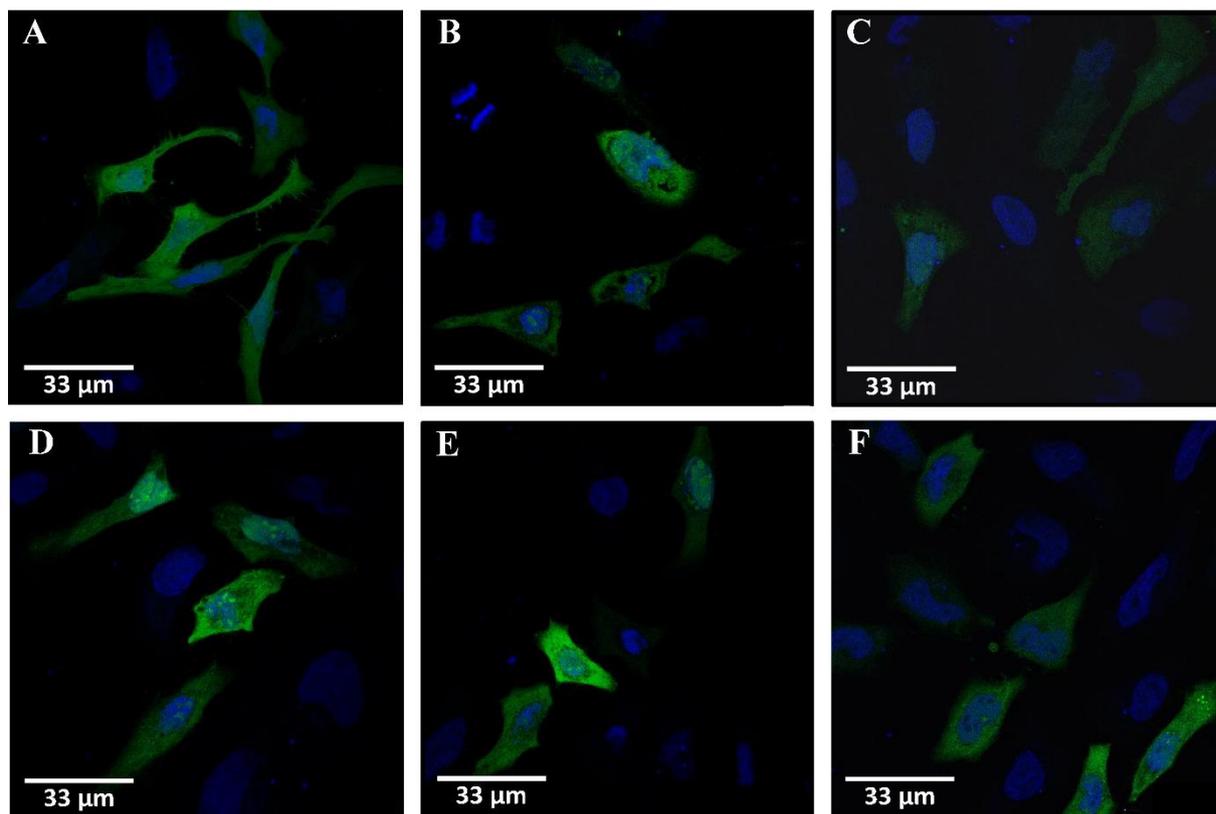
MGI: Datenbank zu Knockdown- und Mutationsanalysen von Genen in Mäusen (*Mouse Genome Informatics*)<sup>202</sup>; ZFIN: Datenbank zu Knockdown- und Mutationsanalysen von Genen in Zebrafischblümlingen (*The Zebrafish Information Network*).<sup>188</sup>

OMIM: Online-Katalog zu humanen Genen und genetischen Erkrankungen beim Menschen (*Online Mendelian Inheritance in Man*®), OMIM Nummern für genetische Erkrankung sind angegeben. n.b., nicht beschrieben.

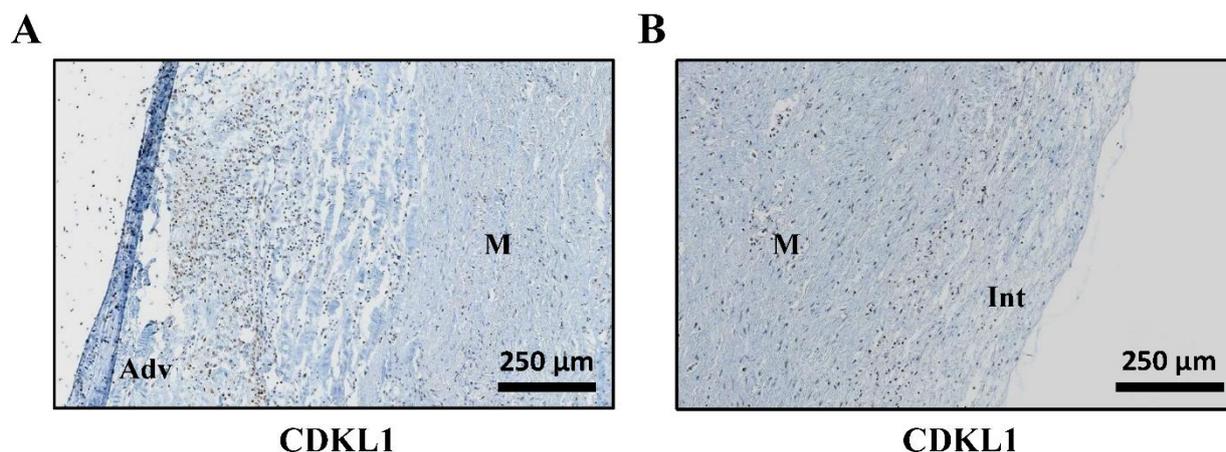
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	-----		
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	1	MSGGGPSGGPGGSGRARTSSFAEPGGGGGGGGGGPGGASGPGGTGGGK	50
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	1	MSG-----RPRRTTSFAES-----CKPVQQPSAFGSMK	27
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	-----		
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	51	ASVIGAMGGGVGASSSSGGGPGGSGGGGSGGPGAGTSFPPPGVKLGRDSSGKV	100
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	28	VSR-----DKDGSKV	37
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	1	-----MMEKYEKIGKIGEGSYGVVFKCRNRDTGQIVAIKKF	36
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	101	TTVVATLGQGPERSQEVAYTDIKVIGNGSFGVVYQARLAETRELVAIKKV	150
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	38	TTVVATPGQGPDRPQEVSYTDTKVIGNGSFGVVYQAKLSDSGELVAIKKV	87
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	37	LES EDDPVIKKIALREIRMLKQLKHPNLVNLLEVFRKRKRR-----LHLY	80
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	151	LQD-----KRFKNRELQIMRKL DHCNIVRLRYFFYS SGEKKDELVLNLV	194
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	88	LQD-----KRFKNRELQIMRKL DHCNIVRLRYFFYS SGEKKDEVYLNLV	131
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	81	FEYCDHTV LHELDYRQGR--VPEHLVKSITWQTLQAVNFCHKHNCIHRD	127
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	195	LEYVPE TVYRVARHFTKAKLTIPI LYVKVYMYQLFRSLAYIHSQGVCHR	244
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	132	LDYVPE TVYRVARHYSRAKQTLPI YVKLYMYQLFRSLAYIHSFGICHR	181
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	128	VKPENILIT-KHSVIKLCDFGFARLLAGPSDYYTDYVATRWYRSPPELLV	176
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	245	IKPQNLLVDPDTAVLKLCDFGSAKQLVR-GEPNVS YICSRYYRAPELIFG	293
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	182	IKPQNLLLDPDTAVLKLCDFGSAKQLVR-GEPNVS YICSRYYRAPELIFG	230
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	177	DTQYGPPVDVWAI GCVFAELLSGVPLWPGKSDVDQLYLIRKTLGDLIPRH	226
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	294	ATDYTSSIDVWSAGCVLAELLGQPIFPGDSGVDQLVEIIKVLG--TPTR	341
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	231	ATDYTSSIDVWSAGCVLAELLGQPIFPGDSGVDQLVEIIKVLG--TPTR	278
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	227	QQVFSTNQYFSGVKIPDPEDMEPELKF PNISYPALGLLKGCLHMDPTQR	276
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	342	EQIREMNP NYTEFKFPQIKAHPWTKVFKSRTPPEAIALCSLLE YTPSSR	391
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	279	EQIREMNP NYTEFKFPQIKAHPWTKVFRPRTPEAIALCSRLLE YTPSTAR	328
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	277	LTCEQLLHHPYFENIREIEDLAKEHNKPTRKTLRKS RKHHCFTETS KLQY	326
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	392	LSPLEACAHSFFDELRC LGTQLPNNRPLPPLFNFSAGELSIQPSLNAILI	441
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	329	LTPLEACAHSFFDEL RDPNVKLPNGRDTPALFNFTTQELSSNPPLATILI	378
<i>CDKL1_HUMAN/I</i>	327	LPQLTGSSILPALDNKKYYCDTKKLN YRFPNI-----	358
<i>GSK3A_HUMAN/I</i>	442	PPHLRSPAGTTTLTPSSQAL TETPTSSDWQSDATPTLTNSS	483
<i>GSK3B_HUMAN/I</i>	379	PPHARIQAAS TPTNATAASDANTGDRGQTNNASASASNST	420

Sequenzhomologie   $\geq 80\%$    $\geq 60\%$    $< 40\%$

**Abb. 28: Sequenzhomologien zwischen den Proteinen CDKL1, GSK3A und GSK3B.** Alignment der Proteinsequenzen von den humanen Proteinen CDKL1, GSK3A und GSK3B. Die Proteinsequenzen wurden mithilfe des bioinformatischen Programms Jalview2 (v.2.10.3)<sup>301</sup> miteinander verglichen und Sequenzhomologien in Prozent ( $\geq 80\%$ ;  $\geq 60\%$ ,  $< 40\%$ ) farblich hervorgehoben. Die Annotation der Aminosäuren beginnt mit einem Methionin als Aminosäure 1.



