

Aus dem
Medizinisch Genetischen Zentrum
München
Direktorin: Prof. Dr. Dipl.-Chem. Elke Holinski-Feder

**Next Generation Sequencing bei kongenitalen
Augenfehlbildungen: Identifizierung genetischer
Ursachen und Vergleich unterschiedlicher
panelbasierter Diagnostikstrategien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lukas-Emanuel Benedikt Neuhann

aus
München
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dipl.-Chem. Elke Holinski-Feder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Ohlmann

Prof. Dr. Marcus Kernt

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	4
Summary	7
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
A Einleitung	13
1 Ursachen und Auswirkungen kongenitaler Augenfehlbildungen.....	13
2 Relevanz und Schwierigkeiten der Diagnostik	14
3 Ziel der Arbeit.....	15
B Grundlagen	17
1 Embryogenese des Auges	17
1.1 Neurulation und primäre Augenanlagen.....	17
1.2 Augenbecher und Linsenbläschen	18
1.3 Mesenchymale Differenzierung der vorderen Augenabschnitte.....	19
1.4 Augenbecherspalte und Blutversorgung	19
1.5 Netzhaut und Aderhaut.....	20
1.6 Entwicklung von Muskeln, Lidern, Orbita	21
1.7 Genetische Regulation und der embryonalen Augenentwicklung.....	21
2 Konsequenzen genetischer Fehlregulation.....	22
2.1 Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom-Spektrum	22
2.1.1 Klinische Aspekte	22
2.1.2 Genetik	24
2.2 Vorderabschnittsdysgenesien	25
2.2.1 Klinische Aspekte	25
2.2.2 Genetik	26
2.3 Kongenitales Glaukom	27
2.3.1 Klinische Aspekte	27
2.3.2 Genetik	28
2.4 Kongenitale Katarakt	28
2.4.1 Klinische Aspekte	28

2.4.2	Genetik	29
3	Genetische Diagnostik	30
3.1	Next Generation Sequencing	30
3.2	MLPA.....	31
C	Material und Methoden	32
1	Studienpopulation	32
2	Datenerhebung und -auswertung.....	32
2.1	Vorbefundliche Diagnostik.....	32
2.2	Erweiterte Auswertung der Sequenzdaten.....	32
3	Exom-Sequenzierung.....	34
3.1	DNA-Extraktion.....	34
3.2	DNA-Präparation und Anreicherung.....	34
3.3	DNA-Sequenzierung.....	34
3.4	Bioinformatische Auswertung	35
4	Auswertung und Klassifizierung der Sequenzvarianten.....	36
4.1	HPO-basierte Auswertung.....	36
4.2	ACMG-Klassifizierung	38
D	Ergebnisse	39
1	Untersuchte Studienpopulation	39
2	Ergebnisse der Sequenzierung.....	40
2.1	Ergebnisse der Primärdiagnostik.....	42
2.2	Ergebnisse des Augen-Gesamtpanels.....	42
2.3	Ergebnisse der Exomanalyse.....	42
3	Ergebnisse nach phänotypischer Ausprägung.....	46
3.1	Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom-Spektrum (MAC).....	46
3.2	Vorderabschnittsdysgenesien (ASD) und Kongenitales Glaukom (PCG) ..	49
3.3	Kongenitale Katarakt (CC).....	53
4	Diagnostic Yield	56
4.1	Diagnostic Yield pro Diagnoseschritt.....	56
4.2	Diagnostic Yield pro Phänotyp	57
5	Unklare Sequenzvarianten und Kandidatengene.....	59
E	Diskussion	63
1	Aufklärung von kongenitalen Augenfehlbildungen durch NGS	63

1.1	Diagnostic yield durch NGS.....	63
1.2	Diagnostic yield für einzelne Phänotyp-Gruppen	65
2	Identifikation seltener und neuer Genotyp-Phänotyp Assoziationen und bisher unbekannter Ursachen kongenitaler Augenfehlbildungen	67
2.1	CYP1B1.....	67
2.2	ADAMTS18.....	68
2.3	GCNT2	70
2.4	COL4A1.....	71
2.5	PAX6	71
2.6	NHS.....	72
2.7	MAB21L2.....	73
2.8	MFRP	74
2.9	CRYBB1	75
2.10	FAT1.....	76
2.11	POGZ	76
2.12	COL18A1	77
3	Schlussfolgerungen für die Klinik	78
3.1	Rolle von NGS bei kongenitalen Augenfehlbildungen.....	78
3.2	Phänotyp-übergreifende Genpanels als diagnostischer Standard	78
3.2.1	Vorteile stufenweiser Auswertung auf WES-Basis	79
3.2.2	Schwierigkeiten der NGS-Diagnostik	81
3.3	Bedeutung interdisziplinärer Diagnosestellung und Zusammenarbeit	82
3.4	Relevanz der genetischen Diagnosestellung	83
4	Limitationen der Studie	85
5	Fazit	86
	Literaturverzeichnis.....	87
	Anhang A: Genpanels	100
	Anhang B: ACMG-Kriterien.....	102
	Anhang C: Klinische Merkmale ungeklärter Patienten	105
	Danksagung	106
	Eidesstattliche Versicherung	107

Zusammenfassung

Kongenitale Augenfehlbildungen wie das Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom-Spektrum (MAC), Vorderabschnittsdysgenesien (ASD), das kongenitale Glaukom (PCG) und kongenitale Katarakte (CC) können bereits in früher Kindheit zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen des Sehvermögens führen. Die phänotypische Variabilität und Heterogenität mit weit über 100 assoziierten Genen erschweren bis heute häufig die Diagnosefindung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die genetischen Grundlagen angeborener Augenfehlbildungen durch Auswertung von Next-Generation-Sequencing (NGS)-Daten weiter aufgeklärt und verschiedene Strategien zur Diagnostik dieser Erkrankungen mittels NGS miteinander verglichen werden. Im Einzelnen wurden dabei folgende Punkte untersucht:

- (1) *Abklärung bekannter Ursachen kongenitaler Augenfehlbildungen und Aufklärungsrate mittels verschiedener Gen-Panels: Vergleich eines Phänotyp-übergreifenden Multigen-Panels (MGP) und der Exomanalyse mit der in der bisherigen klinischen Routine durchgeführten Phänotyp-spezifischen Primärdiagnostik (PD).*
- (2) *Genotyp-Phänotyp Assoziationen von Ursachen kongenitaler Augenfehlbildungen: Genauere Definition und Erweiterung des möglichen klinischen Spektrums bestimmter genetischer Veränderungen.*
- (3) *Identifikation bisher unbekannter genetischer Ursachen kongenitaler Augenfehlbildungen: Suche nach Veränderungen in potentiellen neuen Kandidatengenen und in bereits in der Routinediagnostik enthaltenen Genen, die bisher nicht spezifisch mit Augenfehlbildungen assoziiert wurden.*

Eingeschlossen wurden Patienten mit MAC, ASD, PCG oder CC, bei denen eine genetische Primärdiagnostik (PD) mittels Analyse einzelner Gene bzw. kleiner Phänotyp-spezifischer Panels auf NGS-Basis erfolgt war. Bei ergebnisloser PD erfolgte eine ergänzende Auswertung der bereits vorliegenden Sequenzdaten mit einem 186 Gene umfassenden augenspezifischen Multigen-Panel (MGP) und im nächsten Schritt eine Exomanalyse. Die Auswertung erfolgte in standardisierter Reihenfolge mithilfe der Human Phenotype Ontology (HPO)-Terminologie und des Klassifizierungssystems des American College of Medical Genetics (ACMG).

Von 40 untersuchten Indexpatienten konnten in PD, MGP und Exom in insgesamt 17 Fällen (42,5%) ursächliche Varianten in insgesamt 12 Genen (*MAB21L2*, *BCOR*, *NHS*, *MFRP*, *PRSS56*, *FOXC1*, *PITX2*, *CYP1B1*, *ADAMTS18*, *COL4A1*, *PAX6*, *GCNT2*) und in 6 weiteren Fällen (15%) relevante Varianten unklarer Signifikanz (VUS) in insgesamt 5 Genen (*POGZ*, *COL18A1*, *FAT1*, *CRYBB1*, *MFRP*) nachgewiesen werden. In insgesamt 17 Fällen (42,5%) konnte auch nach sequentieller Analyse von PD, MGP und Exom keine ursächliche Variante oder Phänotyp-relevante VUS nachgewiesen werden.

In der **Primärdiagnostik** konnten bei allen untersuchten Patienten (n=40) aus allen phänotypischen Gruppen in den jeweils analysierten Gen-Panels in 6 Fällen eine ursächliche Variante gefunden werden, was in der Summe einem diagnostic yield von 15% entspricht. Im **Augen-Gesamtpanel** (n=34) mit 186 Genen konnten in 10 zusätzlichen Fällen ursächliche Varianten gefunden werden, sodass der isolierte diagnostic yield für dieses Panel bei 29% und der kumulative diagnostic yield inklusive der vorangegangenen PD bei 40% liegt. Hierbei ist anzumerken, dass alle Gene aus den unterschiedlichen Gen-Panels der PD im Augen-Gesamtpanel enthalten sind. In der **Exomanalyse** (n=24) konnte in einem weiteren Fall eine ursächliche Variante gefunden werden, was einen isolierten diagnostic yield von 4% und einen kumulativen diagnostic yield für PD, MGP und Exom von 43% ergibt.



Bezüglich der einzelnen Phänotypen ergab sich die höchste Aufklärungsrate bei CC mit 75%, gefolgt von ASD/ PCG mit 43% und MAC mit 36%.

Über alle Phänotypen konnten bei Patienten mit unilateraler Krankheitsausprägung kein einziger Fall aufgeklärt werden, während bei Patienten mit bilateraler Ausprägung in fast der Hälfte der Fälle (46%) eine ursächliche Variante gefunden wurde. Bei Patienten mit komplexeren okulären Phänotypen war die Aufklärungsrate höher (78%) als bei Patienten mit einfachem okulärem Phänotyp (32%), bei Patienten mit extraokulären Auffälligkeiten konnten insgesamt mehr Fälle ursächlich geklärt werden (55%) als bei Patienten mit isoliert okulärem Phänotyp (38%). Bei

positiver Familienanamnese konnten mehr Fälle ursächlich geklärt werden (70%) als bei negativer Familienanamnese (33%).

Bisher selten beschriebene und mögliche neue Genotyp-Phänotyp Assoziationen konnten in mehreren Genen (*CYP1B1*, *ADAMTS18*, *COL4A1*, *PAX6*, *NHS*, *MAB21L2*, *MFRP*, *FAT1*, *POGZ*, *COL18A1*) identifiziert und näher bestimmt werden; zudem ergaben sich neue mögliche Kandidatengene (*FAT1*, *POGZ*) im Zusammenhang mit kongenitalen Augenfehlbildungen. Dabei konnten insgesamt 8 (wahrscheinlich) pathogene Varianten in 6 Genen (*CYP1B1*, *ADAMTS18*, *MAB21L2*, *NHS*, *MFRP*, *CRYBB1*) erstmalig beschrieben werden.

Die Ergebnisse bestätigen die hohe genotypische und phänotypische Heterogenität von angeborenen Augenfehlbildungen. Ein Phänotyp-übergreifendes Multigen-Augenpanel bzw. die Exomanalyse führen in diesem Patientenkollektiv gegenüber Phänotyp-spezifischen kleineren Genpanels zu deutlich höheren Aufklärungsraten, wobei sich durch die Exomanalyse gegenüber dem MGP nur ein einziger weiterer Fall aufklären ließ. Daher empfiehlt sich für die klinische Routinediagnostik bei kongenitalen Augenfehlbildungen die primäre Auswertung eines Multigen-Augenpanels auf WES-Basis mit möglicher anschließender Exom-Analyse im Einzelfall. Diese stufenweise Analyse auf WES-Basis ermöglicht auch ggf. eine Nachanalyse anhand der bereits sequenzierten Daten, wenn im Verlauf neue pathogene Mechanismen und Kandidatengene bekannt werden. Die genaue genetische Diagnosestellung ist für Prognose, Therapie, Risiko für Komorbiditäten und Lebens- und Familienplanung der Betroffenen von entscheidender Bedeutung. Daher sollte eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Augenheilkunde und Humangenetik stattfinden und die genetische Ursachenklärung bei Verdacht auf eine kongenitale Augenfehlbildung immer eingeleitet werden.

Summary

Congenital eye malformations, such as the microphthalmia-anophthalmia-coloboma spectrum (MAC), anterior segment dysgenesis (ASD), congenital glaucoma (PCG) and congenital cataracts (CC) can cause severe visual impairment from early childhood. Due to phenotypic variability and heterogeneity, with known causative variants in more than 100 genes, establishing a diagnosis in affected patients is often difficult. The aim of this study was to further identify the genetic causes of congenital eye malformations on the base of Next Generation Sequencing (NGS) data and to compare clinical strategies for the diagnosis of these diseases by means of NGS.

The aim of this study was to further identify the genetic causes of congenital eye malformations on the base of Next Generation Sequencing (NGS) data and to compare clinical strategies for the diagnosis of these diseases by means of NGS. In detail the following points were analyzed:

- (1) *Workup of known causes of congenital eye malformations and diagnostic yield of different gene panels:* Comparison of a phenotype-spanning multigene-panel (MGP) and exome analysis with phenotype-specific primary diagnostic tests (PD) used in clinical routine until now.
- (2) *Genotype-phenotype correlations in congenital eye malformations:* Detailed definition and expansion of the possible clinical spectrum of certain genetic variations.
- (3) *Identification of unknown causes of congenital eye malformations:* Search for variants in potential new candidate genes and in genes already included in routine diagnostic testing but not yet specifically associated with eye malformations.

Patients with MAC, ASD, PCG or CC, who had already undergone primary genetic diagnostic testing (PD) by analyzing single genes or small phenotype-specific panels based on NGS, were included. If PD did not yield results, a stepwise analysis of an eye specific multigene-panel (MGP) containing 186 genes and in the next step exome analysis followed. The analysis ensued in standardized order using the Human Phenotype Ontology (HPO) terminology and the variant classification system the American College of Medical Genetics (ACMG).

Out of 40 included patients PD, MGP and exome yielded causative variants in 17 cases (42,5%) in a total of 12 genes (*MAB21L2*, *BCOR*, *NHS*, *MFRP*, *PRSS56*, *FOXC1*, *PITX2*, *CYP1B1*, *ADAMTS18*, *COL4A1*, *PAX6*, *GCNT2*) and relevant variants of unknown significance (VUS) in 6 more cases (15%) in a total of 5 genes (*POGZ*, *COL18A1*, *FAT1*, *CRYBB1*, *MFRP*). In 17 cases (42,5%) sequential analysis of PD, MGP and exome yielded no causative variant or phenotype-specific VUS.

Primary diagnostic testing revealed causative variants in 6 cases out of all analyzed patients (n=40) across alle phenotypic groups in the respective gene panels, which corresponds to a diagnostic yield of 15%. The **eye specific MGP** (n=34) containing 186 genes revealed causative variants in 10 additional cases, which corresponds to an isolated diagnostic yield of 29% for this panel and a cumulative diagnostic yield including PD of 40%. Of notice, all genes from the different PD gene panels were also contained in the MGP. **Exome analysis** (n=24) revealed a causative variant in on more case, corresponding to an isolated diagnostic yield of 4% and a cumulative diagnostic yield for PD, MGP and exome of 43%.



Phentype-wise, the highest diagnostic yield was associated with CC (75%), followed by ASD/PCG (43%) and MAC (36%).

Across all phenotypes no case with unilateral disease could be cleared, while in almost half of bilateral cases causative variants could be found (46%).

Diagnostic yield was higher in patients with complex ocular phenotypes (78%) compared to simple ocular phenotypes (32%) and in patients with extraocular disease manifestations (55%) compared to isolated ocular phenotypes (38%).

Diagnostic yield was also higher in cases with positive family history (70%) than in cases with negative family history (33%).

Rare and possible new genotype-phenotype correlations could be identified and described in detail in several genes (*CYP1B1*, *ADAMTS18*, *COL4A1*, *PAX6*, *NHS*, *MAB21L2*, *MFRP*, *FAT1*, *POGZ*, *COL18A1*). Additionally possible new candidate genes (*FAT1*, *POGZ*) were found in connection with congenital eye malformations. In

total, 8 (most probably) pathogenic variants in 6 genes (*CYP1B1*, *ADAMTS18*, *MAB21L2*, *NHS*, *MFRP*, *CRYBB1*) were novel.