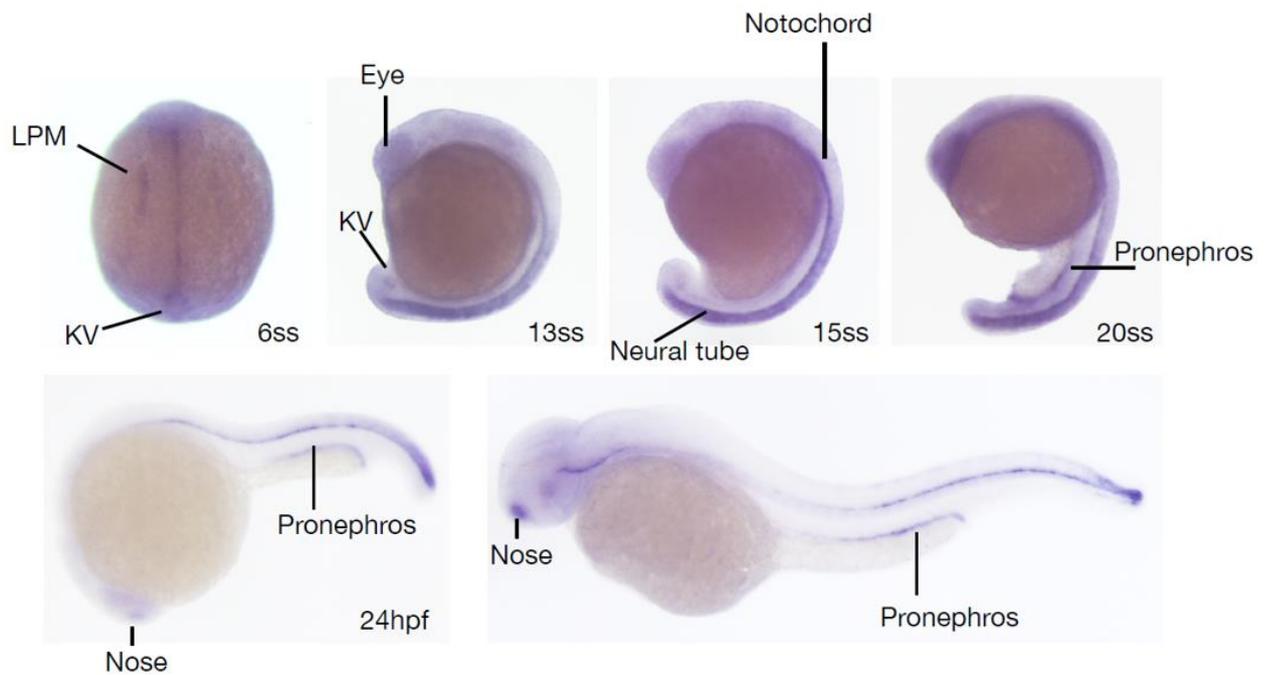
**Abb. 29: Immunfluoreszenz-Analyse von HeLa Zellen nach transienter Transfektion mit Plasmiden zur Expression von EGFP-CDKL1 Fusionsproteinen.** HeLa Zellen wurden transient mit **A:** pEGFP-Leervektor, **B:** pEGFP-CDKL1<sup>WT</sup>, **C:** pEGFP-CDKL1<sup>K34R</sup>, **D:** pEGFP-CDKL1<sup>T136M</sup>, **E:** pEGFP-CDKL1<sup>C144R</sup> oder **F:** pEGFP-CDKL1<sup>S207L</sup> transfiziert, in Paraformaldehyd fixiert, in Moviol eingedeckt und anschließend am SP8 Konfokal-Mikroskop (Leica) ausgewertet. Zur Analyse von EGFP-Fusionsproteinen wurde das EGFP-Protein bei einer Wellenlänge von 475 nm angeregt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur Analyse der Zellkerne wurde bei einer Wellenlänge von 358 nm angeregt.



**Abb. 30: Immunhistologische Analyse der Expression von CDKL1 in Aortenwandgewebe.**

**A:** Repräsentative Bilder der immunhistologischen Detektion von CDKL1-positiven Zellen in der *Tunica adventitia* und *Tunica media*. **B:** Repräsentative Bilder der immunhistologischen Detektion von CDKL1-positiven Zellen in der *Tunica media* und *Intima*.

Es wurde ein CDKL1-spezifischer Primärantikörper (Abcam) sowie ein HRP-(*Horseradish* Peroxidase, braune Färbung) Sekundärantikörper verwendet. Außerdem wurde das Gewebe mit Hämatoxylin zur Identifizierung der Zellkerne gefärbt (blaue Färbung). Die visuelle Analyse wurde mithilfe eines *Slidescanner Nano Zoomer 2.OHT* (Hamamatsu) und mithilfe der Software *NanoZoomer Digital Pathology* (Hamamatsu) durchgeführt. Adv, *Tunica adventitia*; M, *Tunica media*; Int, *Intima*



**Abb. 31: Expression von zCdk11 in Zebrafärbling-Embryonen.** LPM (*lateral plate mesoderm*), Mesoderm; KV, Kupfersche Vesikel; ss (*somite state*), Somiten-Stadium; hpf (*hours post fertilization*), Stunden nach Fertilisation; *notochord*, Chorda dorsalis; *neural tube*, Neuralrohr; *pronephros*, Vorniere; *nose*, Nase.

## X. Literaturverzeichnis

- 1 Jiang, X., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P. & Sucov, M. Fate of the mammalian neural crest. *Development*. 127, 1607-1616 (2000).
- 2 de Groot, A. C. G., DeRuiter, M. C., Bergwerff, M. & Poelmann, R. E. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19, 1589-1594 (1999).
- 3 Wolinsky, H. & Glasgow, S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ.Res.* 20, 99-111 (1967).
- 4 Stenmark, K. R. *et al.* The Adventitia: Essential Role in Pulmonary Vascular Remodeling. *Compr Physiol.* (2010).
- 5 Karnik, S. K. *e. a.* A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development*. 130, 411-423 (2003).
- 6 Lagna, G. *et al.* Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors. *J Biol Chem.* 282, 37244-37255 (2007).
- 7 Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol. Rev.* 84, 767-801 (2004).
- 8 Raines, E. W. & Ross, R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br.Heart J.* 69, S30-S37 (1993).
- 9 Alenghat, F. J. & Ingber, D. E. Mechanotransduction: All Signals Point to Cytoskeleton, Matrix and Integrins. *Sci. STKE* 2002, pe6 (2002).
- 10 Berrier, A. L. & Yamada, K. M. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 213, 565-573 (2007).
- 11 Luo, B. H., Carman, C. V. & Springer, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 25, 619-647 (2007).
- 12 Parker, K. K. & Ingber, D. E. Extracellular matrix, mechanotransduction and structural hierarchies in heart tissue engineering. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 362, 1267-1279 (2007).
- 13 Wang, N., Butler, J. P. & Ingber, D. E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science.* 260, 1124-1127 (1993).
- 14 Kim, B. S., Nikolovski, J., Bonadio, J. & Mooney, D. J. Cyclic mechanical strain regulates the development of engineered smooth muscle tissue. *Nat. Biotech.* 17, 979-983 (1999).
- 15 Maniotis, A. J., Chen, C. S. & Ingber, D. E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 849-854 (1997).
- 16 Pozzi, A., Wary, K. K., Giancotti, F. G. & Gardner, H. A. Integrin alpha-1/beta-1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway *in vivo*. *J. Cell Biol.* 142, 587-594 (1998).
- 17 Somasundaram, R. *et al.* Collagens serve as an extracellular store of bioactive interleukin 2. *J Biol Chem.* 275, 38170-38175 (2000).
- 18 van der Rest, M. & Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5, 2814-2823 (1991).
- 19 El-Hamamsy, I. & Yacoub, M. H. Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol.* 6, 771-786 (2009).
- 20 Parks, W., Pierce, R., Lee, K. E. & Mecham, R. Elastin. *Advances in Molecular and Cell Biology.* 6, 133-182 (1993).

- 21 Mochizuki, S., Brassart, B. & Hinek, A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 277, 44854-44863 (2002).
- 22 Rodgers, U. R. & Weiss, A. S. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie.* 86, 173-178 (2004).
- 23 Ramirez, F. & Dietz, H. C. Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events. *J Cell Physiol.* 213, 326-330 (2007).
- 24 Sherratt, M. J. & al., e. Fibrillin microfibrils are stiff reinforcing fibres in compliant tissue. *J. Mol. Biol.* 332, 183-193 (2003).
- 25 Chaudhry, S. S. *et al.* Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGF $\beta$ 1. *J Cell Biol.* 176, 355-367 (2007).
- 26 Isogai, Z. *et al.* Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem.* 278, 2750-2757 (2003).
- 27 Carta, L. *et al.* Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem.* 281, 8016-8023 (2006).
- 28 Nakamura, T. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis *in vivo*. *Nature.* 415, 171-175 (2002).
- 29 Campagnolo, P. *et al.* Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential. *Circulation.* 121, 1735-1745 (2010).
- 30 Cossu, G. & Bianco, P. Mesoangioblasts — vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev.* 13, 537-542 (2003).
- 31 Hoshino, A., Chiba, H., Nagai, K., Ishii, G. & Ochiai, A. Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 368, 305-310 (2008).
- 32 Passman, J. N. *et al.* A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 9349-9354 (2008).
- 33 Zengin, E. *et al.* Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development.* 133, 1543-1551 (2006).
- 34 Hu, Y. *et al.* Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 113, 1258-1265 (2004).
- 35 Torsney, E., Hu, Y. & Xu, Q. Adventitial progenitor cells contribute to arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 15, 64-68 (2005).
- 36 Han, C. I., Campbell, G. R. & Campbell, J. H. Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res.* 38, 113-119 (2001).
- 37 Hillebrands, J. L. *et al.* Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 107, 1411-1422 (2001).
- 38 Liu, C., Nath, K. A., Katusic, Z. S. & Caplice, N. M. Smooth muscle progenitor cells in vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 14, 288-293 (2004).
- 39 Sata, M. *et al.* Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med.* 8, 403-409 (2002).
- 40 Stenmark, K. R., Davie, N. J., Reeves, J. T. & Frid, M. G. Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation. *J Appl Physiol. (Bethesda, Md. : 1985)* 98, 715-721 (2005).
- 41 Wolinsky, H. Comparison of medial growth of human thoracic and abdominal aortas. *Circ.Res.* 27, 531-538 (1970).
- 42 Murphy-Ryan, M., Psychogios, A. & Lindor, N. M. Hereditary disorders of connective tissue: a guide to the emerging differential diagnosis. *Genet Med.* 12, 344-354 (2010).
- 43 Verstraeten, A., Luyckx, I. & Loeys, B. Aetiology and management of hereditary aortopathy. *Nat Rev Cardiol.* 14, 197-208 (2017).

- 44 Goyal, A., Keramati, A. R., Czarny, M. J., Resar, J. R. & Mani, A. The Genetics of Aortopathies in Clinical Cardiology. *Clin Med Insights Cardiol.* 11 (2017).
- 45 Lindsay, M. E. & Dietz, H. C. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature.* 473, 308-316 (2011).
- 46 Kodolitsch, Y. v. *et al.* Das akute Aortensyndrom. *Deutsches Ärzteblatt.* 100, 326- (2003).
- 47 Criado, F. J. Aortic dissection: a 250-year perspective. *Tex Heart Inst J.* 38, 694-700 (2011).
- 48 Elefteriades, J. A. Thoracic aortic aneurysm: reading the enemy's playbook. *Yale J Biol Med.* 81, 175-186 (2008).
- 49 Arslan-Kirchner, M., Kodolitsch, Y. v. & Schmidtke, J. Genetische Diagnostik beim Marfan-Syndrom und verwandten Erkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt.* 105, 483- (2008).
- 50 Milewicz, D. M. & Regalado, E. Heritable Thoracic Aortic Disease Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA)1993.
- 51 Li, X., Zhao, G., Zhang, J., Duan, Z. & Xin, S. Prevalence and trends of the abdominal aortic aneurysms epidemic in general population – a meta-analysis. *PLoS One.* 8, e81260 (2013).
- 52 Kuivaniemi, H. *et al.* Update on abdominal aortic aneurysm research: from clinical to genetic studies. *Scientifica (Cairo).* 2014, 564734 (2014).
- 53 Vardulaki, K. A. *et al.* Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 87, 195-200 (2000).
- 54 Wong, D. R., Willett, W. C. & Rimm, E. B. Smoking, hypertension, alcohol consumption, and risk of abdominal aortic aneurysm in men. *Am J Epidemiol.* 165, 838-845 (2007).
- 55 Shibamura, H. *et al.* Genome scan for familial abdominal aortic aneurysm using sex and family history as covariates suggests genetic heterogeneity and identifies linkage to chromosome 19q13. *Circulation.* 109, 2103-2108 (2004).
- 56 Van Vlijmen-Van Keulen, C. J., Rauwerda, J. A. & Pals, G. Genome-wide linkage in three Dutch families maps a locus for abdominal aortic aneurysms to chromosome 19q13.3. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 30, 29-35 (2005).
- 57 Andelfinger, G., Loeys, B. & Dietz, H. A Decade of Discovery in the Genetic Understanding of Thoracic Aortic Disease. *Can J Cardiol.* 32, 13-25 (2016).
- 58 Pyeritz, R. E. Heritable thoracic aortic disorders. *Curr Opin Cardiol.* 29, 97-102 (2014).
- 59 Bonderman, D. *et al.* Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation. *Circulation.* 99, 2138-2143 (1999).
- 60 Dobrin, P. B. & Mrkvicka, R. Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovascular surgery. (London, England)* 2, 484-488 (1994).
- 61 LeMaire, S. A. & Russell, L. Epidemiology of thoracic aortic dissection. *Nat Rev Cardiol.* 8, 103 (2010).
- 62 Martufi, G., Gasser, T. C., Appoo, J. J. & Di Martino, E. S. Mechano-biology in the thoracic aortic aneurysm: a review and case study. *Biomech Model Mechanobiol.* 13, 917-928 (2014).
- 63 Sazonova, O. V. *et al.* Extracellular matrix presentation modulates vascular smooth muscle cell mechanotransduction. *Matrix biol.* 41, 36-43 (2015).
- 64 Newby, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res.* 69, 614-624 (2006).
- 65 Zhang, X., Shen, Y. H. & LeMaire, S. A. Thoracic aortic dissection: are matrix metalloproteinases involved? *Vascular.* 17, 147-157 (2009).
- 66 Chung, A. W. *et al.* Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res.* 101, 512-522 (2007).

- 67 Rabkin, S. W. Accentuating and Opposing Factors Leading to Development of Thoracic Aortic Aneurysms Not Due to Genetic or Inherited Conditions. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2 (2015).
- 68 Nagashima, H. *et al.* Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis in cystic medial degeneration associated with Marfan's syndrome. *Circulation*. 104, I282-287 (2001).
- 69 Roccabianca, S., Ateshian, G. A. & Humphrey, J. D. Biomechanical roles of medial pooling of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection. *Biomech Model Mechanobiol*. 13, 13-25 (2014).
- 70 Bickerstaff, L. K. *et al.* Thoracic aortic aneurysms: a population-based study. *Surgery*. 92, 1103-1108 (1982).
- 71 Castellano, J. M., Kovacic, J. C., Sanz, J. & Fuster, V. Are we ignoring the dilated thoracic aorta? *Ann N Y Acad Sci*. 1254, 164-174 (2012).
- 72 Milewicz, D. M. *et al.* Reduced penetrance and variable expressivity of familial thoracic aortic aneurysms/dissections. *Am J Cardiol*. 82, 474-479 (1998).
- 73 Callewaert, B. L. & De Paepe, A. M. Fortschritt in der Pathogenese des Marfan-Syndroms und verwandter Krankheiten. *Medizinische Genetik*. 20, 6-17 (2008).
- 74 Robinson, P. N. *et al.* The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet*. 43, 769-787 (2006).
- 75 Dietz, H. C. *et al.* Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 352, 337-339 (1991).
- 76 Beroud, C. *et al.* UMD (Universal Mutation Database): 2005 update. *Hum Mutat*. 26, 184-191 (2005).
- 77 Loeys, B. *et al.* Comprehensive molecular screening of the FBN1 gene favors locus homogeneity of classical Marfan syndrome. *Hum Mutat*. 24, 140-146 (2004).
- 78 Bertoli-Avella, A. M. *et al.* Mutations in a TGF-beta ligand, TGFB3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. *J Am Coll Cardiol*. 65, 1324-1336 (2015).
- 79 Boileau, C. *et al.* TGFB2 mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections associated with mild systemic features of Marfan syndrome. *Nat Genet*. 44, 916-921 (2012).
- 80 Lindsay, M. E. *et al.* Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet*. 44, 922-927 (2012).
- 81 Loeys, B. L. *et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet*. 37, 275-281 (2005).
- 82 Micha, D. *et al.* SMAD2 Mutations are associated with Arterial Aneurysms and Dissections. *Hum Mutat*. 36, 1145-1149 (2015).
- 83 van de Laar, I. M. *et al.* Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet*. 43, 121-126 (2011).
- 84 Meester, J. A. *et al.* Loss-of-function mutations in the X-linked biglycan gene cause a severe syndromic form of thoracic aortic aneurysms and dissections. *Genet Med*. 19, 386-395 (2017).
- 85 Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D. & Worch, H. Fibrillogenesis of Collagen Types I, II, and III with Small Leucine-Rich Proteoglycans Decorin and Biglycan. *Biomacromolecules*. 7, 2388-2393 (2006).
- 86 Halper, J. Proteoglycans and Diseases of Soft Tissues. *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases*. 49-58 (2014).
- 87 Carmignac, V. *et al.* In-Frame Mutations in Exon 1 of SKI Cause Dominant Shprintzen-Goldberg Syndrome. *Am J of Hum Genet*. 91, 950-957 (2012).
- 88 Doyle, A. J. *et al.* Mutations in the TGF-beta repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nat Genet*. 44, 1249-1254 (2012).

- 89 Schepers, D. *et al.* The SMAD-binding domain of SKI: a hotspot for de novo mutations causing Shprintzen–Goldberg syndrome. *Eur J Hum Genet.* 23, 224-228 (2014).
- 90 Wenstrup, R. J. *et al.* Prevalence of aortic root dilation in the Ehlers-Danlos syndrome. *Genet Med.* 4, 112-117 (2002).
- 91 Schwarze, U. *et al.* Haploinsufficiency for one COL3A1 allele of type III procollagen results in a phenotype similar to the vascular form of Ehlers-Danlos syndrome, Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet.* 69, 989-1001 (2001).
- 92 Borck, G., Beighton, P., Wilhelm, C., Kohlhase, J. & Kubisch, C. Arterial rupture in classic Ehlers-Danlos syndrome with COL5A1 mutation. *Am J Med Genet A.* 152A, 2090-2093 (2010).
- 93 de Leeuw, K. *et al.* Superior mesenteric artery aneurysm in a 9-year-old boy with classical Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Med Genet A.* 158A, 626-629 (2012).
- 94 Karaa, A. & Stoler, J. M. Ehlers Danlos Syndrome: An Unusual Presentation You Need to Know about. *Case Rep Pediatr.* 2013, 764659 (2013).
- 95 Malfait, F. *et al.* Three arginine to cysteine substitutions in the pro- $\alpha$  (I)-collagen chain cause Ehlers-Danlos syndrome with a propensity to arterial rupture in early adulthood. *Hum Mutat.* 28, 387-395 (2007).
- 96 Mehta, S., Dhar, S. U. & Birnbaum, Y. Common Iliac Artery Aneurysm and Spontaneous Dissection with Contralateral Iatrogenic Common Iliac Artery Dissection in Classic Ehlers–Danlos Syndrome. *Int J Angiol.* 21, 167-170 (2012).
- 97 Monroe, G. R. *et al.* Familial Ehlers-Danlos syndrome with lethal arterial events caused by a mutation in COL5A1. *Am J Med Genet A.* 167, 1196-1203 (2015).
- 98 de Wit, M. C. *et al.* Combined cardiological and neurological abnormalities due to filamin A gene mutation. *Clin Res Cardiol.* 100, 45-50 (2011).
- 99 Rohrbach, M. *et al.* Phenotypic variability of the kyphoscoliotic type of Ehlers-Danlos syndrome (EDS VIA): clinical, molecular and biochemical delineation. *Orphanet J Rare Dis.* 6, 46 (2011).
- 100 Fox, J. W. *et al.* Mutations in filamin 1 Prevent Migration of Cerebral Cortical Neurons in Human Periventricular Heterotopia. *Neuron.* 21, 1315-1325 (1998).
- 101 Yeowell, H. N. *et al.* Deletion of cysteine 369 in lysyl hydroxylase 1 eliminates enzyme activity and causes Ehlers–Danlos syndrome type VI. *Matrix Biol.* 19, 37-46 (2000).
- 102 Botstein, D. & Risch, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 33 Suppl, 228-237 (2003).
- 103 Guo, D. C. *et al.* Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet.* 39, 1488-1493 (2007).
- 104 Morisaki, H. *et al.* Mutation of ACTA2 gene as an important cause of familial and nonfamilial nonsyndromic thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD). *Hum Mutat.* 30, 1406-1411 (2009).
- 105 Guo, D. C. *et al.* Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *Am J Hum Genet.* 84, 617-627 (2009).
- 106 Zhu, L. *et al.* Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet.* 38, 343-349 (2006).
- 107 Pannu, H. *et al.* MYH11 mutations result in a distinct vascular pathology driven by insulin-like growth factor 1 and angiotensin II. *Hum Mol Genet.* 16, 2453-2462 (2007).
- 108 Hannuksela, M. *et al.* A novel variant in MYLK causes thoracic aortic dissections: genotypic and phenotypic description. *BMC Med Genet.* 17 (2016).
- 109 Wang, L. *et al.* Mutations in myosin light chain kinase cause familial aortic dissections. *Am J Hum Genet.* 87, 701-707 (2010).