Our results confirm the high genotypic and phenotypic heterogeneity of congenital eye malformations. In this patient collective, a phenotype-spanning multigene-panel and exome analysis lead to a much higher diagnostic yield as opposed to smaller phenotype-specific panels, although exome analysis only yielded one more causative variant as opposed to the MGP. Therefore, in clinical routine diagnostics it is especially advisable to use a combined approach with primary analysis of an MGP on the base of exome-sequencing with possible sequential exome analysis in selected cases. Through this stepwise approach it is possible to perform ancillary analysis on the base of already sequenced data if new pathogenic mechanisms or candidate genes become evident later on.

An exact genetic diagnosis is essential for the prognosis, therapy, risk for comorbidities and life and family planning for affected patients. Thus, there should be close interdisciplinary cooperation between ophthalmologists and geneticists and genetic testing should always ensue if a congenital eye malformation is suspected.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <u>Bildung des Neuralrohrs und primäre Augenanlage</u>	18
Abbildung 2: <u>Zeitliche Abfolge der Embryonalentwicklung des Auges</u>	20
Abbildung 3: <u>Einteilung der Mikrophthalmie-Phänotypen</u>	23
Abbildung 4: <u>Unterschiedliche Kolobom-Phänotypen</u>	24
Abbildung 5: <u>Klinische Ausprägung von Vorderabschnittsdysgenesien</u>	26
Abbildung 6: <u>Buphthalmus und Haab-Striae</u>	27
Abbildung 7: <u>Klinische Ausprägungen von kongenitalen Katarakten</u>	29
Abbildung 8: <u>Hierarchische Struktur der HPO-Terminologie</u>	37
Abbildung 9: <u>Kategoriale Einteilung der Studienpopulation</u>	39
Abbildung 10: <u>Klinische Merkmale der Studienpopulation</u>	40
Abbildung 11: <u>Gesamtergebnis</u>	41
Abbildung 12: <u>Systematik der erhobenen Ergebnisse</u>	41
Abbildung 13: <u>Verteilung klinischer Merkmale bei Patienten MAC und ASD/PCG</u> ..	52
Abbildung 14: <u>Ergebnisse der Segregationsanalysen</u>	54
Abbildung 15: <u>Bilder der phänotypischen Ausprägungen</u>	55
Abbildung 16: <u>Diagnostic Yield pro Diagnoseschritt</u>	57
Abbildung 17: <u>Diagnostic Yield pro Phänotyp</u>	58
Abbildung 18: <u>Diagnostic Yield pro Subgruppe</u>	58
Abbildung 19: <u>Segregationsanalyse und Phänotypen bei VUS</u>	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Typische HPO-Terms mit standardisierter Identifikationsnummer ...	37
Tabelle 2: Ergebnisse der Primärdiagnostik :.....	43
Tabelle 3: Ergebnisse des Augen-Gesamtpanels :.....	44
Tabelle 4: Ergebnisse der Exomanalyse	45
Tabelle 5: Klinische Merkmale der Patienten mit MAC	46
Tabelle 6: Klinische Merkmale der Patienten mit ASD/PCG	50
Tabelle 7: Klinische Merkmale der Patienten mit CC	53
Tabelle 8: Varianten unklarer Signifikanz und Kandidatengene	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	= Abbildung
ACMG	= American College of Medical Genetics
AD	= Autosomal-Dominant
AR	= Autosomal-Rezessiv
ARS	= Axenfeld-Rieger-Syndrom
ASD	= Vorderabschnittsdysgenese
Assoz.	= Assoziiert
Bp	= Basenpaare
Bzgl.	= Bezüglich
Bzw.	= Beziehungsweise
Ca.	= Circa
CC	= Kongenitale Katarakt
D.h.	= Das heißt
Engl.	= Englisch
FA	= Familienanamnese
FS	= Frameshift
Ggf.	= Gegebenenfalls
Ggü.	= Gegenüber
Hem	= Hemizygot
Het	= Heterozygot
Hom	= Homozygot
HOX	= Homöobox
HPO	= Human Phenotype Ontology
InDel	= Insertion/ Deletion
Inkl.	= Inklusiv
IOD	= Intraokulardruck
Kap.	= Kapitel
KILD	= Keratoiridolentikuläre Dysgenese
Kb	= Kilobase
LOF	= Loss of Function
MAC	= Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom-Spektrum
MGP	= Multigen-Panel
MGZ	= Medizinisch Genetisches Zentrum

MLPA	= Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
Mm.	= Musculi
N.B.	= in Literatur/ Datenbanken bisher nicht beschrieben
NGS	= Next Generation Sequencing
NHS	= Nance-Horan-Syndrom
OCT	= Optische Kohärenztomographie
PCG	= Primäres kongenitales Glaukom
PCR	= Polymerase-Kettenreaktion
PD	= Primärdiagnostik
PHPV	= Persistierender hyperplastischer primärer Glaskörper
PM	= Posteriorer Mikrophthalmos
POM	= Periokuläres Mesenchym
RAM	= Relativer Anteriorer Mikrophthalmos
SNV	= Single Nucleotide Variant
Sog.	= Sogenannte
S.u.	= Siehe unten
Tab.	= Tabelle
U.a.	= Unter anderem
V.a.	= Verdacht auf
Vgl.	= Vergleiche
VUS	= Variant of Uncertain Significance
WES	= Whole Exome Sequencing
WGS	= Whole Genome Sequencing
XLD	= X-Chromosomal-Dominant
XLR	= X-Chromosomal-Rezessiv
Z.B.	= Zum Beispiel
ZNS	= Zentrales Nervensystem

A Einleitung

1 Ursachen und Auswirkungen kongenitaler Augenfehlbildungen

Trotz der stetigen Weiterentwicklung der modernen Augenheilkunde stellen kongenitale Augenfehlbildungen häufig eine große diagnostische und therapeutische Herausforderung dar. Sie führen bei betroffenen Patienten¹ oft schon früh im Leben zu Beeinträchtigungen des Sehvermögens, häufig von erheblichem Ausmaß, wodurch wiederum die normale kindliche Entwicklung erschwert werden kann.

Zu den klinisch häufigsten kongenitalen Augenfehlbildungen der Augen zählen die primären Anlagestörungen aus dem Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom-Spektrum (MAC), der Formenkreis der Vorderabschnittsdysgenesien (ASD) und das kongenitale Glaukom (PCG) sowie die kongenitale Katarakt (CC).²

Auch wenn jede einzelne dieser Augenfehlbildungen für sich genommen selten ist (z.B. Prävalenz MAC 0,3-0,66:10.000 (1), CC 3,5-15:10.000 (2,3)) so sind sie in Summe jedoch mit die häufigste Ursache für Beeinträchtigungen des Sehvermögens im Kindesalter (2,4–6). Allein die CC ist eine der häufigsten Ursachen für Blindheit im Kindesalter weltweit (3,7).

Die Ursachen dieser kongenitalen Augenfehlbildungen sind extrem heterogen (3,4), neben externen Ursachen (insbesondere intrauterine Infektionen) ist ein Großteil jedoch primär genetisch bedingt (8). Die verschiedenen klinischen Entitäten können isoliert vorliegen, jedoch oft auch in Kombination (z.B. Mikrophthalmie mit Katarakt und Vorderabschnittsdysgenese) oder im Rahmen übergeordneter, komplexer Syndrome mit zusätzlichen extraokulären Auffälligkeiten (2,9,10).

Aufgrund dieser ausgeprägten Heterogenität – bisher sind für die verschiedenen Phänotypen der kongenitalen Augenfehlbildungen weit über 100 Gene beschrieben (9) – ist die molekulargenetische Diagnosefindung erschwert (3,4). Auch kann eine angeborene okuläre Anomalie Erst- oder Hauptsymptom einer syndromalen Grunderkrankung sein, deren weitere Symptome sich erst im Verlauf zeigen, sodass der Augenbefund maßgebend für die Diagnosefindung ist (2). Nicht zuletzt ist die

¹ Im Folgenden wird der Begriff „Patient“ geschlechtsneutral verwendet und bezieht sich auf alle Geschlechtsidentitäten, soweit nicht explizit eine konkrete Geschlechtsform verwendet wird.

² Im Rahmen der Arbeit werden einheitlich die in der Literatur etablierten englischen Abkürzungen MAC (Microphthalmia-Anophthalmia-Coloboma), ASD (Anterior Segment Dysgenesis), PCG (Primary Congenital Glaucoma) und CC (Congenial Cataract) verwendet.

Zuordnung des Phänotyps zu einer der klassischen, klinisch definierten Entitäten nicht immer möglich, da Phänotypen häufig überlappen und längst nicht alle Patienten typische klinische Symptomatik und Befunde aufweisen (7). Dies erschwert bis heute in vielen Fällen die Aufklärung der Ursachen der kongenitalen Fehlbildungen (11); bei ca. der Hälfte der Patienten kann bisher trotz umfangreicher Diagnostik die Ursache für die kongenitale Augenfehlbildung nicht gefunden werden (9,12).

2 Relevanz und Schwierigkeiten der Diagnostik

Eine klare Zuordnung der Ursache von angeborenen Augenfehlbildungen ist essentiell, um die Betroffenen und deren Familien bezüglich Kausalität und Wiederholungsrisiken (für Nachkommen oder Geschwister) beraten und Aussagen zu Verlauf und Visus-Prognose treffen zu können (2,13); zudem können nur so mögliche zusätzliche Symptome bzw. Risiken, die sich erst im Verlauf manifestieren, sicher eingeschätzt werden (z.B. Risiko für Narkosekomplikationen bei *CTDP1*-assoziierter Katarakt (14), Risiko für juvenile Schlaganfälle bei *COL4A1*-assoziierter ASD (15), Risiko für Epilepsie und Taubheit im Zusammenhang mit *SOX2* (16)).

Erst dadurch kann die optimale Betreuung von betroffenen Patienten und Familien sichergestellt werden. Zudem werden zunehmend Therapieansätze auf molekulargenetischer Basis entwickelt - im Falle der Augenfehlbildungen seien hier die vielversprechenden Therapieansätze mit Gentamicin und Ataluren bei *PAX6*-assoziierter Aniridie genannt (17). Im Bereich der erblichen Netzhauterkrankungen werden mittlerweile erste klinisch anwendbaren Therapien auf genetischer Basis entwickelt (u.a. Voretigen Neparvovec bei *RPE65*-assozierten Netzhautdystrophien (18)), was nicht zuletzt an der immer höheren genetischen Aufklärungsrate liegt. Weitere Therapien können nur entwickelt und für Patienten zugänglich gemacht werden, wenn die molekulare Ursache für die Augenfehlbildung bekannt ist (2). Nicht zuletzt ist allein aufgrund des menschlichen Kausalitätsbedürfnisses auch ohne direkte klinische Konsequenzen für die absolute Mehrzahl der Betroffenen eine eindeutige Klärung der Ursache ihrer Erkrankung von sehr hoher Bedeutung.

Aufgrund der Heterogenität der Ursachen sowie auch aus Gründen der Wirtschaftlichkeit und Praktikabilität wurden in der Routinediagnostik von

kongenitalen Augenfehlbildungen vor Einführung der modernen Sequenziertechniken (Next Generation Sequencing, NGS) in aller Regel nur einzelne Gene, die besonders häufig ursächlich verändert sind, mittels Einzelgenanalyse (Sanger-Sequenzierung) analysiert, und dies meist nur bei bestimmten definierten Phänotypen, sodass bei einer großen Zahl der Patienten die Ursache ungeklärt blieb (2,19–21).

Mittels NGS-basierten Analysemethoden können nun zahlreiche Gene bis zum gesamten Exom oder Genom parallel analysiert werden (9,22,23). Nach der Einführung der NGS-Technologie in der Routinediagnostik war bis Januar 2021 nur die Analyse einer begrenzten Anzahl von Genen, die mit einem bestimmten Phänotyp assoziiert ist, vorgesehen: gesetzlich versicherten Patienten stand als reguläre diagnostische Leistung eine Untersuchung von Genen bis zu 25 Kilobasen (kb) kodierender Sequenz zur Verfügung, was in der Regel ca. 4-7 Genen entspricht (24). Dadurch konnte folglich nur ein geringer Teil der zahlreichen Gene, die angeborene Augenfehlbildungen verursachen können, in der Routinediagnostik analysiert werden.

Da bisher oft keine ausreichend guten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen und Prävalenzen der einzelnen genetischen Ursachen vorliegen, diese zudem überlappen und die beschriebenen Phänotypen extrem heterogen, d.h. eine Vielzahl von verschiedenen Genen ursächlich verändert sein können, gestaltete sich eine Auswahl der zu untersuchenden Gene oft sehr schwierig (4,23,25). Weiterhin gibt es nach wie vor unbekannte genetische Ursachen für angeborene Augenfehlbildungen (26), die per se im Rahmen der Routinediagnostik bzw. der strikt Phänotyp-basierten Auswahl von Genen nicht miterfasst werden können.

3 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der Arbeit sollen die genetischen Grundlagen angeborener Augenfehlbildungen durch Auswertung von NGS-Daten weiter aufgeklärt und verschiedene klinische Strategien zur Diagnostik dieser Erkrankungen mittels NGS miteinander verglichen werden. Tieferes Verständnis von Krankheitsursachen kann zu besseren Aussagemöglichkeiten hinsichtlich Prognose, Therapie und Vererbungswahrscheinlichkeit und somit einer möglichst optimalen klinischen Versorgung betroffener Patienten in Richtung der personalisierten Medizin führen,

sowie als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten dienen. Im Einzelnen sollen dabei folgende Punkte untersucht werden:

- Abklärung bekannter Ursachen kongenitaler Augenfehlbildungen und Aufklärungsrate mittels verschiedener Gen-Panels:

Für Patienten die von den kongenitalen Augenfehlbildungen MAC, ASD/PCG oder CC betroffen sind, soll evaluiert werden, ob und in wieweit durch Analyse eines Phänotyp-übergreifenden Multigen-Panels (MGP) bzw. durch Exomanalyse die Aufklärungsrate gegenüber der in der bisherigen klinischen Routine durchgeführten Phänotyp-spezifischen Primärdiagnostik (PD) mittels Analyse einzelner Gene bzw. kleiner Panels erhöht werden kann, gerade bei Patienten mit bisher ungeklärter Diagnose.

Die erweiterte Analyse soll daneben zusätzlichen Aufschluss über häufige und seltene genetische Ursachen der verschiedenen Augenfehlbildungen geben und somit dazu beitragen, die Diagnostikstrategien für Patienten abhängig vom klinischen Phänotyp optimal anzupassen.

- Genotyp-Phänotyp Assoziationen von Ursachen kongenitaler Augenfehlbildungen:

Weiterhin kann durch das Ergebnis der molekulargenetischen Untersuchungen das klinische Bild, also der Phänotyp, der durch bestimmte genetische Veränderungen verursacht wird, besser definiert und erweitert werden. Dies ermöglicht ein besseres Verständnis des möglichen klinischen Spektrums der genetischen Veränderungen und somit für (zukünftige) Patienten bessere klinische und prognostische Aussagen.

- Identifikation neuer genetischer Ursachen kongenitaler Augenfehlbildungen:

Durch die Analyse können potentiell sowohl neue Kandidatengene, die bisher nicht mit Augenfehlbildungen assoziiert wurden (Gene die bisher nicht krankheitsassoziiert sind, jedoch im Auge exprimiert werden), als auch Veränderungen in bereits in der Routinediagnostik enthaltenen Genen, die nicht spezifisch mit Augenfehlbildungen assoziiert wurden, identifiziert werden. Dadurch kann ggf. die Routinediagnostik durch neue Gene sinnvoll erweitert werden, um eine höhere Aufklärungsrate und bessere Diagnostikstrategie für kongenitale Augenfehlbildungen zu erreichen.

B Grundlagen

1 Embryogenese des Auges

Für das pathogenetische Verständnis der Augenanlagestörungen ist die embryonale Entwicklung des Auges von grundlegender Bedeutung (27). Die visuelle Funktion des Auges basiert auf seiner dreidimensionalen Struktur und verschiedene Augenfehlbildungen führen zur Abweichungen bei der Ausprägung dieser Struktur und somit zu teilweise erheblichen Einschränkungen des Sehvermögens (28).