- 110 Guo, D. C. *et al.* Recurrent gain-of-function mutation in PRKG1 causes thoracic aortic aneurysms and acute aortic dissections. *Am J Hum Genet.* 93, 398-404 (2013).
- 111 Gago-Diaz, M. *et al.* PRKG1 and genetic diagnosis of early-onset thoracic aortic disease. *Eur J Clin Invest.* 46, 787-794 (2016).
- 112 Barbier, M. *et al.* MFAP5 loss-of-function mutations underscore the involvement of matrix alteration in the pathogenesis of familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Am J Hum Genet.* 95, 736-743 (2014).
- 113 Guo, D. C. *et al.* MAT2A mutations predispose individuals to thoracic aortic aneurysms. *Am J Hum Genet.* 96, 170-177 (2015).
- 114 Guo, D. C. *et al.* LOX Mutations Predispose to Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Circ Res.* 118, 928-934 (2016).
- 115 Kuang, S. Q. *et al.* FOXE3 mutations predispose to thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Clin Invest.* 126, 948-961 (2016).
- 116 Lee, V. S. *et al.* Loss of function mutation in LOX causes thoracic aortic aneurysm and dissection in humans. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 113, 8759-8764 (2016).
- 117 Keramati, A. R., Sadeghpour, A., Farahani, M. M., Chandok, G. & Mani, A. J. B. M. G. The non-syndromic familial thoracic aortic aneurysms and dissections maps to 15q21 locus. *BMC Med Genet.* 11, 143 (2010).
- 118 Milewicz, D. M. *et al.* Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms. *Circulation* 94, 2708-2711 (1996).
- 119 Regalado, E. S. *et al.* Pathogenic FBN1 variants in familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Clin Genet.* 89, 719-723 (2016).
- 120 Regalado, E. S. *et al.* Exome Sequencing Identifies SMAD3 Mutations as a Cause of Familial Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection With Intracranial and Other Arterial Aneurysms. *Circ Res.* 109, 680-686 (2011).
- 121 Gago-Diaz, M. *et al.* Whole exome sequencing for the identification of a new mutation in TGFB2 involved in a familial case of non-syndromic aortic disease. *Clin Chim Acta.* 437, 88-92 (2014).
- 122 Hasham, S. N. *et al.* Mapping a locus for familial thoracic aortic aneurysms and dissections (TAAD2) to 3p24-25. *Circulation.* 107, 3184-3190 (2003).
- 123 Pannu, H. *et al.* Mutations in transforming growth factor-beta receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation.* 112, 513-520 (2005).
- 124 Pepin, M. G., Murray, M. L. & Byers, P. H. Vascular Ehlers-Danlos Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA) (1993).
- 125 Malfait, F., Wenstrup, R. & De Paepe, A. Classic Ehlers-Danlos Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA) (1993).
- 126 Loeys, B. L. & Dietz, H. C. Loeys-Dietz Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA) (1993).
- 127 Dietz, H. Marfan Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA) (1993).
- 128 Tsilou, E. & MacDonald, I. M. Weill-Marchesani Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA) (1993).
- 129 Robin, N. H., Moran, R. T. & Ala-Kokko, L. Stickler Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA) (1993).
- 130 Kashtan, C. E. Alport Syndrome and Thin Basement Membrane Nephropathy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA) (1993).
- 131 Clemenceau, A. *et al.* Deleterious variants in DCHS1 are prevalent in sporadic cases of mitral valve prolapse. *Mol Genet Genomic Med.* 6, 114-120 (2018).
- 132 Loeys, B., De Paepe, A. & Urban, Z. EFEMP2-Related Cutis Laxa. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA) (1993).

- 133 Duz, M. B. *et al.* A novel case of autosomal dominant cutis laxa in a consanguineous family: report and literature review. *Clin Dysmorphol.* 26, 142-147 (2017).
- 134 Jelsig, A. M., Urban, Z., Huchtagowder, V., Nissen, H. & Ousager, L. B. Novel ELN mutation in a family with supravalvular aortic stenosis and intracranial aneurysm. *Eur J Med Genet.* 60, 110-113 (2017).
- 135 Godfrey, M. Congenital Contractural Arachnodactyly. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA) (1993).
- 136 Robertson, S. Otopalatodigital Spectrum Disorders. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA) (1993).
- 137 Yang, Y. Q. *et al.* Mutational spectrum of the GATA5 gene associated with familial atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 157, 305-307 (2012).
- 138 Gu, J. Y., Xu, J. H., Yu, H. & Yang, Y. Q. Novel GATA5 loss-of-function mutations underlie familial atrial fibrillation. *Clinics (Sao Paulo, Brazil).* 67, 1393-1399 (2012).
- 139 Shi, L. M. *et al.* GATA5 loss-of-function mutations associated with congenital bicuspid aortic valve. *Int J Mol Med.* 33, 1219-1226 (2014).
- 140 Wei, D. *et al.* GATA5 loss-of-function mutation responsible for the congenital ventriculoseptal defect. *Pediatr Cardiol.* 34, 504-511 (2013).
- 141 van der Linde, D. *et al.* Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 58, 2241-2247 (2011).
- 142 Lehman, A., Wuyts, W. & Patel, M. S. Adams-Oliver Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA) (1993).
- 143 Meester, J. A. N. *et al.* Overlapping but distinct roles for NOTCH receptors in human cardiovascular disease. *Clin Genet.* (2018).
- 144 Grealley, M. T. Shprintzen-Goldberg Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA) (1993).
- 145 McDonald, J. & Pyeritz, R. E. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA) (1993).
- 146 Starr, L. J., Lindor, N. M. & Lin, A. E. Myhre Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA) (1993).
- 147 Larsen Haidle, J. & Howe, J. R. Juvenile Polyposis Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA) (1993).
- 148 Cohn, R. D. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med.* 13, 204-210 (2007).
- 149 Habashi, J. P. *et al.* Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *Science.* 312, 117-121 (2006).
- 150 Neptune, E. R. *et al.* Dysregulation of TGF- $\beta$  activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 33, 407 (2003).
- 151 Ng, C. M. *et al.* TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 114, 1586-1592 (2004).
- 152 Franken, R. *et al.* Circulating transforming growth factor-beta as a prognostic biomarker in Marfan syndrome. *Int J Cardiol.* 168, 2441-2446 (2013).
- 153 Verstraeten, A., Alaerts, M., Van Laer, L. & Loeys, B. Marfan Syndrome and Related Disorders: 25 Years of Gene Discovery. *Hum Mutat.* 37, 524-531 (2016).
- 154 Bolar, N., Van Laer, L. & Loeys, B. L. Marfan syndrome: from gene to therapy. *Curr Opin Pediatr.* 24, 498-504 (2012).
- 155 Renard, M. *et al.* Novel MYH11 and ACTA2 mutations reveal a role for enhanced TGF $\beta$  signaling in FTAAD. *Int J Cardiol.* 165, 314-321 (2013).
- 156 Hartshorne, D. J. Biochemical basis for contraction of vascular smooth muscle. *Chest.* 78, 140-149 (1980).
- 157 Webb, R. C. Smooth Muscle Contraction and Relaxation. *Adv Physiol Educ.* 27, 201-206 (2003).

- 158 Isselbacher, E. M., Lino Cardenas, C. L. & Lindsay, M. E. Hereditary Influence in Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *Circulation*. 133, 2516-2528 (2016).
- 159 Surks, H. K. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circ Res*. 101, 1078-1080 (2007).
- 160 Boycott, K. M. *et al.* International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. *Am J Hum Genet*. 100, 695-705 (2017).
- 161 de Goede, C. *et al.* Role of reverse phenotyping in interpretation of next generation sequencing data and a review of INPP5E related disorders. *Eur J Paediatr Neurol*. 20, 286-295 (2016).
- 162 Wold, B. & Myers, R. M. Sequence census methods for functional genomics. *Nat Methods*. 5, 19-21 (2008).
- 163 Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 11, 31-46 (2010).
- 164 Mamanova, L. *et al.* Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods*. 7, 111-118 (2010).
- 165 Bamshad, M. J. *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*. 12, 745-755 (2011).
- 166 Cock, P. J., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L. & Rice, P. M. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res*. 38, 1767-1771 (2010).
- 167 Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. Base-calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accurac Assessment. *Genome Res*. 8, 175-185 (1998).
- 168 Ewing, B. & Green, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Res*. 8, 186-194 (1998).
- 169 Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30, 2114-2120 (2014).
- 170 Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25, 2078-2079 (2009).
- 171 Wu, T. D. & Nacu, S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*. 26, 873-881 (2010).
- 172 Bao, R. *et al.* Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer Inform*. 13, 67-82 (2014).
- 173 McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 20, 1297-1303 (2010).
- 174 Genomes Project, C. *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 491, 56-65 (2012).
- 175 Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 38, e164 (2010).
- 176 Yang, H. & Wang, K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat Protoc*. 10, 1556-1566 (2015).
- 177 Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G. & Veltman, J. A. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet*. 20, 490-497 (2012).
- 178 Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 536, 285-291 (2016).
- 179 Richards, S. *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*. 17, 405-424 (2015).
- 180 Ng, S. B. *et al.* Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet*. 42, 790-793 (2010).
- 181 Samocha, K. E. *et al.* A framework for the interpretation of de novo mutation in human disease. *Nat Genet*. 46, 944-950 (2014).

- 182 Brownstein, A. J. *et al.* Genes Associated with Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection: 2018 Update and Clinical Implications. *Aorta (Stamford)*. 6, 13-20 (2018).
- 183 Brownstein, A. J. *et al.* Genes Associated with Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection: An Update and Clinical Implications. *Aorta (Stamford)*. 5, 11-20 (2017).
- 184 Renard, M. *et al.* Clinical Validity of Genes for Heritable Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *J Am Coll Cardiol*. 72, 605-615 (2018).
- 185 De Paepe, A., Devereux, R. B., Dietz, H. C., Hennekam, R. C. & Pyeritz, R. E. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet*. 62, 417-426 (1996).
- 186 Loeys, B. L. *et al.* The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet*. 47, 476-485 (2010).
- 187 Adam, M. P., Ardinger, H. H. & A., P. R. *GeneReviews*. (1993-2018).
- 188 Howe, D. G. *et al.* ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic Acids Res*. 41, D854-860 (2013).
- 189 Jin, S. C. *et al.* Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. *Nat Genet*. 49, 1593-1601 (2017).
- 190 O'Connor, E. *et al.* Identification of mutations in the MYO9A gene in patients with congenital myasthenic syndrome. *Brain*. 139, 2143-2153 (2016).
- 191 Vaz-Drago, R., Custodio, N. & Carmo-Fonseca, M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet*. 136, 1093-1111 (2017).
- 192 Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 46, D1062-D1067 (2018).
- 193 Stenson, P. D. *et al.* Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. 21, 577-581 (2003).
- 194 Fokkema, I. F. *et al.* LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat*. 32, 557-563 (2011).
- 195 Alirezaie, N., Kernohan, K. D., Hartley, T., Majewski, J. & Hocking, T. D. ClinPred: Prediction Tool to Identify Disease-Relevant Nonsynonymous Single-Nucleotide Variants. *Am J Hum Genet*. 103, 474-483 (2018).
- 196 Ioannidis, N. M. *et al.* REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*. 99, 877-885 (2016).
- 197 Jagadeesh, K. A. *et al.* M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet*. 48, 1581-1586 (2016).
- 198 Desmet, F. O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37, e67 (2009).
- 199 Hebsgaard, S. M. *et al.* Splice site prediction in Arabidopsis thaliana pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res*. 24, 3439-3452 (1996).
- 200 Yeo, G. & Burge, C. B. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol*. 11, 377-394 (2004).
- 201 The UniProt, C. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 45, D158-D169 (2017).
- 202 Smith, C. L. *et al.* Mouse Genome Database (MGD)-2018: knowledgebase for the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res*. 46, D836-D842 (2018).
- 203 Liu, D. J. *et al.* Exome-wide association study of plasma lipids in >300,000 individuals. *Nat Genet*. 49, 1758-1766 (2017).
- 204 Gupta, P. A. *et al.* Ten novel FBN2 mutations in congenital contractural arachnodactyly: delineation of the molecular pathogenesis and clinical phenotype. *Hum Mutat*. 19, 39-48, (2002).
- 205 Martin, P. S. *et al.* Embryonic Development of the Bicuspid Aortic Valve. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2, 248-272 (2015).

- 206 Girdauskas, E. *et al.* Genetic abnormalities in bicuspid aortic valve root phenotype: preliminary results. *Eur J Cardiothorac Surg.* 52, 156-162 (2017).
- 207 Bonachea, E. M. *et al.* Rare GATA5 sequence variants identified in individuals with bicuspid aortic valve. *Pediatr Res.* 76, 211-216 (2014).
- 208 Zhang, X. L. *et al.* GATA5 loss-of-function mutation in familial dilated cardiomyopathy. *Int J Mol Med.* 35, 763-770 (2015).
- 209 Van Driest, S. L. *et al.* Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 44, 1903-1910 (2004).
- 210 Tomita-Mitchell, A. *et al.* Impact of MYH6 variants in hypoplastic left heart syndrome. *Physiol Genomics.* 48, 912-921 (2016).
- 211 Chen, D. *et al.* Identification of Macrodomein Proteins as Novel O-Acetyl-ADP-ribose Deacetylases. *J Biol Chem.* 286, 13261-13271 (2011).
- 212 Han, W., Li, X. & Fu, X. The macro domain protein family: structure, functions, and their potential therapeutic implications. *Mutat Res.* 727, 86-103 (2011).
- 213 Fromer, M. *et al.* De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature.* 506, 179-184 (2014).
- 214 Madej, T. *et al.* MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Res.* 42, D297-303 (2014).
- 215 Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45, D200-D203 (2017).
- 216 Ung, C. *et al.* Whole exome sequencing identification of novel candidate genes in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Vision Res.* 139, 168-176 (2017).
- 217 Hsu, L. S., Liang, C. J., Tseng, C. Y., Yeh, C. W. & Tsai, J. N. Zebrafish cyclin-dependent protein kinase-like 1 (zcdk11): identification and functional characterization. *Int J Mol Sci.* 12, 3606-3617 (2011).
- 218 Kim, S. O., Katz, S. & Pelech, S. L. Expression of second messenger- and cyclin-dependent protein kinases during postnatal development of rat heart. *J Cell Biochem.* Jun 15, 69(64):506-521 (1998).
- 219 Massague, J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13, 616-630 (2012).
- 220 Aragon, E. *et al.* A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code. *Genes Dev.* 25, 1275-1288 (2011).
- 221 Barrios-Rodiles, M. & al., e. High-Throughput Mapping of a Dynamic signaling network in mammalian cells. *Science.* 307, 1621-1625 (2005).
- 222 Xu, L. *et al.* Msk is required for nuclear import of TGF- $\beta$ /BMP-activated Smads. *J Cell Biol.* 178, 981-994 (2007).
- 223 Rao, A. R., Yourshaw, M., Christensen, B., Nelson, S. F. & Kerner, B. Rare deleterious mutations are associated with disease in bipolar disorder families. *Mol Psychiatry.* 22, 1009-1014 (2017).
- 224 Bayram, Y. *et al.* Molecular etiology of arthrogyrosis in multiple families of mostly Turkish origin. *J Clin Invest.* 126, 762-778 (2016).
- 225 Valdes-Mas, R. *et al.* Mutations in filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Commun.* 5, 5326 (2014).
- 226 Brodehl, A. *et al.* Mutations in FLNC are Associated with Familial Restrictive Cardiomyopathy. *Hum Mutat.* 37, 269-279 (2016).
- 227 Leung-Hagesteijn, C., Mahendra, A., BNaruszewicz, I. & Hannigan, G. E. Modulation of integrin signal transduction by ILKAP. *The EMBO Journal.* 20, 2160-2170 (2001).
- 228 Iossifov, I. e. a. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *HHMI.* 515, 216-221 (2014).
- 229 Riazuddin, S. *et al.* Exome sequencing of Pakistani consanguineous families identifies 30 novel candidate genes for recessive intellectual disability. *Mol Psychiatry.* 22, 1604-1614 (2017).

- 230 Jiang, Y. H. *et al.* Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet.* 93, 249-263 (2013).
- 231 Zhang, J. X. *et al.* Candidate colorectal cancer predisposing gene variants in Chinese early-onset and familial cases. *World J Gastroenterol.* 21, 4136-4149 (2015).
- 232 Noble, J. A. *et al.* A Polymorphism in the TCF7 Gene, C883A, Is Associated With Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 52 (2003).
- 233 Dietz, M. L., Bernaciak, T. M., Vendetti, F., Kielec, J. M. & Hildebrand, J. D. Differential actin-dependent localization modulates the evolutionarily conserved activity of Shroom family proteins. *J Biol Chem.* 281, 20542-20554 (2006).
- 234 Sevilla-Perez, J. *et al.* Shroom expression is attenuated in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 32, 871-880 (2008).
- 235 Hildebrand, J. D. Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J Cell Sci.* 118, 5191-5203 (2005).
- 236 Niimura, H. *et al.* Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation.* 105(4), 446-451 (2002).
- 237 Sanna-Cherchi, S. *et al.* Exome-wide Association Study Identifies GREB1L Mutations in Congenital Kidney Malformations. *Am J Hum Genet.* 101, 789-802 (2017).
- 238 Bi, C. *et al.* Mutations of ANK3 identified by exome sequencing are associated with autism susceptibility. *Hum Mutat.* 33, 1635-1638 (2012).
- 239 Kosmicki, J. A. *et al.* Refining the role of de novo protein-truncating variants in neurodevelopmental disorders by using population reference samples. *Nat Genet.* 49, 504-510 (2017).
- 240 Gulsuner, S. *et al.* Spatial and temporal mapping of de novo mutations in schizophrenia to a fetal prefrontal cortical network. *Cell.* 154, 518-529 (2013).
- 241 Glessner, J. T. *et al.* Duplication of the SLIT3 locus on 5q35.1 predisposes to major depressive disorder. *PLoS One.* 5, e15463 (2010).
- 242 Ritter, D. I. *et al.* Identifying gene disruptions in novel balanced de novo constitutional translocations in childhood cancer patients by whole-genome sequencing. *Genet Med.* 17, 831-835 (2015).
- 243 Wouters, M. A. *et al.* Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Sci.* 14, 1091-1103 (2005).
- 244 Handford, P. *et al.* The Calcium Binding Properties and Molecular Organization of Epidermal Growth Factor-like Domains in Human Fibrillin-1. *J Biol Chem.* 270, 6754-6756 (1995).
- 245 Mommersteeg, M. T., Yeh, M. L., Parnavelas, J. G. & Andrews, W. D. Disrupted Slit-Robo signalling results in membranous ventricular septum defects and bicuspid aortic valves. *Cardiovasc Res.* 106, 55-66 (2015).
- 246 Zhang, B. *et al.* Repulsive axon guidance molecule Slit3 is a novel angiogenic factor. *Blood.* 114, 4300-4309 (2009).
- 247 Wang, Y. *et al.* Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes. *Nature.* 485, 128-132 (2012).
- 248 Lassuthova, P. *et al.* Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 11, 118 (2016).
- 249 Schabhtl, M. *et al.* Whole-exome sequencing in patients with inherited neuropathies: outcome and challenges. *J Neurol.* 261, 970-982 (2014).
- 250 Aleksic, B. *et al.* Analysis of the VAV3 as candidate gene for schizophrenia: evidences from voxel-based morphometry and mutation screening. *Schizophr Bull.* 39, 720-728 (2013).
- 251 Kwak, S. H. *et al.* A genome-wide association study on thyroid function and anti-thyroid peroxidase antibodies in Koreans. *Hum Mol Genet.* 23, 4433-4442 (2014).