1.1 Neurulation und primäre Augenanlagen

Die prinzipielle Entwicklung des menschlichen Auges findet hauptsächlich während der ersten zwei Monate der Embryonalentwicklung statt und ist in dieser Zeit untrennbar mit der Entwicklung des zentralen Nervensystems verbunden (29).

Nachdem sich ab der dritten Woche die dreiblättrige Keimscheibe entwickelt hat, differenziert sich das dorsal gelegene Ektoderm in die zentral gelegene Neuralplatte und das lateral davon gelegene Oberflächenektoderm aus (30).

Im anterior-medialen Bereich der Neuralplatte befindet sich zu diesem Zeitpunkt ein singuläres Augengebiet mit dem Potential, okuläres Gewebe auszubilden. Dieses teilt sich im Verlauf unter Einfluss des *sonic hedgehog (SHH)*-Gens in zwei separate Augengebiete; eine fehlende Teilung resultiert in einem einzelnen, zentralen Auge (sog. Zyklopie) (27,31).

Während der folgenden Neurulation formt sich aus der Neuralplatte die Neuralrinne und schließlich das Neuralrohr (vgl. Abb. 1). Bei Wirbeltieren entsteht im Übergangsbereich zwischen Neuralrinne und Oberflächenektoderm beidseits die Neuralleiste (30), aus deren Zellen multiple Zelltypen im gesamten Körper (z.B. Knochen, Knorpel, Melanozyten (32)) hervorgehen, da sie als migrierende vorübergehend pluripotente Zellen eine epithelio-mesenchymale Transition vollziehen und somit Gewebe mit ektodermalen und mesodermalen Eigenschaften bilden können (27,29,33).

Am rostralen Ende des Neuralrohrs entstehen in der 4. und 5. Entwicklungswoche schließlich fünf Hirnbläschen (von rostral nach kaudal: Prosencephalon (Telencephalon, Diencephalon), Mesencephalon und Rhombencephalon (Metencephalon, Myelencephalon)) (30,34). Am Beginn der 4. Woche der Embryonalentwicklung entstehen im Bereich des späteren Diencephalons seitlich die

sog. Augenfurchen (Sulci optici), die primären Anlagen aus denen sich die Augen weiter entwickeln (29).

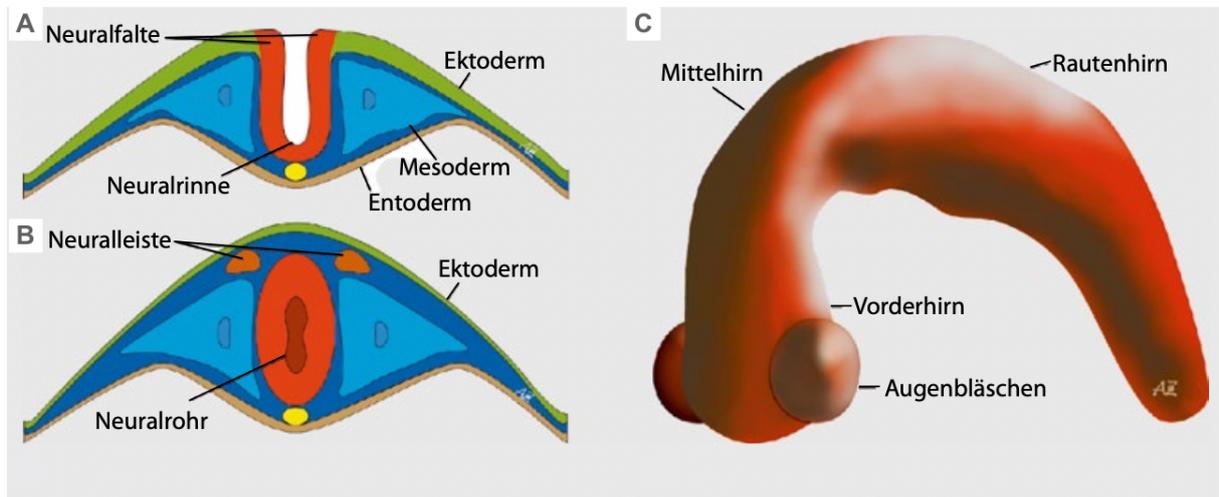


Abbildung 1: Bildung des Neuralrohrs und primäre Augenanlage. **A+B:** Aus der dreiblättrigen Keimscheibe bilden sich im Rahmen der Neurulation Neuralrohr und Neuralrinne. **C:** Im Bereich des Vorderhirns entstehen aus den Augenfurchen die Augenbläschen. Bild aus (29).

1.2 Augenbecher und Linsenbläschen

Aus den Augenfurchen bilden sich zu Beginn der 5. Woche als Vorwölbungen die Augenbläschen, die weiter nach außen wandern (vgl. Abb. 2-A). Der Kontakt mit dem umgebenden Oberflächenektoderm induziert im Grenzbereich der beiden Strukturen die Bildung der sog. Linsenplakode, einer umschriebene Epithelverdichtung (30,31). Über den Augenbecherstiel bleiben die Augenbläschen mit dem Diencephalon verbunden; er stellt den Vorläufer des späteren Nervus opticus dar (29). Im nächsten Schritt stülpen sich Linsenplakode und Augenbläschen ein und werden zu Linsenbläschen und Augenbecher (vgl. Abb. 2-B). Aus dem inneren Blatt des doppelwandigen Augenbechers entwickelt sich später die Netzhaut, das äußere Blatt wird zum retinalen Pigmentepithel und in den vorderen Augenabschnitten zu Ziliarkörper- und Irisepithelien (30,34).

Das Linsenbläschen schnürt sich schließlich in Richtung Augenbecher vom Oberflächenektoderm ab. Die Zellen der hinteren Wand verlängern sich zu Linsenfasern, die von den äquatorialen Epithelzellen zeitlebens neu gebildet werden und so das Linsenbläschen ausfüllen und den Linsenkern bilden (30). Das Oberflächenektoderm verschließt die Lücke, die durch die Linsenabschnürung

entstanden ist, sodass Linsenbläschen und Augenbecher bedeckt sind, und entwickelt sich im weiteren Verlauf zum Hornhautepithel weiter (29).

1.3 Mesenchymale Differenzierung der vorderen Augenabschnitte

Am Ende der 5. Woche sind die Augenanlagen von Mesenchym (engl. periorcular mesenchyme, POM) umgeben - embryonales Bindegewebe, das teils aus Mesoderm, aber vorwiegend aus dem Ektoderm bzw. der Neuralleiste abstammt (27,35,36). Es migriert während der Entwicklung der Augenbecher um diese herum (28). Hieraus entstehen viele Anteile der vorderen Augenabschnitte, wie Teile der Kornea, Irisstroma, Ziliarkörperstroma und -muskeln, Vorderkammer mit Trabekelwerk sowie die Aderhaut (Choroidea), die Sklera und die Vasa hyaloidea (27,29,30). Verdichtete Mesenchymzellen zwischen Oberflächenektoderm und Linsenbläschen bilden im Verlauf das Hornhautstroma; die innerste Zellschicht differenziert sich dabei um die 8. Woche zum Hornhautendothel, wodurch Linse und Hornhaut getrennt werden und erstmals eine vordere Augenkammer entsteht. Als hintere Fortsetzung der Hornhautanlagen bildet sich ab der 7. Woche die Sklera aus dem Mesenchym (29). Während der Ausbildung von Iris und Ziliarkörper, deren Epithelien einschließlich der Mm. sphincter und dilatator pupillae aus dem Augenbecher hervorgehen (29,37), wandern Mesenchymzellen in die Region des späteren Kammerwinkels und bilden die Anlage des Trabekelwerks, skleral bilden sich Gefäße als Vorläufer des Schlemm'schen Kanals (38). Im weiteren Verlauf differenzieren sich das Trabekelwerk und die Abflusswege aus und Irisansatz und Ziliarkörper lagern sich bis zur Geburt soweit zurück, dass das Kammerwasser über die ausdifferenzierten Abflusswege ausströmen kann (39).

1.4 Augenbecherspalte und Blutversorgung

Am tiefsten Punkt des Augenbechers bildet sich als Furche die sog. Augenbecherspalte, die im weiteren Verlauf entlang ihrer gesamten Länge verschmilzt (28). Hierdurch treten die Vasa hyaloidea in den Augenbecher ein und ernähren Augenbecher und die sich entwickelnde Linse (40). Eingewanderte Mesenchymzellen bilden ein Fasernetz, das durch Einlagerung von Hyaluronsäure und Wasser schließlich zum Glaskörper wird; die Gefäße bilden sich im Normalfall aber vor Geburt vollständig zurück, sodass sich der Canalis hyaloideus bildet, der proximale Anteil wird zur Arteria und Vena centralis retinae (29,30,34).

In der 7. Woche schließt sich die Augenbecherspalte, zunächst im Zentrum und dann nach ventral und posterior fortschreitend, ähnlich einem Reißverschluss (40) (vgl. Abb. 2-C und 2-D).

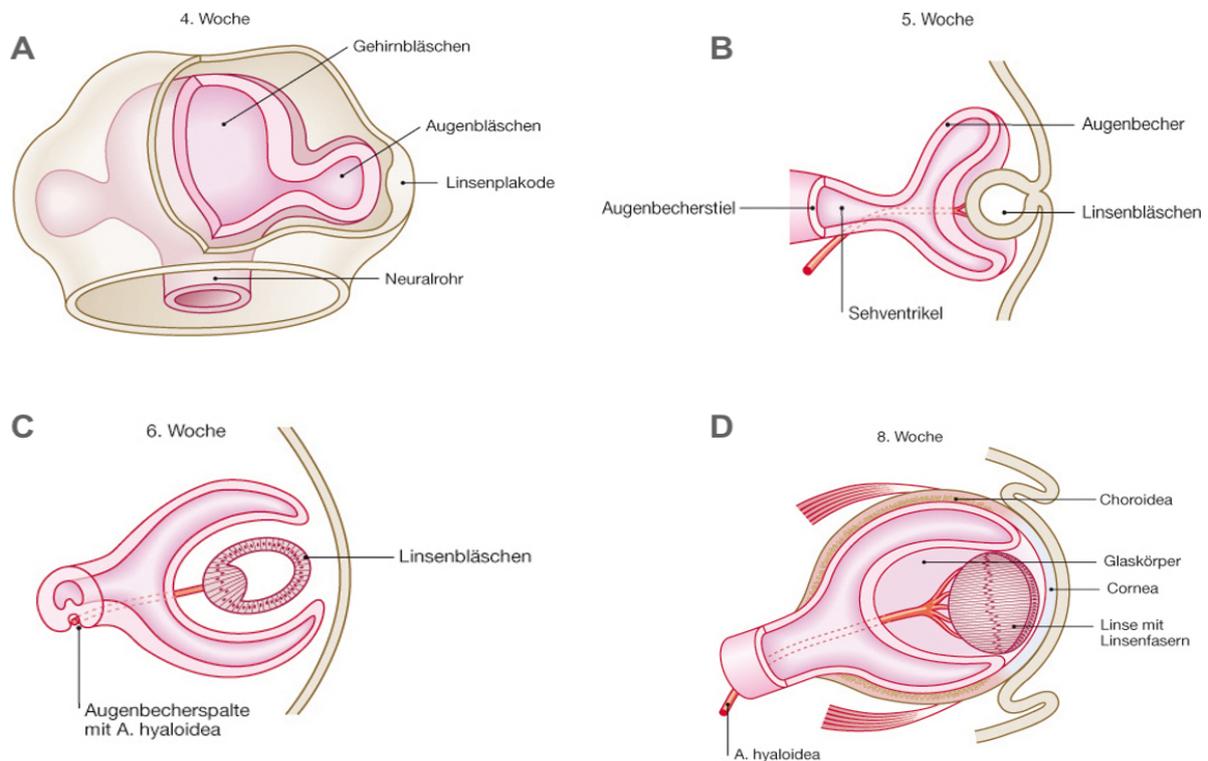


Abbildung 2: Zeitliche Abfolge der Embryonalentwicklung des Auges. **A:** Ausbildung von Augenbläschen aus den Hirnbläschen und Induktion der Linsenplakode. **B:** Bildung von Augenbecher und Linsenbläschen. **C:** Bildung der Augenbecherspalte und Eintritt der Blutversorgung. **D:** Bildung des Glaskörpers und weitere Ausreifung der Augenanlage. Bilder aus (34).

1.5 Netzhaut und Aderhaut

Nach dem Einstülpen des Augenbeckers entwickelt sich das innere Blatt zur neurosensorischen Netzhaut, das äußere Blatt bildet das retinale Pigmentepithel (40,41); ab der 7. Woche beginnt die Ausdifferenzierung der einzelnen Netzhautschichten (42). Ab der 10. Woche bilden sich die Zapfen aus, ab der 22. Woche die Stäbchen, wobei ihre Außensegmente zum größten Teil erst 15 Monate nach Geburt ausgereift sind; ebenso benötigen die Netzhautgefäße nach der Geburt noch bis zu 3 Monate um ihr Wachstum abzuschließen (29,43).

Die Aderhaut entwickelt sich gleichzeitig mit der Sklera aus Mesenchymzellen (30). Zunächst entsteht hierbei ab der 4.-5. Woche zusammen mit dem retinalen Pigmentepithel die Choriokapillaris (44). In den darauffolgenden Wochen bilden sich die weiteren Gefäßschichten und ab der 6. Woche beginnt bereits die Ausbildung der Bruchmembran (29).

1.6 Entwicklung von Muskeln, Lidern, Orbita

Die extraokulären Muskeln entwickeln sich aus Mesenchym, das sowohl vom Mesoderm als auch der Neuralleiste abstammt (45). Die Lider entstehen aus Oberflächenektoderm und verschließen die Augenanlage bis zum 7. Monat; aus dem Neuralleisten-Mesenchym entstehen Knochen und Knorpel der Orbitahöhle (30).

1.7 Genetische Regulation und der embryonalen Augenentwicklung

Zusammengefasst entsteht das menschliche Auge aus dem Ektoderm, Mesenchym und Neuralleistenzellen. Diese spielen auch in der Entwicklung des Gehirns, des Gesichts, der Zähne und kranialen Strukturen eine große Rolle, wodurch sich erklären lässt, dass Syndrome, die aus Neuralleistenfehlentwicklungen entstehen, oft Fehlbildungen von Augen, Zähnen, Gesicht, des Schädels und des zentralen Nervensystems (ZNS) aufweisen (z.B. Axenfeld-Rieger Syndrom, Goldenhar-Syndrom) (38,45–48).

Viele Aspekte der zugrundeliegenden biologischen Vorgänge und der endgültigen Gewebisdifferenzierung vor allem der vorderen Augenabschnitte sind bis heute nur rudimentär bekannt und bedürfen weiterer Aufklärung (27,28). Einige regulatorische genetisch gesteuerte Abläufe sind jedoch gut erforscht, sodass viele entscheidende Transkriptionsfaktoren bekannt sind, die hochkonserviert in Wirbeltieren und weiteren Spezies sind (28,49).

Die initialen genetischen Instruktionen empfängt die befruchtete Eizelle von noch in der Eizelle enthaltener maternaler mRNA (50). Im weiteren Verlauf beginnt die embryonale Gentranskription, deren Ablauf im Wesentlichen durch die Homöobox (HOX) Gene reguliert ist, die eine konservierte Homöodomäne von ca. 180 Basenpaaren (bp) enthalten, die an Promotorsequenzen der DNA bindet und damit Gentranskription kontrollieren kann; hierdurch wird die Entwicklung von verschiedenen Geweben gesteuert (49,51,52).

Für die Augenentwicklung sind einige HOX Gene beschrieben, unter denen insbesondere *PAX6* eine entscheidende Rolle zukommt (29,35). Weitere für die Augenentwicklung relevante Transkriptionsfaktoren sind *SIX3*, *LHX2*, *RAX*, *SIX6*, *SOX2*, *PITX2*, *VSX2*, *PAX2* und *OTX2*, die ein Netzwerk bilden, in dem sie sich gegenseitig beeinflussen und regulieren (51,53).

Durch diese Vielzahl von genetischen Einflüssen und deren hochkomplexe

Interaktionen in der embryonalen Entwicklung ist erklärbar, warum in vielen Fällen angeborener Augenfehlbildungen multiple okuläre Strukturen betroffen sind (11).

2 Konsequenzen genetischer Fehlregulation

Während der komplexen okulären Embryogenese können zu jedem Zeitpunkt Fehler im genetischen Regulationsnetzwerk auftreten. Je nach Ursache und Zeitpunkt entstehen dabei verschiedene Ausprägungen von kongenitalen Augenfehlbildungen - im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei folgende Komplexe untersucht:

2.1 Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom-Spektrum

2.1.1 Klinische Aspekte

Die Krankheitsbilder Mikrophthalmie, Anophthalmie und Kolobom, zusammengefasst MAC, beruhen alle auf primären Anlagestörungen während der embryonalen Entwicklung des Auges (54). Sie bilden ein zusammengehörendes Spektrum von klinisch heterogenen Ausprägungen, die sowohl isoliert, als auch im Rahmen von syndromalen Erkrankungen auftreten können (16,55). Der Einfluss auf das Sehvermögen ist dabei abhängig vom Grad der individuellen Ausprägung (21,54) .

Anophthalmie bezeichnet das vollständige Fehlen von Augenanlage bzw. -gewebe und entsteht wenn die Augenentwicklung während der Ausbildung des Augenbläschens abgebrochen wird, sodass Auge, Sehnerv und Chiasma opticum nur rudimentär ausgebildet sind oder ganz fehlen (8,54,55).

Mikrophthalmie wird definiert als eine Achslänge, die den Altersdurchschnitt um zwei Standardabweichungen unterschreitet (<19mm bei einem einjährigen Kind, <21mm bei einem Erwachsenen); sie kann verschiedene Ausprägungen haben und ohne (einfache Mikrophthalmie) oder mit (komplexe Mikrophthalmie) weiteren kongenitalen Augenveränderungen wie einer Katarakt oder einem Kolobom auftreten (16,54–56). Als Teil einer Mikrophthalmie, aber auch unabhängig davon, kann eine Mikrocornea bestehen, definiert als ein Hornhautdurchmesser <9mm bei Neugeborenen und <10mm ab dem dritten Lebensjahr (16,57).

Subtypen der einfachen Mikrophthalmie sind der posteriore Mikrophthalmos (PM) und der Nanophthalmos (griechisch: „Zwergenaue“), die vor allem durch pathogene Varianten in *PRSS56*, *MFRP* und *TMEM98* verursacht werden (16,58). Hierunter

versteht man ein extrem kurzes Auge (<18-20mm, wobei keine einheitliche Definition besteht) mit einhergehender hoher Hyperopie und verdickter Sklera, wobei beim PM ein stark verkürzter Hinterabschnitt bei normalem Vorderabschnitt besteht, während beim Nanophthalmos sowohl Vorder- als auch Hinterabschnitt verkürzt sind (56,58–62). Durch die sehr flache Vorderkammer besteht beim Nanophthalmos zudem ein deutlich erhöhtes Glaukomrisiko (56,59,63). Zudem wird in der Literatur teilweise noch der Subtyp des relativen anterioren Mikrophthalmos (RAM) abgegrenzt, der durch einen stark verkürzten Vorderabschnitt bei normalem Hinterabschnitt definiert wird (59,61,63). In Abbildung 3 ist die Systematik unterschiedlichen Mikrophthalmie-Phänotypen dargestellt.

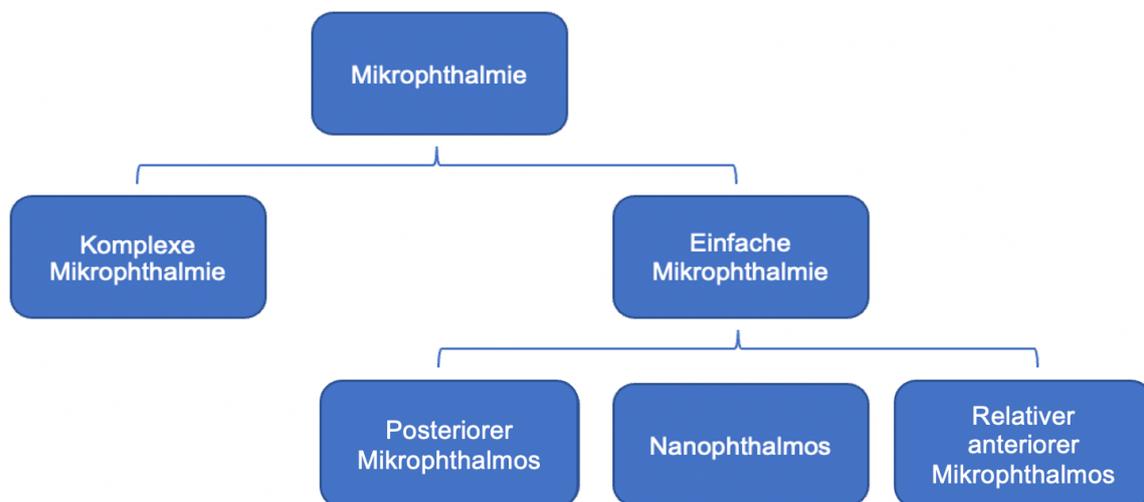


Abbildung 3: Einteilung der Mikrophthalmie-Phänotypen. Modifiziert nach (56,59,63).

Kolobome sind durch angeborene Spaltbildungen in verschiedenen okulären Strukturen der Augen gekennzeichnet. Sie entstehen durch den unvollständigen Schluss der Augenbecherspalte (27,28). Isolierte anteriore Kolobome (Defekte von Iris und vorderer Sklera) und isolierte posteriore Kolobomen (Defekte von Nervus opticus, Netzhaut und Choroidea) wurden in einer Populationsstudie dabei ungefähr gleich häufig gefunden (36% und 39%), gefolgt von Kolobomen des Vorder- und Hinterabschnitts (24%) (64), vgl. Abb. 4. Da der Verschluss der Augenbecherspalte im nasal inferioren Quadranten stattfindet, treten Kolobome klinisch an dieser Stelle auf (41).

Da es sich um ein zusammenhängendes Spektrum an Fehlbildungen handelt, kann auch innerhalb einer betroffenen Familie die phänotypische Ausprägung höchst

unterschiedlich sein, sodass bei gleicher Genveränderung beispielsweise bei einer Person Mikrophthalmie, bei einem Verwandten ein Kolobom bestehen kann (54). Die Prävalenz von Kolobomen wird auf 1:5000 Geburten geschätzt, die der Mikrophthalmie auf 1:7000 und die der Anophthalmie auf 1:30.000 (21,54,55); weitere Prävalenzen, die angegeben werden, sind 1-3:10.000 oder 2-7:100.000 Geburten für Anophthalmie/Mikrophthalmie (16,65). 3,2%-11,2% aller blinden Kinder haben klinisch eine Mikrophthalmie (16,55).

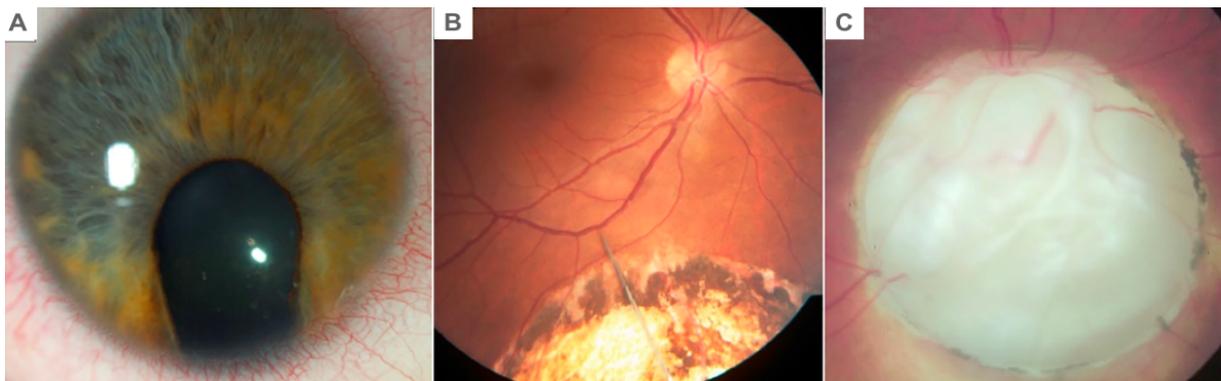


Abbildung 4: Unterschiedliche Kolobom-Phänotypen. **A:** Iriskolobom, **B:** Netzhaut-Aderhautkolobom, **C:** Papillenkolobom. Bilder aus (66).

Wie eingangs erwähnt, kann es neben isolierten Augenfehlbildungen in vielen Fällen (33 – 95%) (8,16) auch zu weiteren Auffälligkeiten kommen; typische assoziierte Fehlbildungen sind u.a. aus dem Spektrum der Mittellinienfehlbildungen eine Hypoplasie/Agnesie des Corpus callosum und eine Gaumenspalte sowie skelettale Anomalien, weiterhin sind häufig neurologische Begleiterkrankungen zu beobachten, wie Epilepsie und Entwicklungsverzögerung (67).

Mikrophthalmie, Anophthalmie und Kolobome werden im Zusammenhang mit vielen syndromalen Erkrankungen, wie dem CHARGE-Syndrom oder der Holoprosenzephalie, beschrieben (68,69).

Eine visusverbessernde Therapie besteht bisher nicht, klinisch liegt der Fokus auf Optimierung der visuellen Funktion und des kosmetischen Aspekts (54).

2.1.2 Genetik

Eine wachsende Liste an Genen und Signalwegen wird im Zusammenhang mit dem MAC-Spektrum beschrieben, wobei die spezifischen morphogenetischen Vorgänge, die durch die genetischen Varianten beeinflusst werden, oft noch kaum verstanden sind (28).

Unterteilt werden können ursächliche Gene für den MAC-Komplex in Transkriptionsfaktoren (u.a. *SOX2*, *OTX2*, *VSX2*, *PITX3*, *RAX*, *SIX6*, *PAX6*, *FOXE3*, *SALL2*, *ATHO7*), Gene des Retinsäure-Signalwegs (u.a. *ALDH1A3*, *STRA6*, *RARB*), Gene des TGF β /BMP-Signalwegs (u.a. *BMP4*, *BMP7*, *GDF6*, *GDF3*) und Gene die keiner der oben genannten Gruppen zugeordnet werden (u.a. *SHH*, *ABCB6*, *MAB21L2*, *C12orf57*, *TENM3/ODZ3*, *PXDN*, *YAP1*, *HMGB3*, *CRIM1*) (54,70–72). Am häufigsten werden dabei Veränderungen in *SOX2* beschrieben (bis zu 40%), gefolgt von *OTX2* (ca. 2-8%), bei dem die phänotypische Ausprägung sehr heterogen ist. Beide Gene werden bei der Entwicklung des ZNS exprimiert und sind an der Regulierung von Genen und Bindung von Transkriptionsfaktoren beteiligt (21,55,71).

2.2 Vorderabschnittsdysgenesien

2.2.1 Klinische Aspekte

Unter Vorderabschnittsdysgenesien (engl. cleavage syndromes oder anterior segment dysgenesis, ASD) werden verschiedene Krankheitsbilder zusammengefasst, die infolge einer gestörten Differenzierung und Migration von Neuralleistenzellen während der embryonalen Entwicklung durch eine fehlerhafte Anlage von Iris und Kammerwinkel gekennzeichnet sind (73–75). Grundsätzlich können die Vorderabschnittsdysgenesien unterteilt werden in solche der Achse Iris-Kammerwinkel (iridotrabekuläre Dysgenese) und solche der Achse Hornhaut-Iris-Linse (keratoiridolentikuläre Dysgenese: KILD) (76).

Unter dem Axenfeld-Rieger-Syndrom (ARS) wird aufgrund des gemeinsamen genetischen Ursprungs eine Gruppe von iridotrabekulären Veränderungen zusammengefasst, die historisch als eigene Entitäten behandelt wurden, einzeln oder kombiniert und oft asymmetrisch auftreten (61). Typische klinische Befunde sind eine prominente, nach anterior verlagerte Schwalbe-Linie (Embryotoxon posterius) und periphere vorderen Synechien zwischen Iris und Embryotoxon (Axenfeld-Anomalie), zusätzlich können eine Korektopie oder Polikorie bestehen (Rieger-Anomalie); auch Irisfehlbildungen und -hypoplasien können auftreten (61,77). Aufgrund der fehlerhaften Kammerwinkelanlage besteht ein Glaukomrisiko von etwa 50% (75,78,79).

Begleitend können extraokuläre Symptome wie kraniofaziale Dysmorphie, Zahnveränderungen und häufig ein Hautnabel vorkommen; seltener kommt es zu Herzfehlern und – auch abhängig von der Art der genetischen Veränderung – einer mentalen Retardierung (61,75,77,80). Die Penetranz ist hoch, die Expressivität, auch innerhalb einer betroffenen Familie, variabel; die Prävalenz des ARS beträgt ca. 1:200.000 (73,75).

Die Peters-Anomalie (Prävalenz 1:110.000) gehört zu den KILD; unterschieden werden Typ 1 (iridokorneale Adhäsionen mit avaskulären Hornhauttrübungen) und Typ 2 (zusätzlich Kontakt von Linse und Hornhaut mit vaskulären Hornhauttrübungen), die Ausprägung ist oft asymmetrisch (61,76).

Beim Peters-Plus-Syndrom bestehen zusätzlich systemischen Fehlbildungen (z.B. Kleinwüchsigkeit) und es kann wie alle ASD im Rahmen von Syndromen wie dem Alagille-Syndrom vorkommen (81). Das Glaukomrisiko ist auch hier hoch, die langfristige Visusprognose in der Regel schlecht (82).

Abbildung 5 zeigt verschiedene phänotypische Ausprägungen der beschriebenen Vorderabschnittsdysgenesien.

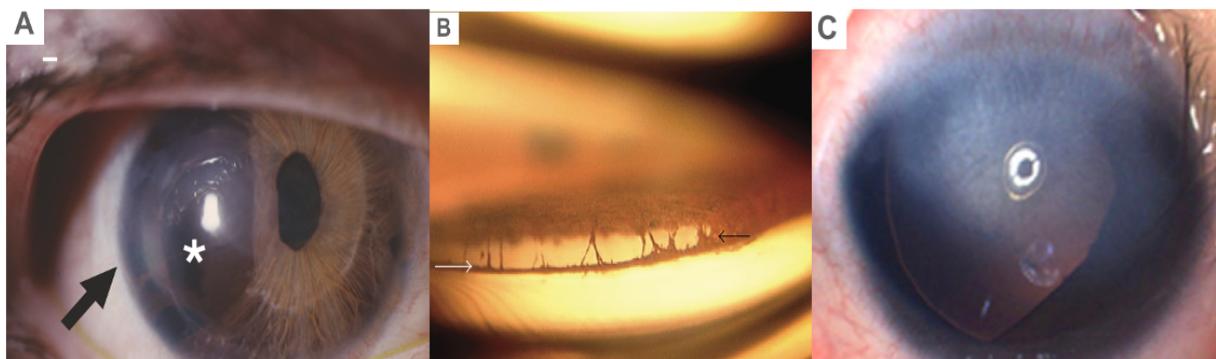


Abbildung 5: Klinische Ausprägung von Vorderabschnittsdysgenesien. **A:** ARS mit Irishypoplasie (weißer Stern), Korektomie, Polykorie und Embryotoxon posterius (schwarzer Pfeil). Bild aus (83). **B:** Gonioskopische Aufnahme eines Auges mit Embryotoxon posterius (weißer Pfeil) und Synechien zwischen Iris und Embryotoxon. Bild aus (75). **C:** Hornhauttrübung bei Peters-Anomalie. Bild aus (84).

2.2.2 Genetik

Beim ARS, das autosomal dominant (AD) vererbt wird, liegen in den meisten Fällen (ca. 40%) Veränderungen in den Genen *PITX2* und *FOXC1* vor, die Transkriptionsfaktoren kodieren (85–88). Bei isoliertem ARS werden Veränderungen häufiger in *FOXC1* gefunden, bei Vorliegen von zusätzlichen extraokulären Auffälligkeiten öfter in *PITX2* – der Nachweis einer ursächlichen Variante ist bei ca.

der Hälfte der Patienten möglich (61). Weitere involvierte Gene sind u.a. *PAX6*, *FOXC2* und *CYP1B1* (81,83). Bei der Peters-Anomalie spielen insbesondere *PAX6*, *PITX2*, *PITX3*, *FOXC1*, *FOXC2*, *FOXE1* eine tragende Rolle, beim Peters-Plus-Syndrom sind Varianten in *B3GLCT* ursächlich (61,89,90).