- 252 Neale, B. M. *et al.* Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*. 485, 242-245 (2012).
- 253 Usategui-Martin, R. *et al.* VAV3 Gene Polymorphism Is Associated with Paget's Disease of Bone. *Genet Test Mol Biomarkers*. 20, 335-337 (2016).
- 254 Li, J. *et al.* Vitamin D-related genes are subjected to significant de novo mutation burdens in autism spectrum disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. (2017).
- 255 Zhang, Z., Aung, Z. T., Simmons, D. G. & Dawson, P. A. Molecular analysis of sequence and splice variants of the human SLC13A4 sulfate transporter. *Mol Genet Metab*. 121(1), 35-42 (2017).
- 256 Lucariello, M. *et al.* Whole exome sequencing of Rett syndrome-like patients reveals the mutational diversity of the clinical phenotype. *Hum Genet*. 135, 1343-1354 (2016).
- 257 Eckert, J. K. *et al.* The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity*. 39, 647-660 (2013).
- 258 Carrera, P. *et al.* Exome sequencing and pathway analysis for identification of genetic variability relevant for bronchopulmonary dysplasia (BPD) in preterm newborns: A pilot study. *Clin Chim Acta*. 451, 39-45 (2015).
- 259 Steinberg, K. M., Yu, B., Koboldt, D. C., Mardis, E. R. & Pamphelett, R. Exome sequencing of case-unaffected-parents trios reveals recessive and de novo genetic variants in sporadic ALS. *Scientific Reports*. 5 (2015).
- 260 Zeng, L. *et al.* A functional variant of lipopolysaccharide binding protein predisposes to sepsis and organ dysfunction in patients with major trauma. *Ann Surg*. 255, 147-157 (2012).
- 261 Hubcak, J. A. *et al.* gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: Gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med*. 29 (2001).
- 262 Kinnersley, B. *et al.* Search for new loci and low-frequency variants influencing glioma risk by exome-array analysis. *Eur J Hum Genet*. 24, 717-724 (2016).
- 263 Malumbres, M. *et al.* Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol*. 11, 1275-1276 (2009).
- 264 Canning, P. *et al.* CDKL Family Kinases Have Evolved Distinct Structural Features and Ciliary Function. *Cell Rep*. 22, 885-894 (2018).
- 265 Wang, Y. & Anderson, M. Intracellular Signaling Pathways in Cardiac Remodeling. *Muscle*. 299-308 (2012).
- 266 Yee, K. W. *et al.* NKIAMRE, a novel conserved CDC2-related kinase with features of both mitogen-activated protein kinases and cyclin-dependent kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 308, 784-792 (2003).
- 267 Meyerson, M. *et al.* A family of human cdc2-related protein kinases.pdf. *The EMBO Journal*. 11, 2909-2917 (1992).
- 268 Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. The Protein Kinase Family-Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 241, 42-52 (1988).
- 269 Hong, K. U. *et al.* Cdk1-cyclin B1-mediated phosphorylation of tumor-associated microtubule-associated protein/cytoskeleton-associated protein 2 in mitosis. *J Biol Chem*. 284, 16501-16512 (2009).
- 270 Hu, B., Mitra, J., van den Heuvel, S. & Enders, G. H. S and G2 phase roles for Cdk2 revealed by inducible expression of a dominant-negative mutant in human cells. *Mol Cell Biol*. 21, 2755-2766 (2001).
- 271 Nolen, B., Taylor, S. & Ghosh, G. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell*. 15, 661-675 (2004).
- 272 Heuvel, S. v. d. & Harlow, E. Distinct Roles for Cyclin-Dependent Kinases in Cell Cycle Control. *Science*. 292, 2050-2054 (1993).

- 273 Tao, J. *et al.* Mutations in the X-linked Cyclin-Dependent Kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet.* 75 (6), 1149-1154 (2004).
- 274 Fleig, U. N., Gould, K. L. & Nurse, P. A dominant negative allele of p34cdc2 shows altered phosphoamino acid content and sequesters p56cdc13 cyclin. *Molecular and cellular biology.* 12, 2295-2301 (1992).
- 275 Song, Z., Lin, J., Sun, Z., Ni, J. & Sha, Y. RNAi-mediated downregulation of CDKL1 inhibits growth and colony-formation ability, promotes apoptosis of human melanoma cells. *J Dermatol Sci.* 79, 57-63 (2015).
- 276 Welcker, M. *et al.* Multisite Phosphorylation by Cdk2 and GSK3 Controls Cyclin E Degradation. *Molecular Cell.* 12, 381-392 (2003).
- 277 Holt, L. J., Hutti, J. E., Cantley, L. C. & Morgan, D. O. Evolution of Ime2 phosphorylation sites on Cdk1 substrates provides a mechanism to limit the effects of the phosphatase Cdc14 in meiosis. *Molecular Cell.* 25, 689-702 (2007).
- 278 Wang, J. *et al.* Human CD34+ cells in experimental myocardial infarction: long-term survival, sustained functional improvement, and mechanism of action. *Circ Res.* 106, 1904-1911 (2010).
- 279 Wojakowski, W. *et al.* Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 110, 3213-3220 (2004).
- 280 Yeh, E. T. *et al.* Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation.* 108, 2070-2073 (2003).
- 281 Shen, Y. H. *et al.* Stem cells in thoracic aortic aneurysms and dissections: potential contributors to aortic repair. *Ann Thorac Surg.* 93, 1524-1533 (2012).
- 282 Campens, L. *et al.* Gene panel sequencing in heritable thoracic aortic disorders and related entities - results of comprehensive testing in a cohort of 264 patients. *Orphanet J Rare Dis.* 10, 9 (2015).
- 283 Fang, M. *et al.* Identification of Novel Clinically Relevant Variants in 70 Southern Chinese patients with Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection by Next-generation Sequencing. *Sci Rep.* 7, 10035 (2017).
- 284 Overwater, E. *et al.* Results of next-generation sequencing gene panel diagnostics including copy-number variation analysis in 810 patients suspected of heritable thoracic aortic disorders. *Hum Mutat.* 39, 1173-1192 (2018).
- 285 Poninska, J. K. *et al.* Next-generation sequencing for diagnosis of thoracic aortic aneurysms and dissections: diagnostic yield, novel mutations and genotype phenotype correlations. *J Transl Med.* 14, 115 (2016).
- 286 Proost, D. *et al.* Performant Mutation Identification Using Targeted Next-Generation Sequencing of 14 Thoracic Aortic Aneurysm Genes. *Hum Mutat.* 36, 808-814 (2015).
- 287 Weerakkody, R. *et al.* Targeted genetic analysis in a large cohort of familial and sporadic cases of aneurysm or dissection of the thoracic aorta. *Genet Med.* 20, 1414-1422 (2018).
- 288 Wooderchak-Donahue, W. *et al.* Clinical utility of a next generation sequencing panel assay for Marfan and Marfan-like syndromes featuring aortopathy. *Am J Med Genet A.* 167A, 1747-1757 (2015).
- 289 Ziganshin, B. A. *et al.* Routine Genetic Testing for Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection in a Clinical Setting. *Ann Thorac Surg.* 100, 1604-1611 (2015).
- 290 Biesecker, L. G., Harrison, S. M. & ClinGen Sequence Variant Interpretation Working, G. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genet Med.* 20, 1687-1688 (2018).

- 291 Ghosh, R., Oak, N. & Plon, S. E. Evaluation of in silico algorithms for use with  
ACMG/AMP clinical variant interpretation guidelines. *Genome Biol.* 18, 225 (2017).
- 292 Vanakker, O., Callewaert, B., Malfait, F. & Coucke, P. The Genetics of Soft Connective  
Tissue Disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics.* 16, 229-255 (2015).
- 293 Chen, X. & Greenaway, F. T. Identification of the disulfide bonds of lysyl oxidase. *J  
Neural Transm (Vienna).* 118, 1111-1114 (2011).
- 294 Callewaert, B. L. *et al.* Comprehensive clinical and molecular assessment of 32 probands  
with congenital contractural arachnodactyly: report of 14 novel mutations and review of  
the literature. *Hum Mutat.* 30, 334-341 (2009).
- 295 Buchan, J. G. *et al.* Rare variants in FBN1 and FBN2 are associated with severe adolescent  
idiopathic scoliosis. *Hum Mol Genet.* 23, 5271-5282 (2014).
- 296 Baetens, M. *et al.* Applying massive parallel sequencing to molecular diagnosis of Marfan  
and Loeys-Dietz syndromes. *Hum Mutat.* 32, 1053-1062 (2011).
- 297 Sakai, H. *et al.* Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic  
aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology  
and next-generation sequencing. *Human Genetics.* 131, 591-599 (2011).
- 298 De Bondt, H. L. *et al.* Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature.* 363, 595-602  
(1993).
- 299 Song, H. *et al.* Phosphoprotein-protein interactions revealed by the crystal structure of  
kinase-associated phosphatase in complex with phosphoCDK2. *Mol Cell.* 7, 615-626  
(2001).
- 300 Havrilla, J. M., Pedersen, B. S., Layer, R. M. & Quinlan, A. R. A map of constrained  
coding regions in the human genome. *Nat Genet.* 51, 88-95 (2019).
- 301 Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M. & Barton, G. J. Jalview  
Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.*  
25, 1189-1191 (2009).
- 302 Ando, J. & Yamamoto, K. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial  
cells. *Cardiovasc Res.* 99, 260-268 (2013).
- 303 Hierck, B. P. *et al.* Primary cilia sensitize endothelial cells for fluid shear stress. *Dev Dyn.*  
237, 725-735 (2008).
- 304 Chen, X., Gays, D., Milia, C. & Santoro, M. M. Cilia Control Vascular Mural Cell  
Recruitment in Vertebrates. *Cell Rep.* 18, 1033-1047 (2017).
- 305 Kallakuri, S. *et al.* Endothelial cilia are essential for developmental vascular integrity in  
zebrafish. *J Am Soc Nephrol.* 26, 864-875 (2015).
- 306 Pepin, M. G. *et al.* Survival is affected by mutation type and molecular mechanism in  
vascular Ehlers-Danlos syndrome (EDS type IV). *Genet Med.* 16, 881-888 (2014).
- 307 Frank, M. *et al.* The type of variants at the COL3A1 gene associates with the phenotype  
and severity of vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Eur J Hum Genet.* 23, 1657-1664 (2015).
- 308 Gupta, A. K. *et al.* RAS-Mediated radiation resistance is not linked to MAP kinase  
activation in two bladder carcinoma cell lines. *Radiat Res.* 154(1), 64-72 (2000).
- 309 Jankevicius, G. *et al.* A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-  
ribosylation. *Nat Struct Mol Biol.* 20, 508-514 (2013).
- 310 Cohen, M., Feinstein, N., Wilson, K. L. & Gruenbaum, Y. Nuclear pore protein gp210 is  
essential for viability in HeLa cells and *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.* 14, 4230-  
4237 (2003).
- 311 Bretschneider, E., Spanbroek, R., Lotzer, K., Habenicht, A. J. & Schror, K. Evidence for  
functionally active protease-activated receptor-3 (PAR-3) in human vascular smooth  
muscle cells. *Thromb Haemost.* 90, 704-709 (2003).
- 312 David, Y., Ziv, T., Admon, A. & Navon, A. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes direct  
polyubiquitination to preferred lysines. *J Biol Chem.* 285, 8595-8604 (2010).

- 313 Omelchenko, T. & Hall, A. Myosin-IXA regulates collective epithelial cell migration by targeting RhoGAP activity to cell-cell junctions. *Curr Biol.* 22, 278-288 (2012).
- 314 Ababou, A. *et al.* Myosin Binding Protein C Positioned to Play a Key Role in Regulation of Muscle Contraction: Structure and Interactions of Domain C1. *J Mol Biol.* 384(3), 615-630 (2008).
- 315 Xie, Z., Xu, W., Davie, E. W. & Chung, D. W. Molecular Cloning of Human ABPL, an Actin-Binding Protein Homologue.pdf. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251(3), 914-919 (1998).
- 316 Mansilla, F. *et al.* Translation elongation factor eEF1A binds to a novel myosin binding protein-C-like protein. *J Cell Biochem.* 105, 847-858 (2008).
- 317 Vogt, J. *et al.* Protein associated with SMAD1 (PAWS1/FAM83G) is a substrate for type I bone morphogenetic protein receptors and modulates bone morphogenetic protein signalling. *Open Biol.* 4, 130210 (2014).
- 318 Ishibashi, K., Kanno, E., Itoh, T. & Fukuda, M. Identification and characterization of a novel Tre-2/Bub2/Cdc16 (TBC) protein that possesses Rab3A-GAP activity. *Genes Cells.* 14, 41-52 (2009).
- 319 Semba, K. *et al.* A novel murine gene, Sickie tail, linked to the Danforth's short tail locus, is required for normal development of the intervertebral disc. *Genetics.* 172, 445-456 (2006).
- 320 van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Dooijes, D. & Clevers, H. Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.* 10(1), 123-132 (1991).
- 321 Stöhr, H. *et al.* Cloning and characterization of WDR17, a novel WD repeat containing gene on chromosome 4q34. *Biochim Biophys Acta.* 1579, 18-25 (2002).
- 322 Yamamoto-Hino, M. *et al.* Cloning and characterization of human type 2 and 3 inositol 1,4,5-triphosphate receptors. *Receptors Channels.* 2, 9-22 (1994).
- 323 Mayeda, A. *et al.* Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 18(16), 4560-4570 (1999).
- 324 Hunter, S. G. *et al.* Essential role of Vav family guanine nucleotide exchange factors in EphA receptor-mediated angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 26, 4830-4842 (2006).
- 325 Lengacher, S. *et al.* Reactivity of murine and human recombinant LPS-binding protein (LBP) within LPS and gram negative bacteria. *J Inflamm.* 47(4), 165-172 (1995).
- 326 Markovich, D., Regeer, R. R., Kunzelmann, K. & Dawson, P. A. Functional characterization and genomic organization of the human Na(+)-sulfate cotransporter hNaS2 gene (SLC13A4). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326(4), 729-734 (2005).
- 327 Mattila, E. *et al.* Negative regulation of EGFR signalling through integrin- $\alpha$ 1 $\beta$ 1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat Cell Biol.* 7, 78-85 (2005).

## XI. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Abschnitte der humanen Aorta.....	4
<b>Abb. 2:</b> Zelluläre und extrazelluläre Komponenten der Aortenwand.....	6
<b>Abb. 3:</b> Funktionelle Klassifizierung von Krankheitsgenen für syndromale und nicht-syndromale TAAD.....	12
<b>Abb. 4:</b> Signalwege in der Pathogenese von TAAD. ....	18
<b>Abb. 5:</b> Schematische Darstellung des Ablaufes einer Exom-Sequenzierung. ....	21
<b>Abb. 6:</b> Bewertung und Klassifizierung von Sequenzvarianten nach ACMG/AMP Richtlinien. ....	27
<b>Abb. 7:</b> Mittels NGS analysierte Gene und deren Assoziation mit TAAD/HCTD.....	28
<b>Abb. 8:</b> Studienkohorte für NGS-Analyse von 32 ausgewählten Genen.....	29
<b>Abb. 9:</b> Stammbäume der mittels ES analysierten Familien #1 bis #8 (A-H).....	33
<b>Abb. 10:</b> Vorgehen zur Identifizierung von Sequenzveränderungen und Priorisierung von Kandidatengenen.....	59
<b>Abb. 11:</b> Zusammenfassung von 111 identifizierten Sequenzveränderungen in 32 analysierten Genen. ....	72
<b>Abb. 12:</b> Transkriptanalyse für die Sequenzveränderung <i>FBNI</i> c.1589-14A>G (Patient #14). ..	74
<b>Abb. 13:</b> Segregationsanalysen bei Familienangehörigen der Patienten #15, #124, #147, #95 und #151.....	76
<b>Abb. 14:</b> Diagnostische Ausbeute der NGS-Analyse von 32 HCTD Genen.....	82
<b>Abb. 15:</b> Das Kandidatengen <i>CDKL1</i> . ....	98
<b>Abb. 16:</b> Identifizierte Sequenzveränderungen in <i>CDKL1</i> betreffen hoch konservierte Aminosäuren in der Protein-Kinase-Domäne. ....	100
<b>Abb. 17:</b> Strukturelle Auswirkungen der <i>CDKL1</i> Mutanten p.Thr136Met, p.Cys144Arg und p.Ser207Leu. ....	103
<b>Abb. 18:</b> Funktionelle Analysen zur Phosphorylierung von SMAD3 durch <i>CDKL1</i> .....	105
<b>Abb. 19:</b> Auswirkungen von <i>CDKL1</i> <sup>WT</sup> und <i>CDKL1</i> Mutanten auf die endogene Expression und die Phosphorylierung von Regulatoren des Zellzyklus.....	107
<b>Abb. 20:</b> Analyse der Proliferation von HeLa Zellen in Abhängigkeit von <i>CDKL1</i> . ....	108
<b>Abb. 21:</b> Analyse der Kinase-Aktivität von <i>CDKL1</i> mit dem <i>in vitro</i> ADP-Glo™ Kinase System. ....	111
<b>Abb. 22:</b> Analyse unterschiedlicher Konzentrationen von rekombinantem <i>CDKL1</i> und <i>CDKL5</i> in einem PamGene®4-Experiment.....	113
<b>Abb. 23:</b> Peptide mit einer signifikant veränderten Phosphorylierung durch rekombinantes <i>CDKL1</i> in einem PamGene®4-Experiment.....	114
<b>Abb. 24:</b> PamGene®4-Experiment mit in HeLa-Zelllysaten transient exprimierten <i>CDKL1</i> Proteinvarianten. ....	116
<b>Abb. 25:</b> Immunhistologische Analyse der Expression von <i>CDKL1</i> in Aortenwandgewebe....	118
<b>Abb. 26:</b> ISV Fehlbildungen in Zebrafärblingen nach <i>zcdkl1</i> -Knockdown.....	121
<b>Abb. 27:</b> Bewertung von Sequenzvarianten nach ACMG/AMP Richtlinien. ....	IX
<b>Abb. 28:</b> Sequenzhomologien zwischen den Proteinen <i>CDKL1</i> , <i>GSK3A</i> und <i>GSK3B</i> . ....	XXXIV
<b>Abb. 29:</b> Immunfluoreszenz-Analyse von HeLa Zellen nach transienter Transfektion mit Plasmiden zur Expression von EGFP- <i>CDKL1</i> Fusionsproteinen.....	XXXV
<b>Abb. 30:</b> Immunhistologische Analyse der Expression von <i>CDKL1</i> in Aortenwandgewebe .....	XXXVI
<b>Abb. 31:</b> Expression von <i>zCdk11</i> in Zebrafärbling-Embryonen.....	XXXVII