2.3 Kongenitales Glaukom

2.3.1 Klinische Aspekte

Das primäre kongenitale oder infantile Glaukom (engl. primary congenital glaucoma, PCG) ist gekennzeichnet durch einen erhöhten Augeninnendruck aufgrund fehlerhafter Entwicklung des Trabekelwerks aus dem POM, sodass der Abfluss des Kammerwassers gestört ist (29,36). Das kongenitale Glaukom manifestiert sich in den meisten Fällen innerhalb der ersten zwei Lebensjahre mit der „klassischen Triade“ Photophobie, Epiphora und Blepharospasmus, zusätzlich werden durch die Druckerhöhung Sklera und Hornhaut gedehnt und es kommt zu Eintrübung der Hornhaut, Rissen in der Descemet-Membran (sog. Haab-Striae) und einer Vergrößerung des Auges (sog. Buphthalmus, vgl. Abb. 6) (27,91–93). Therapeutisch ist eine chirurgische Drucksenkung und gegebenenfalls eine Keratoplastik die Therapie der Wahl, unbehandelt kommt es durch Eintrübung der Hornhaut und Sehnervenschaden in fast allen Fällen zur irreversiblen Erblindung (91,94) – bis zu 18% aller Erblindungen bei Kindern werden auf ein PCG zurückgeführt (73). Die weltweite Inzidenz wird mit ca. 1:10.000 angegeben (93), wobei in unterschiedlichen Populationen sehr unterschiedliche Inzidenzen berichtet werden (z.B. Saudi-Arabien 1:2500, Australien 1:30.000) (91,92).

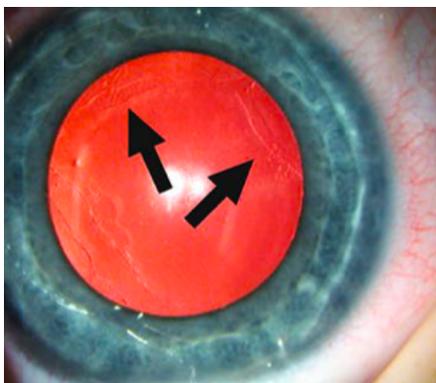


Abbildung 6: Buphthalmus und Haab-Striae. Einrisse in der Descemet-Membran (schwarze Pfeile) infolge eines PCG, Bild aus (89).

2.3.2 Genetik

Das primäre kongenitale Glaukom wird typischerweise durch Varianten in *CYP1B1* verursacht, der Erbgang ist autosomal-rezessiv (AR) – ursächliche Varianten werden je nach Population bei 25-87% der Patienten nachgewiesen (73,91,95). *CYP1B1* spielt eine Rolle bei der Entwicklung von Schlemm'-Kanal und Trabekelwerk, auch wenn die genaue Rolle nicht bekannt ist (27,93,96).

Auch Varianten im Gen *LTBP2* wurden im Zusammenhang mit PCG beschrieben.

Diese verursachen jedoch primär eher Augenanlagestörungen wie eine Megalokornea und Auffälligkeiten der Augenlinse (z.B. Ektopie, Sphärophakie), die in der Regel erst sekundär zu einem Glaukom führen (73,91,97). Da in der Endstrecke eine große Hornhaut und ein Glaukom vorliegen, können diese Befunde mitunter fehlgedeutet werden; dies ist für das klinische Management relevant, da diese Fälle eher durch Linsenentfernung als durch kammerwinkelchirurgische Eingriffe behandelt werden sollten (98).

Zudem werden pathogene Varianten im Gen *TEK* im Zusammenhang mit PCG diskutiert, das unter anderem im Endothel des Schlemm'schen Kanals exprimiert wird, wobei der genaue Pathomechanismus auch hier nicht bekannt ist (73).

2.4 Kongenitale Katarakt

2.4.1 Klinische Aspekte

Als kongenitale Katarakt (engl. congenital cataract, CC) bezeichnet man eine Trübung der kristallinen Linse, die schon bei Geburt vorliegt oder sich im ersten Lebensjahr manifestiert, wobei die Definition nicht immer einheitlich ist (90,99,100); die Erkrankung kann unilateral vorliegen, häufiger ist sie aber bilateral ausgeprägt (101).

Der Anteil genetisch bedingter kongenitaler Katarakte wird bei verschiedenen Autoren zwischen 8 und 33% angegeben (102,103), eine große systematische Metaanalyse aus dem Jahr 2016 ergab einen Anteil vom 22,3% (101). Jüngere Studien konnten in bis zu 90% bilateraler kongenitaler Katarakte eine genetische Ursache identifizieren (23,90). Weitere Ursachen sind, insbesondere in Entwicklungsländern, pränatale Infektionen, vor allem durch das Röteln-Virus (104); selten sind auch medikamentöse oder traumatische Ursachen beschrieben (90).

Die kongenitale Katarakt tritt in den meisten Fällen isoliert auf, kann aber auch kombiniert mit anderen okulären Auffälligkeiten, vor allem der vorderen Augenabschnitte, wie ASD, MAC, Aniridie, Glaukom, aber auch mit retinalen Veränderungen, bestehen (100,103,105). Daneben kommen kongenitale Katarakte im Rahmen von syndromalen Erkrankungen, wie u.a. Trisomie 21, dem Nance-Horan Syndrom (NHS) und dem Okulo-fazio-kardio-dentalen Syndrom (OFCD) vor (90,102,106).

Morphologisch können verschiedene Formen unterschieden werden, die Trübung kann dabei die gesamte Linse oder nur Teile der Linse betreffen (101,103), vgl. hierzu Abbildung 7.

Die Inzidenz variiert je nach Quelle, eine jüngere Metaanalyse bezeichnet die Inzidenz mit 0,63-9,74:10.000, mit höheren Inzidenzen in Entwicklungsländern (107,108). Schätzungen gehen davon aus, dass weltweit 200.000 Kinder aufgrund bilateraler Katarakte blind sind (9,101). Therapeutisch hilft bisher einzig die Kataraktoperation, die aufgrund des hohen Amblyopierisikos je nach Ausprägung frühzeitig erfolgen sollte (99).

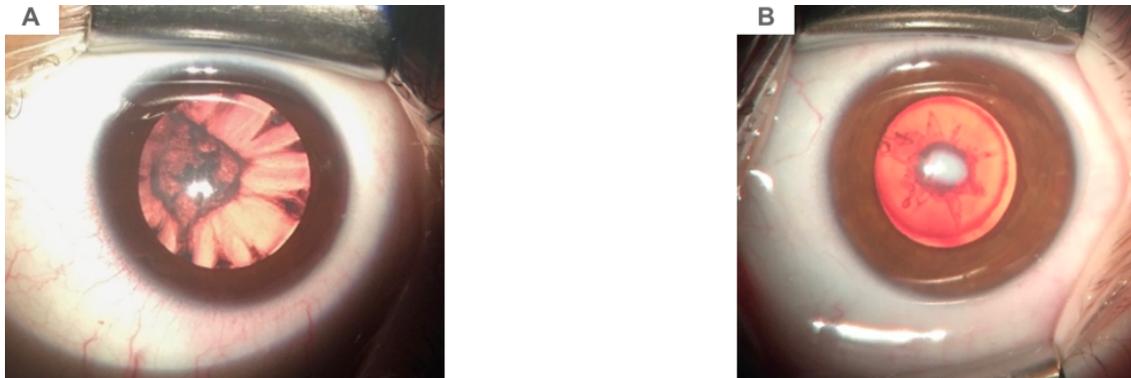


Abbildung 7: Klinische Ausprägungen von Kongenitalen Katarakten. **A:** Nukleäre Katarakt, **B:** Anteriorer Polstar. Bilder aus (99).

2.4.2 Genetik

Die genetischen Ursachen und phänotypischen Ausprägungen kongenitaler Katarakte sind äußerst heterogen ausgeprägt – dabei können morphologisch gleiche Katarakte unterschiedliche genetische Ursachen haben sein und eine bestimmte Variante kann zu verschieden ausgeprägten Befunden führen (90,99). Bisher wurden über 100 Gene im Zusammenhang mit CC beschrieben (103,106). Hauptgruppen sind dabei Gene, die die sog. Kristalline – ein Großteil der Linsenproteine, die in CRYA, CRYB, CRYG unterteilt werden – kodieren, Transkriptionsfaktoren (u.a.

PITX3, HSF4, PAX6, MAF, FOXE3), Membranproteine (u.a. *GJA8, GJA3, LIM2, MIP*), Strukturproteine des Zytoskeletts (u.a. *BFSP1, BFSP2, VIM*) und weitere Gene mit teilweise unbekannter Funktion (90,99,102,103,106,109).

Die Vererbung erfolgt meist autosomal-dominant, aber auch autosomal-rezessiv und X-chromosomal-rezessiv (23,108).

3 Genetische Diagnostik

In der genetischen Diagnostik kommen heutzutage verschiedene Untersuchungsverfahren zum Einsatz, die unterschiedliche Anwendungsgebiete haben. Die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Methoden sollen im Folgenden kurz dargestellt werden:

3.1 Next Generation Sequencing

Die erste Methode zur Sequenzierung von DNA wurde vor über 40 Jahren durch Sanger vorgestellt (110). Dabei wird die Basensequenz durch Kettenabbruch mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide sichtbar gemacht, wobei immer nur ein bestimmter und bekannter Genabschnitt gezielt untersucht wird (111,112). Sie wurde kontinuierlich weiterentwickelt und war die Basis für die erste Komplettssequenzierung des menschlichen Genoms im Jahr 2003 (113).

Im Verlauf wurde die neue Technologie des Next Generation Sequencing (NGS) eingeführt, durch die eine parallele Sequenzierung von mehreren Zehntausend Genen im Hochdurchsatzverfahren ermöglicht wurde, was zu einem rasanten Zuwachs von Sequenzdaten und somit der Erkenntnis über monogene Erkrankungen geführt hat und dabei deutlich kosten- und zeiteffizienter als die traditionelle Sanger-Sequenzierung ist (24,111). Dabei wird eine große Menge kurzer (250-800bp) DNA-Abschnitte zunächst amplifiziert und dann gleichzeitig sequenziert, wobei die genaue Technologie und der Ablauf der Sequenzanalyse je nach Sequenzierplattform variieren (111,114). Der spezifische Ablauf der im Rahmen der Arbeit verwendeten Technologie ist in Kapitel C dargestellt.

Je nach Untersuchungszweck und Kenntnis über Phänotyp und genetische Heterogenität einer Erkrankung können dabei einzelne oder auch eine große Anzahl von krankheitsassoziierten Genen (sog. Genpanels) analysiert werden; es kann jedoch auch das gesamte Exom, d.h. alle bekannten kodierenden Exons (Whole

Exome Sequencing, WES) oder das gesamte Genom (Whole Genome Sequencing, WGS) sequenziert werden (24,112,114,115).

Limitationen des NGS bestehen aufgrund der kurzen DNA-Fragmente unter anderem bei der Zuordnung von sich genomweit wiederholenden Sequenzen und bei der Detektion von strukturellen Varianten wie Insertionen und Deletionen (111,115).

3.2 MLPA

Die Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) dient dem Nachweis von Gendosisveränderungen wie Deletionen und Duplikationen ganzer Exons bzw. Gene nachweisen.

Hierzu werden spezifische Sondenpaare mit dem untersuchten DNA-Abschnitt hybridisiert, sodass sie nebeneinander zu liegen kommen, von einer Ligase verbunden und so mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden können. Anschließend wird das Mengenverhältnis des Sondenpaares mit einer Kontrolle mit bekanntem Genotyp verglichen (26,86,116,117). Wenn ein bestimmter Genabschnitt fehlt (Deletion) oder dupliziert vorliegt (Duplikation) kann dies mit dieser Methode sicher detektiert werden (26). Gerade zum Nachweis von Dosisveränderungen einzelner Exons ist die MLPA-Methode der Wahl und bisher den NGS-basierten Analyseverfahren überlegen (118).

C Material und Methoden

1 Studienpopulation

Die Auswahl der Studienpopulation erfolgte über das Medizinisch Genetische Zentrum München (MGZ). Die Studie wurde im Einklang mit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt; vor Beginn wurde ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München eingeholt.

Patienten, die in den Jahren 2016 bis 2021 wegen kongenitaler Augenfehlbildungen aus den Bereichen MAC, ASD, PGC, CC zur Beratung und Diagnostik im MGZ vorstellig waren, wurden bezüglich Ihrer Bereitschaft zur Studienteilnahme befragt; auch nach Beginn der Auswertung wurden dabei weitere Patienten aus den laufenden genetischen Beratungen eingeschlossen. Bei Interesse an einer Teilnahme wurde altersgemäßes Informationsmaterial übergeben bzw. zugesandt, aufkommende Fragen nochmals persönlich oder telefonisch individuell besprochen und schließlich eine schriftliche Einverständniserklärung der teilnehmenden oder vertretungsberechtigten Personen eingeholt.

2 Datenerhebung und -auswertung

2.1 Vorbefundliche Diagnostik

Folgende vorbefundliche Daten wurden – soweit vorhanden – bei Zustimmung zur Studienteilnahme erfasst: Geschlecht, aktuelles Alter, Alter bei Diagnosestellung, ausführliche Befunde augenärztlicher Untersuchungen, Ergebnisse der bisher erfolgten genetischen Untersuchungen, Schwangerschaftsanamnese, ausführliche Familienanamnese mit besonderem Fokus auf ophthalmologische und syndromale Erkrankungen und weitere klinische Befunde, sofern extraokuläre Fehlbildungen/ Erkrankungen vorlagen. Alle Daten wurden pseudonymisiert.

2.2 Erweiterte Auswertung der Sequenzdaten

Bei allen Patienten dieser Studienkohorte ist im Rahmen der klinisch-genetischen Routine-Diagnostik eine diagnostische Untersuchung – nachfolgend **Primärdiagnostik** (PD) genannt – auf Basis einer Exomsequenzierung (WES) mittels NGS erfolgt. Hierbei wurden einzelne, im individuellen Fall am häufigsten mit der jeweiligen Krankheit assoziierten Gene mittels (virtueller) kleiner Phänotyp-

spezifischer Panels (insgesamt <25kb) analysiert. Die einzelnen Panels sind in den Tabellen A1-4 im Anhang aufgelistet.

Falls im Rahmen der PD keine diagnostische Zuordnung möglich war, d. h. keine krankheitsverursachende genetische Variante festgestellt wurde, erfolgte eine stufenweise ergänzende Auswertung der bereits vorliegenden NGS-Daten unter Berücksichtigung der klinischen Befunde der Patienten:

- Zunächst erfolgte im Rahmen eines **Multigen-Panels** (MGP) eine Auswertung aller Gene, die zum Zeitpunkt der Diagnostik als sicher ursächlich für kongenitale Augenfehlbildungen und Erkrankungen der vorderen Augenabschnitte in der Literatur beschrieben waren („Augen-Gesamtpanel“). Tabelle A5 im Anhang listet die 186 Gene auf, die zum Zeitpunkt der Untersuchung in diesem Augen-Gesamtpanel enthalten waren.
- Bei unauffälligem Befund wurde im nächsten Schritt eine Auswertung des gesamten **Exoms**, mit Fokus auf die im Auge exprimierten Gene, durchgeführt.
- Die Auswertung sowohl des Augen-Gesamtpanels als auch des Exoms erfolgte in standardisierter Reihenfolge unter Zuhilfenahme der Human Phenotype Ontology (HPO)-Terminologie:
 - Suche nach pathogenen Varianten in Genen, die bisher sehr selten als Ursache der beim Patienten vorliegenden Augenfehlbildung beschrieben sind;
 - Suche nach pathogenen Varianten in Genen, die bereits mit kongenitalen Augenfehlbildungen assoziiert sind, möglicherweise jedoch nicht exakt mit dem beim Patienten vorliegenden Phänotyp;
 - Suche nach pathogenen Varianten in Genen, die mit übergeordneten syndromalen Erkrankungen, in deren Rahmen auch kongenitale Augenfehlbildungen vorkommen können, beschrieben sind;
 - Suche nach neuen potentiellen Kandidatengenen: Konkret kommen dabei Gene mit Varianten in Betracht, die u. a. einen Funktionsverlust (Loss-of-Function, LOF) verursachen, wie Stop-gain, Frameshift und Splice-Varianten, und für die eine Expression im Auge bekannt ist.

3 Exom-Sequenzierung

3.1 DNA-Extraktion

Von allen Patienten – in einigen Fällen auch von betroffenen und nichtbetroffenen Eltern, Geschwistern und weiteren Verwandten (zur Vergleichs- bzw. Segregationsanalyse) – wurden mindestens 2 ml EDTA-Blutproben gewonnen. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels des FlexiGene DNA-Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben. Anschließend erfolgte eine Qualitätskontrolle durch Messung des Reinheits- und Konzentrationsgrades der DNA-Probe mittels des Xpose Spektrophotometers (Trinean, Gentbrugge, Belgien).

3.2 DNA-Präparation und Anreicherung

Im nächsten Schritt wurden die DNA-Fragmente mittels des Ultraschallgeräts Covaris M220 (Covaris, Woburn, USA) in 150-200bp lange Fragmente geschnitten.

Anschließend erfolgte eine sog. Bead-Aufreinigung der DNA-Fragmente durch magnetische Kügelchen (Agencourt AMPure XP Beads - Beckman Coulter, Brea, USA), die an DNA binden und mittels eines Magneten von Verunreinigungen der Probe (z.B. verbleibende Nukleotide/ Enzyme nach stattgefundenen Reaktionen) getrennt werden können.

Schließlich erfolgte eine spezifische DNA-Anreicherung (sog. Library Präparation) aller kodierenden und angrenzenden intronischen Bereiche für NGS nach der sog. Target-Capture Methode durch bestimmte enzymatisch vermittelte Schritte gemäß dem Protokoll des jeweils verwendeten Sequenzierkits: SureSelectXT Target Enrichment System for the Illumina Platform (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) für Patienten 1-27 bzw. Human Comprehensive Exome + Mitochondrial Panel (Twist Bioscience, San Francisco, USA) für Patienten 28-40.

3.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung fand auf den Geräten MiSeq, NextSeq oder NovaSeq (Illumina, San Diego, USA) statt: Die im Sequenzieransatz enthaltenen Fragmente binden auf der sog. Flowcell, wo anschließend viele Kopien des Fragments erstellt werden (sog. cluster) wobei nur Fragmente in 5'-3' Richtung (forward strands) an der Flowcell haften bleiben. Nun werden nach dem Prinzip „sequencing by synthesis“ die sog. reads erstellt, aus denen die DNA-Sequenz abgelesen werden kann. Hierfür bindet zunächst ein Sequenzier-Primer an die komplementäre Stelle am Fragment. Dann

werden alle Basen hinzugefügt; diese sind reversibel mit einem unterschiedlichen Fluorophor blockiert. In der folgenden Reaktion kann dadurch jeweils nur eine Base an den zu sequenzierenden Strang binden. Die einzelnen Fluorophore werden nach jeder Bindungsreaktion (cycle) angeregt und es erfolgt eine spezielle Lichtemission, die abfotografiert wird. Anhand dieser Fluoreszenz-Fotos nach jeder einzelnen Basen-Bindungsreaktion kann bioinformatisch später die Sequenz rekonstruiert werden. In der Regel erfolgen ca. 150 Bindungsreaktion, die die Länge der reads (150bp) bestimmen. Danach wird das Sequenzierprodukt gewaschen. Anschließend bindet der komplementäre Sequenzier-Primer am anderen Ende des Fragments und derselbe Ablauf beginnt von neuem, wobei hierfür zum Ablesen erst der entsprechende reverse strand gebildet werden muss (sog. paired end sequencing).

3.4 Bioinformatische Auswertung

Die durch die Sequenzierung entstandenen Datensätze wurden in der Folge bioinformatisch analysiert und für die klinische Auswertung aufbereitet.

Aus diesen wird in mehreren Zwischenschritten eine Liste von Varianten für jeden Patienten erstellt und mit Informationen versehen, die schließlich interpretiert und befundet werden kann.

Da die Exom-Sequenzierung bei den eingeschlossenen Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von fünf Jahren stattgefunden hat, kamen hierbei verschiedene Software-Lösungen zum Einsatz.

Bei den Patienten 1 bis 26 erfolgte die bioinformatische Auswertung standardisiert mithilfe verschiedener Analysetools: Mithilfe der Software BWA (Burrows-Wheeler Aligner, Version 0.7.8-r455) wird im Rahmen des sog. Mapping jeder read mit der Referenzsequenz des humanen Genoms (Version: GRCh37/ hg19 Assembly) abgeglichen und dementsprechend angeordnet; dabei werden mehrere Filterschritte (z.B. Aussortieren von PCR-Duplikaten) zur Qualitätskontrolle angewandt.

Anschließend werden Unterschiede zwischen Referenzsequenz und Readsequenzen gesucht (sog. Variant Calling). Mit der Software SAMTools (Version 1.1) werden Einzelnukleotid-Varianten (engl. Single Nucleotide Variant, SNV) und kleine Insertionen/ Deletionen (InDels) gefunden; ein SNV muss in mindestens 20% aller reads vorkommen, InDels in mindestens 15%. Um die gefundenen Varianten

beurteilen zu können, werden sie als letzter Schritt der Pipeline mit den bisher verfügbaren Informationen verknüpft (sog. Annotation). Mithilfe der Software SnpEff (Version 4.0e) werden die Effekte von Varianten auf bekannte Gene (Referenzsequenzdaten aus RefSeq = NCBI Reference Sequence Database) vorhergesagt. Die Software Alamut-Batch (Version 1.3.1, Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) produziert über verschiedene Programme zusätzliche Vorhersagen über den Effekt einer Variante, z.B. auf Splicing-Stellen und die Proteinstruktur. Nach Durchlaufen der Pipeline werden noch Informationen aus externen Populationsdatenbanken (dbSNP, 1000 Genomes, ESP, GnomAD/ ExAC) und klinischen Datenbanken (ClinVar, Emory, MGZ-intern, HGMD, Mastermind, COSMIC) mit den Varianten verknüpft. All diese Informationen werden in einer laborinternen Software integriert und für die klinische Auswertung dargestellt.

Bei den Patienten 27 bis 40 erfolgte die bioinformatische Pipeline und Auswertung nach denselben Prinzipien vollständig mithilfe der Software Varvis (Limbus Technologies, Rostock, Deutschland).

4 Auswertung und Klassifizierung der Sequenzvarianten

4.1 HPO-basierte Auswertung

Die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse wurden nach aktueller wissenschaftlicher Datenlage interpretiert und klassifiziert. Bei der Auswertung der Exomdaten wurde dabei der Fokus auf im Auge exprimierte und bereits mit okulären Phänotypen assoziierte Gene gelegt. Hierfür wurden die gefundenen Varianten nach HPO-Terms gefiltert. Hierbei handelt es sich um Angaben zum klinischen Phänotyp, die in der Human Phenotype Ontology (HPO) als international standardisierte Terminologie hinterlegt und in Datenbanken mit verschiedenen Genen verknüpft sind. Dies ermöglicht es, die softwaregestützte Auswertung von Sequenzdaten auf bestimmte klinische Fragestellungen zu begrenzen und dabei solche Varianten zu priorisieren, die in Genen liegen, die mit den HPO-Terms des Patienten assoziiert sind (119). Da die HPO-Terminologie hierarchisch organisiert ist (vgl. Abb. 8), werden in der Auswertung nicht nur die einzelnen spezifischen HPO-Terms, die bei jedem Patienten hinterlegt sind, berücksichtigt, sondern mit absteigender Priorität auch solche, die mit dem ausgewählten Phänotyp verwandt sind.

In Tabelle 1 sind die im Rahmen der Studie am häufigsten verwendeten HPO-Terms dargestellt; je nach spezifischem Phänotyp wurden gegebenenfalls noch zusätzliche HPO-Terms verwendet.

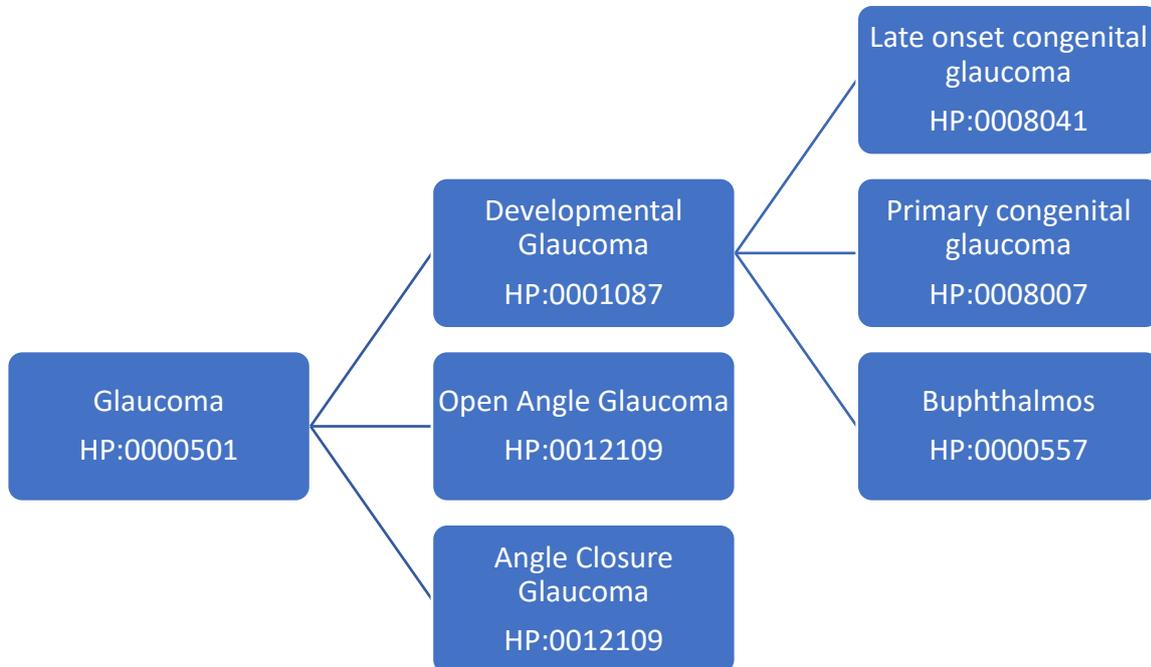


Abbildung 8: Hierarchische Struktur der HPO-Terminologie anhand des Beispiel-Terms *Glaucoma*.

Tabelle 1: Typische HPO-Terms mit standardisierter Identifikationsnummer.

HPO-TERM	HPO-ID
Glaucoma	HP:0000501
Developmental Glaucoma	HP:0001087
Primary Congenital Glaucoma	HP:0008007
Cataract	HP:0000518
Developmental Cataract	HP:0000519
Microphthalmia	HP:0000568
Bilateral Microphthalmos	HP:0007633
Coloboma	HP:0000589
Retinal coloboma	HP:0000480
Chorioretinal coloboma	HP:0000567
Optic disc coloboma	HP:0000588
Lens coloboma	HP:0100719
Ocular anterior segment dysgenesis	HP:0007700
Abnormal anterior eye segment morphology	HP:0004328
Axenfeld anomaly	HP:0001492

4.2 ACMG-Klassifizierung

Zur Bewertung der Pathogenität einer identifizierten Variante wurde das Klassifizierungssystem des American College of Medical Genetics (ACMG) verwendet (120); die detaillierten ACMG-Kriterien für Pathogenität, Benignität und die Klassifikation von Varianten und die zeigen Tabellen A2-A4 im Anhang. Weiterhin wurden Algorithmen zur Beurteilung von Spleißstellen (121) und der Beurteilung von Segregationsdaten (122) miteinbezogen. Nach den Empfehlungen der ACMG werden Varianten dabei in 5 Klassen eingeteilt:

Klasse 1 (Benign),

Klasse 2 (Likely Benign),

Klasse 3 (Variant Of Uncertain Significance (VUS)),

Klasse 4 (Likely Pathogenic),

Klasse 5 (Pathogenic).

Die Nomenklatur der Sequenzvarianten richtet sich nach den Empfehlungen der Human Genome Variation Society (HGVS) (123). Varianten wurden den Patienten nach Maßgabe der unterzeichneten Einverständniserklärung mitgeteilt und an öffentlich zugängliche Datenbanken (u.a. LOVD und ClinVAR) übermittelt. Wie im klinischen Alltag und der wissenschaftlichen Literatur üblich (23,120), werden nur Varianten der Klasse 4 und Klasse 5 als Ursache für konkrete phänotypische Ausprägungen als kausal an die Patienten berichtet; Klasse 3-Varianten wurden in Ausnahmefällen, beispielsweise bei sehr spezifischem Phänotyp und klinisch passendem Genotyp, berichtet.

D Ergebnisse

1 Untersuchte Studienpopulation

Insgesamt wurden im Rahmen der Studie 40 Indexpatienten mit kongenitalen Augenfehlbildungen aus 40 voneinander unabhängigen Familien eingeschlossen und jeweils die bereits erhobenen ophthalmologischen und humangenetischen Befunde und Sequenzdaten systematisch nachanalysiert.

Von den einzelnen Krankheitsbildern war der Phänotyp MAC der häufigste (55%, n=22), gefolgt von ASD/PCG (35%, n=14) und CC (10%, n=4). Insgesamt 77% (n=31) der untersuchten Patienten wiesen dabei einen einfachen okulären Phänotypen auf, hingegen hatten 23% (n=9) einen komplexen okulären Phänotyp mit zusätzlichen okuläre Auffälligkeiten. Bei 72% (n=29) der Gesamtstudienpopulation lag ein auf das Auge beschränkter – also isoliert okulärer (einfacher oder komplexer) – Phänotyp vor, während in 28% (n=11) der Fälle zusätzlich zu den okulären Auffälligkeiten extraokuläre/ syndromale Phänotypen (=Auffälligkeiten in anderen Organsystemen) beschrieben wurden. Abbildung 9 veranschaulicht die verschiedenen phänotypischen Kategorien.

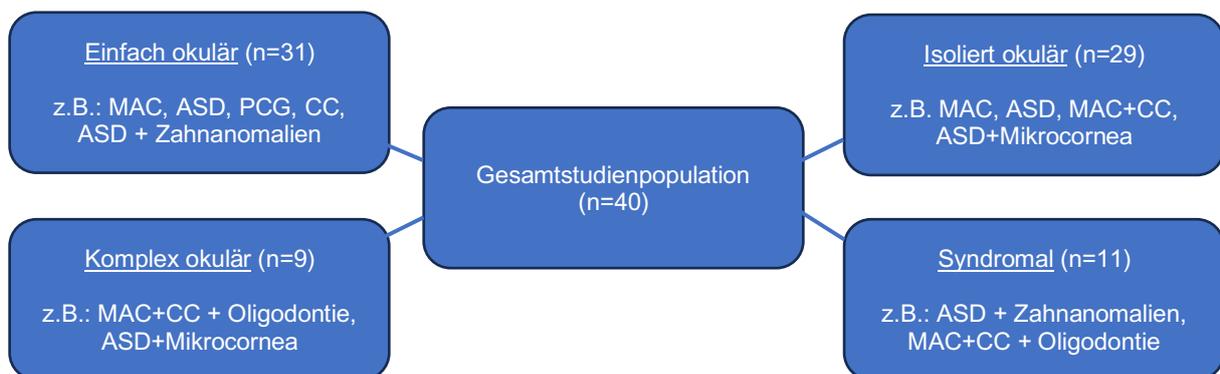


Abbildung 9: Kategoriale Einteilung der Studienpopulation: Patienten können sowohl einen einfachen oder komplexen okulären Phänotyp als auch einen isoliert okulären oder syndromalen Phänotyp aufweisen, sodass jede Ausprägung in zwei Kategorien eingeteilt werden (z.B. ASD + Zahnanomalien = syndromal und einfach okulär). n = Anzahl, z.B. = zum Beispiel, MAC=Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom-Komplex, ASD=Vorderabschnittsdysgenese, PCG=Kongenitales Glaukom, CC=Kongenitale Katarakt.