## XII. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Klassifizierung, Prävalenz und Penetranz von hereditären Bindegeweberkrankungen mit/ohne kardiovaskulärer Beteiligung. ....	14
<b>Tab. 2:</b> Einhergehende Varianten bei 25 Patienten. ....	80
<b>Tab. 3:</b> Diagnostische Ausbeute .....	83
<b>Tab. 4:</b> Auffällige Sequenzvarianten in 8 Familien mit hereditären Erkrankungen des Bindegewebes.....	90
<b>Tab. 5:</b> Klinische Merkmale von Patienten mit einer <i>CDKLI</i> -Variante .....	127
<b>Tab. 6:</b> Liste der 32 mittels zielgerichteter NGS-Analyse untersuchten Gene.....	VIII
<b>Tab. 7:</b> Berichtenswerte Varianten, identifiziert in 199 Patienten mit hereditären Aortopathien oder verwandten Erkrankungen des Bindegewebes. ....	X
<b>Tab. 8:</b> Wahrscheinlich gutartige Varianten, identifiziert in 199 Patienten mit Aortopathien oder verwandten Erkrankungen des Bindegewebes. ....	XXI
<b>Tab. 9:</b> Varianten mit diskordanter Klassifizierung .....	XXIII
<b>Tab. 10:</b> Zusammenfassung berichtenswerter Varianten in 32 HCTD Genen.....	XXVII
<b>Tab. 11:</b> Mittels ES-Analyse eruierte Kandidatengene .....	XXVIII

**XIII. Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and genomics</i>
bp	Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
CCA	<i>congenital connective arachnodaktyly</i>
d. h.	das heißt
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ggf.	gegebenenfalls
EDS	Ehlers-Danlos Syndrom
ES	Exom-Sequenzierung
EZM	Extrazelluläre Matrix
GS	Genom-Sequenzierung
HCTD	<i>hereditary connective tissue disorder</i>
HGMD	Human Gene Mutation Database
IGV	Integrative Genomics Viewer
Indels	Insertionen und Deletionen
ISV	<i>intersomatic vessels</i>
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDS	Loeys-Dietz Syndrom
LPV	<i>likely pathogenic variant</i>
MFS	Marfan Syndrom
MGI	<i>Mouse Genome Informatics</i>
mRNA	Messenger-RNA
MW	<i>molecular weight</i>
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
o. e.	oben erwähnt
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PV	pathogene Variante
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROI	<i>region of interest</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SNVs	<i>single nucleotide variants</i>
TAAD	Thorakale(s) Aortenaneurysma und -dissektion
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierter Bereich
u. U.	unter Umständen
v. a.	vor allem
VCF	<i>variant call format</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
VUS	Variante unklarer Signifikanz
z. B.	zum Beispiel
ZFIN	<i>The Zebrafish Information Network</i>

## XIV. Anteilerklärung

Diese Dissertation wurde von Sina Renner im Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) verfasst mit Anmerkungen von PD Dr. Georg Rosenberger.

Die Patienten wurden durch Mitarbeiter der Marfan Sprechstunde im Universitären Herzzentrum (UHZ) und der Kinderkardiologie des UHZ sowie der Pädiatrischen Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) rekrutiert. Weitere Patienten stammten aus den folgenden Zentren in Deutschland: Klinik für Herz- und Gefäßkrankheiten am Katharinenhospital Stuttgart; Universitäres Gefäßzentrum – Bereich Angiologie und Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden; Institut für Humangenetik der Universität Ulm; Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Düsseldorf und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Kinderklinik Datteln der Universität Witten/Herdecke; Institut für Humangenetik der Universitätskliniken in Leipzig.

Die technische Durchführung des NGS-Gen-Panels fand durch Mitarbeiter der Molekulargenetischen Abteilung des Instituts für Humangenetik (UKE) meist im Rahmen eines diagnostischen Auftrages statt. Die Auswertung des Gen-Panels, die Interpretation der Varianten, in dieser Arbeit beschriebene Transkript- und Segregationsanalysen erfolgten durch Sina Renner. Die Daten aus diesen Analysen wurden u.a. durch Sina Renner in einem Manuskript zusammengefasst.

Die technische Durchführung der ES-Analysen erfolgte durch Mitarbeiter (u.a. Sina Renner) der Arbeitsgruppen von Prof. Kerstin Kutsche und PD Dr. Georg Rosenberger, durch das *Cologne Center for Genomics* (Köln) oder der Firma CeGaT (Tübingen). Die bioinformatische Prozessierung der Rohdaten einer Exom-Sequenzierung erfolgte durch Malik Alawi (Bioinformatik Facility des UKE). Sina Renner führte die Auswertung der ES-Analysen sowie die Interpretation der Varianten durch.

Funktionelle Mutationsanalysen wurden durch Verena Kolbe (Ergebnisse Kapitel 2.6.1), Sina Renner (Ergebnisse Kapitel 2.6.2 und 2.6.3) und PD Dr. Melanie Philipp (Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Ulm; Ergebnisse Kapitel 2.6.6) durchgeführt. Interaktive *in silico* Strukturanalysen mithilfe der UCSF Chimera Software erfolgten durch Sina Renner.

Die Präprozessierung des PamGene<sup>®</sup>4-Arrays sowie die anschließende Kinase-Profil-Analyse auf einer PamStation<sup>®</sup>12 wurde durch Dr. Malte Kriegs und Konstantin Hoffer im Labor für Strahlenbiologie & experimentelle Radioonkologie (UKE) durchgeführt. Die Interpretation der Daten erfolgte durch Sina Renner.

Humanes Aortengewebe wurde von Prof. Evaldas Girdauskas (Universitäres Herz-Zentrum des UKE) zur Verfügung gestellt. Die Fixierung und die Paraffin-Einbettung des Gewebes sowie die Herstellung von Paraffinschnitten erfolgte durch Sina Renner in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Experimentellen Morphologie (UKE). Alle Färbungen wurden von Dr. Susanne Krasemann und Kristin Hartmann in der Mauspathologie Facility des UKEs durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung der Färbungen erfolgte durch Sina Renner.

PD Dr. rer. nat. Georg Rosenberger  
(Betreuer)

## **XV. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich bin damit einverstanden, dass die Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Hamburg, März 2019

## **XVI. Datenpräsentation auf Kongressen**

Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen und Fortbildungen präsentiert:

**Renner S, Schüler H, Alawi M, Kolbe V, Rybczynski M, Woitschach R, Sheikhzadeh S, Stark VC, Olfe J, Roser E, Seggewies FS, Mahlmann A, Hempel M, Hartmann M, Hillebrand M, Wieczorek D, Volk AE, Kloth K, Koch-Hogrebe M, Abou Jamra R, Mitter D, Altmüller J, Wey-Fabrizius A, Petersen C, Rau I, Borck G, Kubisch C, Mir TS, von Kodolitsch Y, Kutsche K, Rosenberger G.** (März 2019). *Next-generation sequencing of 32 genes associated with hereditary aortopathies and related disorders of connective tissue in a cohort of 199 patients.* 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GFH), Weimar.

**Renner S, Schüler H, Alawi M, Kolbe V, Rybczynski M, Woitschach R, Sheikhzadeh S, Stark VC, Olfe J, Roser E, Seggewies FS, Mahlmann A, Hempel M, Hartmann M, Hillebrand M, Wieczorek D, Volk AE, Kloth K, Koch-Hogrebe M, Abou Jamra R, Mitter D, Altmüller J, Wey-Fabrizius A, Petersen C, Rau I, Borck G, Kubisch C, Mir TS, von Kodolitsch Y, Kutsche K, Rosenberger G.** (November 2018). *Next-generation sequencing of 32 genes associated with hereditary aortopathies and related disorders of connective tissue in a cohort of 199 patients.* Arbeitstreffen Norddeutscher Humangenetiker, Hamburg.

**Renner S, Busch A, Bierhals T, Butter J, Kolbe V, Rosenberger G.** (März 2017). *Molecular pathogenesis of TAAID – Identification of novel disease genes by Whole Exome Sequencing.* 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GFH), Bochum.

**Renner S, Rosenberger G, Bierhals T, von Kodolitsch Y, Schüler H & Rybczynsky M.** (Juli 2016). *Molecular pathogenesis of TAAID – An outline of the research project.* Medical Genetics Summer School – From Next Generation Sequencing to Translational Medicine in Neurological Disease Research, Tübingen.

## **XVII. Danksagung**

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Georg Rosenberger für die engagierte und qualifizierte Betreuung dieser Arbeit, für die vielen konstruktiven Anregungen und ganz besonders für die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken. Deine Hilfe und Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Dr. Susanne Dobler möchte ich mich für das bereitwillige Übernehmen der Zweitbetreuung und für die Begutachtung der Dissertation bedanken.

Prof. Dr. Christian Kubisch danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Verena Kolbe. Du warst meine Laborheldin! Ich danke Dir für Deine großartige Unterstützung bei Experimenten und ganz alltäglichen Aufgaben im Labor. Wenn ich dich nicht gehabt hätte... :-)

Ein herzliches Dankeschön an das ganze Team AG Kutsche/Rosenberger. Liebe Verena, Rike, Pauline, Leonie, Inki, Tess, lieber Dennis und alle, die nicht mehr da sind, es war mir eine große Freude, euch mit „Glückshormonen“ zu versorgen. Es ist einfach großartig, mit einem so tollen Team zusammenzuarbeiten. Die Zeit mit Euch wird mir immer in Erinnerung bleiben!

Ein riesiges bioinformatisches Dankeschön geht an Malik Alawi. Danke für Deine Geduld mit mir als Nicht-Bioinformatikerin.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Kerstin Kutsche und Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp für Rat und Tat in genetischen und experimentellen Fragen sowie die konstruktiven Anregungen im 3-AG Seminar bedanken.

Ein Dank geht auch an alle derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter des Institutes für Humangenetik, die alle wenn nötig mit Ideen, Protokollen oder Laborreagenzien ausgeholfen haben. Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Melanie Philipp, Dr. Malte Kriegs und Dr. Susanne Krasemann für die Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei Dir Fabian, bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ihr wart stets da, wenn ich Aufmunterung brauchte und natürlich auch, wenn es etwas zu feiern gab!