Bei 92% (n=37) lag eine beidseitige, bei 8% (n=3) eine einseitige Ausprägung vor. Bei 25% (n=10) der Patienten war die Familienanamnese positiv, davon lagen in 56% (n=5) der Fälle Sequenzdaten der Familienmitglieder vor; bei 75% (n=30) war

die Familienanamnese negativ. Die Studienpopulation bestand zu 63% (n=25) aus weiblichen und zu 37% (n=15) aus männlichen Patienten.

Entsprechend der phänotypischen Ausprägung wurden Gruppen gebildet. Die Patienten mit ASD und PCG wurden dabei bei der Auswertung zu einer Gruppe zusammengefasst, da es hier sowohl phänotypisch als auch genetisch große Überschneidungen gibt und im klinischen Alltag eine klinische Unterscheidung, gerade bei Patienten mit einem kongenitalen Glaukom als Erstmanifestation einer ASD, nicht immer sicher zu treffen ist. Bei vier Patienten lag ein gemischter Phänotyp MAC/CC vor; diese Fälle wurden der übergeordneten Anlagestörung MAC zugeordnet. Die klinischen Merkmale der Studienpopulation sind in Abbildung 10 dargestellt.

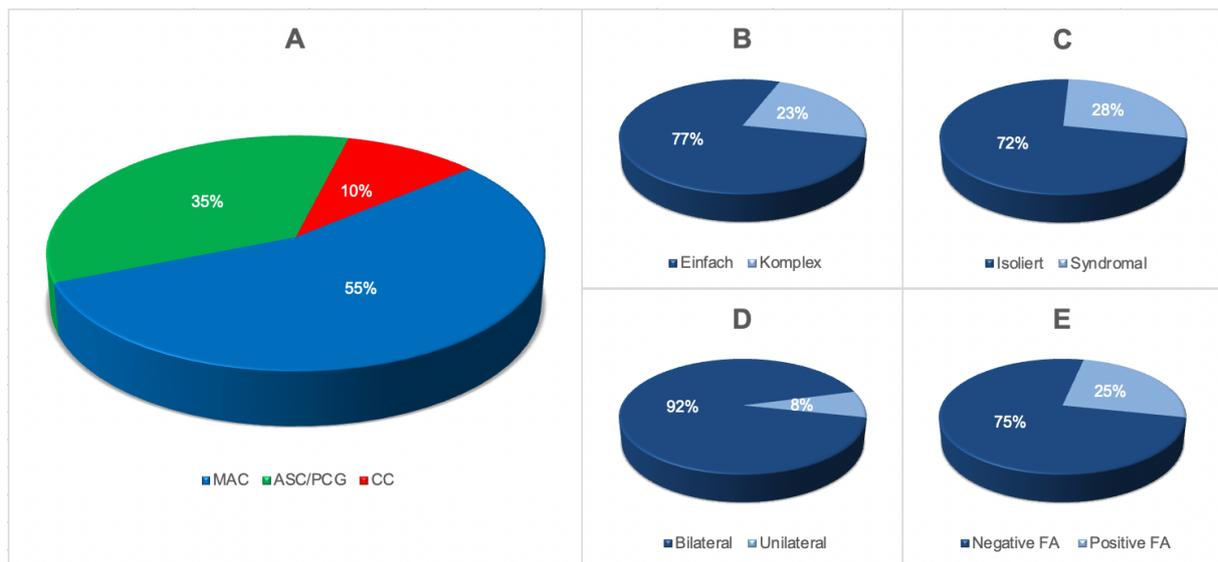


Abbildung 10: Klinische Merkmale der Studienpopulation: **A:** prozentuale Verteilung der phänotypischen Entitäten in der Studienpopulation. **B-E:** Verhältnis von Patienten mit **B:** einfachem und komplexem okulärem Phänotyp, **C:** isoliertem und syndromalem Phänotyp, **D:** uni- und bilateraler Ausprägung und **E:** positiver und negativer Familienanamnese. MAC=Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom-Komplex, ASD=Vorderabschnittsdysgenese, PCG=Kongenitales Glaukom, CC=Kongenitale Katarakt, FA=Familienanamnese.

2 Ergebnisse der Sequenzierung

Bei Gesamtbetrachtung aller Auswertungsschritte (PD, MGP und Exom) konnten bei insgesamt 42,5% (n=17 von 40) der untersuchten Patienten kausale Varianten (entspricht Klasse 4 oder 5 der ACMG-Klassifikation) in Bezug auf den Phänotypen gefunden werden (vgl. Tabellen 2-4); hierbei sind 2 Fälle beinhaltet in denen sich durch NGS-Diagnostik ein konkreter Verdacht auf eine Gendeletion ergab, der durch

MLPA-Analyse bestätigt wurde. Von den 17 Varianten waren 6 Varianten neu, d.h. bisher in Datenbanken oder der Literatur nicht beschrieben.

Des Weiteren wurden in PD, MGP und Exom Varianten unklarer Signifikanz (sog. VUS, Klasse 3 der ACMG-Klassifikation), die Relevanz hinsichtlich der beschriebenen Phänotypen besitzen, bei insgesamt 15% (n=6 von 40) der Patienten gefunden (vgl. Tabelle 8).

Bei 42,5% (n=17 von 40) konnte auch nach sequenzieller Auswertung von PD, MGP und Exom keine ursächliche bzw. Phänotyp-relevante Variante der Klassen 3-5 gefunden werden (detaillierte Informationen zu diesen Patienten können Tabelle A5 im Anhang entnommen werden). Die Ergebnisse der genetischen Sequenzanalyse sind in Abbildung 11 und Abbildung 12 dargestellt.

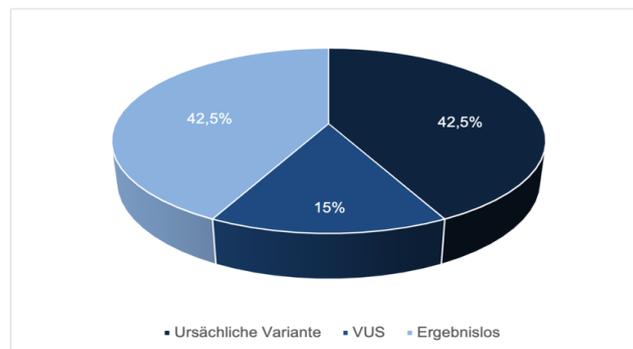


Abbildung 11: Gesamtergebnis aller Auswertungsschritte (PD+MGP+Exom): Prozentuale Verteilung von Fällen mit ursächlichen Varianten (ACMG-Klasse 4 und 5), Varianten unklarer Signifikanz (VUS, ACMG-Klasse 3) oder ohne Ergebnis.

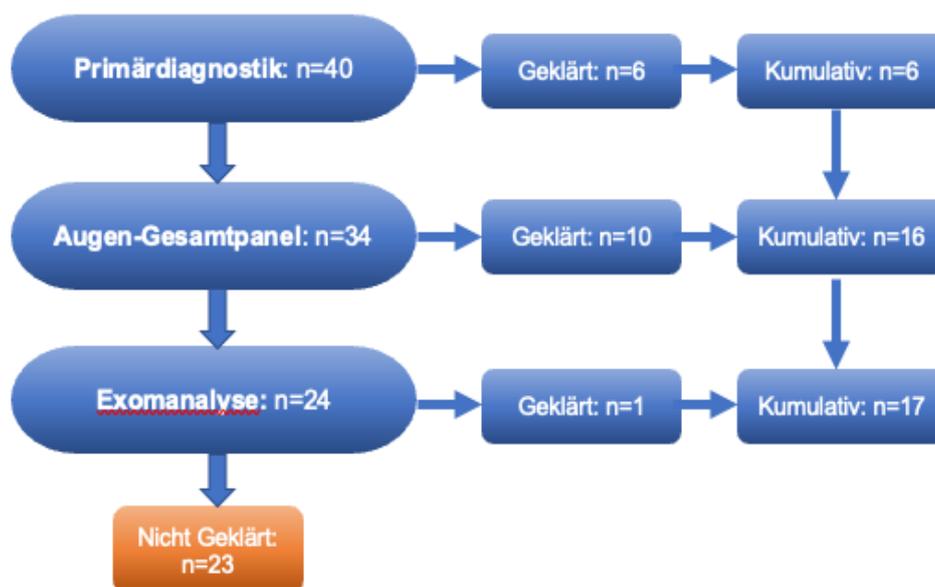


Abbildung 12: Systematik der erhobenen Ergebnisse. n = Anzahl der Patienten, geklärt = ursächliche Variante gefunden, nicht geklärt = keine ursächliche Variante gefunden, Kumulativ = Aufklärungsrate inkl. vorangegangener Diagnoseschritte.

2.1 Ergebnisse der Primärdiagnostik

In der Primärdiagnostik konnte bei 15% (n=6) der untersuchten Patienten eine für die jeweilige Erkrankung kausale Variante gefunden werden – die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Hervorzuheben ist, dass in diesem diagnostischen Vorgehen bei keinem Patienten mit MAC-Spektrum eine ursächliche Variante gefunden wurde. In der Gruppe ASD/PCG konnten in 29% (n=4) der Fälle, in der Gruppe CC in 50% (n=2) der Fälle ursächliche Variante gefunden werden. In 85% (n=34) aller untersuchten Fälle konnte keine ursächliche Variante gefunden werden. Dabei war eine der gefundenen Varianten zum Zeitpunkt der Diagnostik nicht vorab beschrieben.

2.2 Ergebnisse des Augen-Gesamtpanels

In allen durch die Primärdiagnostik nicht geklärten Fällen (n=34) wurde eine erweiterte Analyse der Sequenzdaten mittels Multigenpanel („Augen-Gesamtpanel“) durchgeführt. Hierdurch konnte in 29% (n=10) der untersuchten Fälle eine ursächliche Variante gefunden werden – die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Bezüglich der einzelnen Phänotypen konnte in der Gruppe MAC in 36% (n=8) der Fälle, in der Gruppe ASD/PCG in 7% (n=1) der Fälle und in der Gruppe CC in 25% (n=1) der Fälle ursächliche Varianten gefunden werden. Dabei waren 4 Varianten vorab nicht in der Literatur beschrieben.

2.3 Ergebnisse der Exomanalyse

In allen Fällen, die durch das Multigenpanel nicht geklärt wurden, wurde schließlich im nächsten Schritt eine Auswertung des gesamten Exoms – mit Fokus auf die jeweiligen HPO-Termini und die im Auge exprimierten Gene – in standardisierter Reihenfolge durchgeführt (vgl. Kapitel C 2.2). Hierdurch konnte bei einem weiteren Patienten (=2,5% der untersuchten Fälle) eine ursächliche Variante gefunden werden, wie in Tabelle 4 dargestellt. Die gefundene Variante war nicht vorab beschrieben. Nur in der Gruppe ASD/PCG konnte hierdurch ein weiterer Fall geklärt werden; in den Gruppen MAC und CC ergab sich keine weitere Ursachenklärung.

Tabelle 2: Ergebnisse der Primärdiagnostik:

Patienten, bei denen im ersten Diagnoseschritt eine ursächliche Variante (ACMG-Klasse 4 und 5) gefunden wurde.

het = heterozygot, - = nicht zutreffend, Bekannt = in Literatur/ Datenbanken beschrieben, N.B. = in Literatur/ Datenbanken bisher nicht beschrieben, ø = nicht bekannt/ nicht erfolgt,

de novo = Segregationsanalyse negativ.

Indexpatient	Beschriebener okulärer Phänotyp	Ausprägung	Extraokulärer Phänotyp	Familienanamnese	Gen	Sequenzvariante (cDNA-Veränderung)	Aminosäuren-Veränderung	Mutationstyp	ACMG-Klasse	Variante bekannt?	Segregation/ Familienmitglied mit gleicher Variante
ASD/PCG-8	Kongenitales Glaukom	Bilateral	-	Negativ	<i>CYP1B1</i>	c.1168C>A; het/ c.1076_1082dup; het	p.Arg390Ser / p.Asp361Glu*16	Missense/ Frameshift	Klasse 5/ Klasse 5	Bekannt (124)/ N.B.	ø
ASD/PCG-22	Vorderkammerdysgenese (V.a. Axenfeld-Rieger-Syndrom), frühkindl. Glaukom	Bilateral	-	Positiv (Mutter, Tante, Großmutter, Cousin, Tochter, 2 Enkel)	<i>FOXC1</i>	Deletion 3' Sonde Exon 1; het	-	Deletion	Klasse 4	-	ø
ASD/PCG-23	Vorderkammerdysgenese (Rieger-Anomalie)	Bilateral	Zahnanomalien, exzessive Haut am Bauchnabel	Positiv (Tochter)	<i>PITX2</i>	Deletion aller Sonden (Intron 3, Exon 4, Exon 5); het	-	Deletion	Klasse 4	-	ø
ASD/PCG-34	Vorderkammerdysgenese/ kongenitales Glaukom	Bilateral	-	Negativ	<i>FOXC1</i>	c.247T>C; het	p.Tyr83His	Missense	Klasse 4	Bekannt (77)	de novo
CC-30	Kongenitale Katarakt, Mikrokornea	Bilateral	-	Negativ	<i>COL4A1</i>	c.2317G>A; het	p.Gly773Arg	Missense	Klasse 5	Bekannt (125,126)	de novo
CC-33	Kongenitale Katarakt, Mikrokornea	Bilateral	-	Negativ	<i>PAX6</i>	c.113G>A; het	p.Arg38Gln	Missense	Klasse 4	Bekannt (127,128)	ø

Tabelle 3: Ergebnisse des Augen-Gesamtpanels

Patienten, bei denen im zweiten Diagnoseschritt eine ursächliche Variante (ACMG-Klasse 4 und 5) gefunden wurde.

het = heterozygot, hom = homozygot, hem = hemizygot, - = nicht zutreffend, Bekannt = in Literatur/ Datenbanken beschrieben, N.B. = in Literatur/ Datenbanken bisher nicht beschrieben, ø = nicht bekannt/ nicht erfolgt, de novo = Segregationsanalyse negativ.

Indexpatient	Beschriebener okulärer Phänotyp	Ausprägung	Extraokulärer Phänotyp	Familienanamnese	Gen	Sequenzvariante (cDNA-Veränderung)	Aminosäuren-Veränderung	Mutationstyp	ACMG-Klasse	Variante bekannt?	Segregation/ Familienmitglied mit gleicher Variante
MAC-9	Mikrophthalmie, Kongenitale Katarakt,	Bilateral	Radikulomegalie, Oligodontie, Zehensyndaktylie, Breite Nasenspitze	Positiv (Mutter, Schwester)	<i>BCOR</i>	c.4038_4039del; het	p.Glu1348Ilefs*26	Frameshift	Klasse 4	Bekannt (129)	Mutter betroffen
MAC-10	Mikrophthalmie, Kongenitale Katarakt	Bilateral	-	Positiv (Schwester)	<i>NHS</i>	c.320del; hem	p.Gly107Alafs*89	Frameshift	Klasse 5	N.B.	ø
MAC-11	Iris-/ Netzhaut-/Aderhautkolobom	Bilateral	-	Negativ	<i>MAB21L2</i>	c.58del; het	p.Cys20Valfs*37	Frameshift	Klasse 4	N.B.	ø
MAC-15	Iris-/ Netzhaut-/Aderhautkolobom	Bilateral	-	Negativ	<i>MAB21L2</i>	c.58del; het	p.Cys20Valfs*37	Frameshift	Klasse 4	N.B.	ø
MAC-19	Mikrophthalmie, Engwinkelglaukom, extreme Hyperopie	Bilateral	-	Positiv (Schwester)	<i>MFRP</i>	c.201G>A; het/ c.1534T>G; het	p.Trp67* / p.Cys512Gly	Nonsense/ Missense	Klasse 4/ Klasse 4	Bekannt (130) / N.B.	ø
MAC-37	Mikrophthalmie, Kongenitale Katarakt,	Bilateral	Harnleiterenge, Psoriasis, Zahndoppelanlage	Negativ	<i>NHS</i>	c.3659dup; hem	p.Asn1220Lysfs*5	Frameshift	Klasse 4	N.B.	ø

Indexpatient	Beschriebener okulärer Phänotyp	Ausprägung	Extraokulärer Phänotyp	Familienanamnese	Gen	Sequenzvariante (cDNA-Veränderung)	Aminosäuren-Veränderung	Mutationstyp	ACMG-Klasse	Variante bekannt?	Segregation/ Familienmitglied mit gleicher Variante
MAC-39	Iris-/ Netzhaut-/ Aderhaut-/ Papillenkolobom	Bilateral	Sandalenlücke	Negativ	<i>MAB21L2</i>	c.145G>A; het	p.Glu49Lys	Missense	Klasse 5	Bekannt (131)	de novo
MAC-40	Mikrophthalmie	Bilateral	-	Negativ	<i>PRSS56</i>	c.1066dup; hom	p.Gln356Profs*152	Frameshift	Klasse 5	Bekannt (132)	∅
ASD/PCG-27	Hornhauttrübung, Irisanlagestörung, Optikusveränderung, kongenitales Glaukom	Bilateral	-	Negativ	<i>CYP1B1</i>	c.1159G>A; het/ c.1064_1076del; het	p.Glu387Lys / p.Arg355Hisfs*69	Missense / Frameshift	Klasse 5/ Klasse 5	Bekannt (96,133,134)	∅
CC-4	Kongenitale Katarakt	Bilateral	sprachbetonte Entwicklungsverzögerung/ Mikrozephalie	Positiv (Bruder)	<i>GCNT2</i>	c.1148G>A; hom	p.Arg383His	Missense	Klasse 4	Bekannt (128,135)	∅

Tabelle 4: Ergebnisse der Exomanalyse:

Patienten, bei denen im dritten Diagnoseschritt eine ursächliche Variante (ACMG-Klasse 4 und 5) gefunden wurde.
hom = homozygot, N.B. = in Literatur/ Datenbanken bisher nicht beschrieben

Indexpatient	Beschriebener okulärer Phänotyp	Ausprägung	Extraokulärer Phänotyp	Familienanamnese	Gen	Sequenzvariante (cDNA-Veränderung)	Aminosäuren-Veränderung	Mutationstyp	ACMG-Grading	Variante bekannt?	Segregation/ Familienmitglied mit gleicher Variante
ASD/PCG-20	Vorderkammerdysgenesie / Axenfeld-Rieger Syndrom, hohe Myopie, Mikrocornea, Makulopathie, Glaukom	Bilateral	Taurodontismus, auffällige Ohrmuschel	Positiv (Schwester, Bruder)	<i>ADAMTS18</i>	c.1399G>T; hom	p.Gly467*	Nonsense	Klasse 5	N.B.	Schwester betroffen

3 Ergebnisse nach phänotypischer Ausprägung

3.1 Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom-Spektrum (MAC)

Im Rahmen der Studie wurden 22 Patienten mit MAC untersucht; es handelte sich hiermit um die größte Gruppe innerhalb der untersuchten Krankheitsbilder (vgl. Abb. 13). Hiervon war bei 8 Patienten (36%) ein Kolobom beschrieben, bei 8 Patienten (36%) eine Mikrophthalmie, bei 6 Patienten (28%) eine Kombination. Der Phänotyp der Anophthalmie lag in der Studienpopulation nicht vor. 2 Patienten (9%) hatten eine einseitige Ausprägung, 20 Patienten (91%) eine beidseitige. 5 Patienten (23%) hatten weitere okuläre Auffälligkeiten (davon 4 Patienten mit Katarakt, 1 Patient mit primärem hyperplastischem Glaskörper (PHPV)); 8 Patienten (36%) hatten extraokuläre bzw. syndromale Auffälligkeiten. Bei 4 Patienten (18%) bestand eine positive Familienanamnese. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die klinischen Merkmale aller untersuchten Patienten mit MAC – sowohl für Fälle mit als auch ohne nachgewiesene ursächliche Variante.

Tabelle 5: Klinische Merkmale der Patienten mit MAC.

MCO = Mikrophthalmie, COL = Kolobom, FA = Familienanamnese; ursächliche Variante = ACMG-Klasse 4 und 5.

Indexpatient	Phänotyp: MCO / COL	Bilaterale Ausprägung	Weitere okuläre Auffälligkeiten	Extraokuläre Auffälligkeiten	Positive FA	Ursächliche Variante
MAC-1	– / ✓	✓	–	✓	–	–
MAC-2	✓ / ✓	✓	–	–	–	–
MAC-5	– / ✓	–	–	✓	–	–
MAC-6	✓ / ✓	✓	–	✓	–	–
MAC-7	✓ / ✓	✓	–	–	–	–
MAC-9	✓ / –	✓	✓	✓	✓	✓
MAC-10	✓ / –	✓	✓	–	✓	✓
MAC-11	– / ✓	✓	–	–	–	✓
MAC-13	✓ / –	✓	–	–	–	–
MAC-15	– / ✓	✓	–	–	–	✓
MAC-17	– / ✓	✓	–	✓	–	–
MAC-18	✓ / ✓	✓	–	–	–	–
MAC-19	✓ / –	✓	–	–	✓	✓
MAC-21	✓ / ✓	✓	✓	✓	–	–
MAC-26	– / ✓	✓	–	–	–	–
MAC-28	✓ / –	✓	–	–	✓	–
MAC-31	✓ / ✓	✓	–	–	–	–
MAC-32	– / ✓	✓	–	–	–	–
MAC-37	✓ / –	✓	✓	✓	–	✓
MAC-38	✓ / –	–	✓	–	–	–
MAC-39	– / ✓	✓	–	✓	–	✓
MAC-40	✓ / –	✓	–	–	–	✓

Bei 8 Patienten (36%) wurden als ursächlich zu klassifizierende Varianten (Klasse 4 oder 5 der ACMG-Klassifikation) in insgesamt 5 Genen (*MAB21L2*, *BCOR*, *NHS*, *MFRP*, *PRSS56*) gefunden. Dabei handelte es sich ausschließlich um beidseitige Phänotypen, hingegen konnte bei keinem der Patienten mit einseitiger Ausprägung eine ursächliche Variante nachgewiesen werden:

- *MAB21L2* (assoz. Erkrankung: Mikrophthalmie/ Kolobom mit oder ohne Skelettdysplasie, Erbgang: AD, AR (136)):

Bei den Patienten 11 und 15 mit jeweils bilateralem Iris- und Netzhaut-/ Aderhautkolobom (vgl. Abb. 15-A und B) wurde die gleiche heterozygote Variante c.58del (p.Cys20Valfs*37) (ACMG Klasse 4) gefunden, durch die es durch Verlust eines einzelnen Nukleotids (Thymin) zu einer Leserasterverschiebung (sog. Frameshift) ab dem Codon 20 kommt. Dies hat zur Folge, dass nur ca. 6% der ursprünglichen Proteinsequenz intakt bleiben und es bei Codon 37 des neuen Leserasters zu einem Stop-Codon und somit zu einem Funktionsverlust des Gens (Loss-of-Function, LOF) kommt. Die Variante wurde bisher in Literatur und Datenbanken nicht beschrieben. In beiden Fällen lagen keine extraokulären (insbesondere skeletalen oder mentalen) Auffälligkeiten vor und die Familienanamnese war negativ; eine Segregationsanalyse war jeweils nicht möglich.

Bei Patient 39 mit bilateralem Iris-/Netzhaut-/Aderhaut-/ Optikuskolobom und wurde die in der Literatur bereits beschriebene heterozygote Variante c.145G>A (p.Glu49Lys) (ACMG Klasse 5) gefunden (131). Die Variante führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Glutaminsäure nach Lysin. Die Aminosäure Glutaminsäure an Position 49 liegt in der BEACH-type PH Domäne des Proteins und ist evolutionär hoch konserviert. Es lag eine verbreiterte Großzehenspalte (sog. Sandalenlücke), was zum bekannten Spektrum von *MAB21L2*-assoziierten extraokulären Veränderungen passt (vgl. Kap. E 2.7), ansonsten bestanden keine extraokulären (insbesondere skeletalen oder mentalen) Auffälligkeiten. Die Variante war de novo, d.h. bei beiden nicht betroffenen Elternteilen nicht vorhanden (vgl. Abb. 14-E), was die Annahme einer Pathogenität unterstützt.

- BCOR (assoz. Erkrankung: OFCD-Syndrom, Erbgang: X-chromosomal-dominant (XLD); Mikrophthalmie, Erbgang: X-chromosomal-rezessiv (XLR) (137)):

Bei Patientin 9 mit bilateraler Mikrophthalmie und kongenitaler Katarakt, sowie extraokulären Auffälligkeiten (vgl. Tab. 3), wurde die heterozygote Variante c.4038_4039del (p.Glu1348Ilefs*26) (ACMG Klasse 4) gefunden, die in der Literatur in einem Fall mit ähnlicher okulärer und extraokulärer Phänotypausprägung bereits beschrieben wurde (129). Hierbei kommt es durch den Verlust von zwei Nukleotiden (Adenin, Guanin) zu einem Frameshift mit vorzeitigem Translationsabbruch bei Codon 26 des neuen Leserasters. Sowohl die Mutter als auch die Schwester der Patientin wiesen einen ähnlichen Phänotyp auf, eine ergänzende Analyse der vorliegenden Sequenzdaten ergab bei der Mutter dieselbe Variante (vgl. Abb. 14-A).

- NHS (assoz. Erkrankung: Nance-Horan-Syndrom, Erbgang: XLD (138)):

Bei einem Patienten (Nr. 10) mit bilateraler Mikrophthalmie und kongenitaler Katarakt wurde die hemizygotische Variante c.320del (p.Gly107Alafs*89) (ACMG Klasse 5) nachgewiesen, die durch eine Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt und bisher nicht in fachspezifischen Datenbanken oder der Literatur beschrieben ist. Der Patient wies keine extraokulären Auffälligkeiten auf. Die Schwester des Patienten wies den gleichen Phänotypen auf, jedoch lagen von ihr keine Sequenzdaten vor.

Bei einem weiteren Patienten (Nr. 37) mit bilateraler Mikrophthalmie und kongenitaler Katarakt wurde die hemizygotische Variante c.3659dup (p.Asn1220Lysfs*5) (ACMG Klasse 4) gefunden, die ebenfalls durch eine Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt und bisher nicht in fachspezifischen Datenbanken oder der Literatur beschrieben ist. Der Patient wies extraokuläre Auffälligkeiten auf (vgl. Tab. 3); die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse nicht möglich.

- MFRP (assoz. Erkrankung: Mikrophthalmie/ Nanophthalmos, Erbgang: AR (62)):

Bei Patient 19 mit der Diagnose bilaterale Mikrophthalmie, hohe Hyperopie und Engwinkelglaukom wurden zwei Varianten der ACMG Klasse 4 nachgewiesen. Die Variante c.201G>A (p.Trp67*) ist in der Literatur bereits beschrieben (130) und führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon mit Translationsabbruch. Die Variante c.1534T>G (p.Cys512Gly) wurde bisher in fachspezifischen Datenbanken oder der Literatur nicht

beschrieben und führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Cystein nach Glycin. Die Aminosäure Cystein an Position 512 liegt in der FZ Domäne des Proteins und ist evolutionär hoch konserviert. Die Varianten wurden unter Annahme einer Compound-Heterozygotie als pathogen bzw. ursächlich eingestuft. Extraokuläre Auffälligkeiten bestanden nicht, die Schwester des Patienten wies den gleichen Phänotypen auf, jedoch lagen von ihr keine Sequenzdaten vor.

- PRSS56 (assoz Erkrankung: Mikrophthalmie/ Nanophthalmos, Erbgang: AR (62)): Bei Patient 40 mit der Diagnose bilaterale Mikrophthalmie konnte die homozygote Variante c.1066dup (p.Gln356Profs*152) (ACMG Klasse 5) nachgewiesen werden, die bereits in mehreren Fällen in der Literatur mit dem gleichen Phänotyp beschrieben wurde (132) und zu einer Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stop-Codon führt und. Der Patient wies keine extraokulären Auffälligkeiten auf. Die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse war nicht möglich.

3.2 Vorderabschnittsdysgenesien (ASD) und Kongenitales Glaukom (PCG)

Die zweitgrößte Gruppe im Rahmen der Studie bildeten ASD/ PCG mit 14 Patienten (vgl. Abb. 13). Hiervon war bei 8 Patienten (57%) ein reines PCG beschrieben, bei 6 Patienten (43%) lagen verschiedene Formen der ASD vor, die in 67% (n=4) zu einem frühmanifesten Glaukom (=in der ersten Lebensdekade (23)) geführt hatten; bei 2 Patienten lag eine Vorderabschnittsdysgenese ohne Glaukom vor. 2 Patienten (14%) hatten weitere okuläre Auffälligkeiten (Mikrocornea/ hohe Myopie/ Makulopathie und Hornhautauffälligkeiten/ Optikusveränderungen), 2 Patienten (14%) hatten extraokuläre Auffälligkeiten. Ein Patient (7%) hatte eine einseitige Ausprägung, 13 Patienten (93%) eine beidseitige. 4 Patienten (29%) hatten eine positive Familienanamnese.

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die klinischen Merkmale aller untersuchten Patienten mit ASD/PCG – sowohl für Fälle mit als auch ohne nachgewiesene ursächliche Variante.

Tabelle 6: Klinische Merkmale der Patienten mit ASD/PCG.

FA = Familienanamnese; ursächliche Variante = ACMG-Klasse 4 und 5.

Indexpatient	Phänotyp: ASD / PCG	Bilaterale Ausprägung	Weitere okuläre Auffälligkeiten	Extraokuläre Auffälligkeiten	Positive FA	Ursächliche Variante
ASD/PCG-3	- / ✓	✓	-	-	✓	-
ASD/PCG-8	- / ✓	✓	-	-	-	✓
ASD/PCG-12	- / ✓	-	-	-	-	-
ASD/PCG-16	- / ✓	✓	-	-	-	-
ASD/PCG-20	✓ / ✓	✓	✓	✓	✓	✓
ASD/PCG-22	✓ / ✓	✓	-	-	✓	✓
ASD/PCG-23	✓ / -	✓	-	✓	✓	✓
ASD/PCG-24	- / ✓	✓	-	-	-	-
ASD/PCG-25	- / ✓	✓	-	-	-	-
ASD/PCG-27	✓ / ✓	✓	✓	-	-	✓
ASD/PCG-29	- / ✓	✓	-	-	-	-
ASD/PCG-34	✓ / ✓	✓	-	-	-	✓
ASD/PCG-35	- / ✓	✓	-	-	-	-
ASD/PCG-36	✓ / -	✓	-	-	-	-

Bei 6 Patienten (43%) wurden als ursächlich zu klassifizierende Varianten (Klasse 4 oder 5 der ACMG-Klassifikation) in insgesamt 4 Genen (*FOXC1*, *PITX2*, *CYP1B1*, *ADAMTS18*) nachgewiesen. Dabei handelte es sich ausschließlich um bilaterale Phänotypen, hingegen konnte bei keinem der Patienten mit einseitiger Ausprägung eine ursächliche Variante nachgewiesen werden:

- *FOXC1* (assoz. Erkrankung: Vorderabschnittsdysgenese/ Axenfeld-Rieger-Syndrom, Erbgang: AD (77)):

Bei Patientin 22 wurde bilateral ein ARS mit frühkindlichem Glaukom beschrieben (vgl. Abb. 15-D). In der Sequenzanalyse ergaben sich hier konkrete Hinweise auf eine Gendeletion; eine MLPA-Analyse bestätigte die heterozygote Deletion der 3'-Region von Exon 1, die als ACMG Klasse 4 zu klassifizieren ist. Eine Deletion dieses Teilbereichs von Exon 1 ist bisher in der Literatur nicht beschrieben, jedoch wurden zahlreiche Deletionen innerhalb bzw. des gesamten *FOXC1*-Gens als Ursache eines ARS publiziert (86,139). Es bestanden keine extraokulären Auffälligkeiten. Familiär wiesen Mutter, Tante, Großmutter und Cousin den gleichen Phänotypen auf, jedoch erfolgte bei den Angehörigen keine Segregationsanalyse.

Bei Patientin 34 lautete die augenärztlichen Diagnose Vorderkammerdysgenese und kongenitales Glaukom – eine genauere Definition des Phänotypen und der Glaukomausprägung (kongenital oder frühkindlich/ sekundär zur ASD) war nicht

vorhanden. Die bei ihr nachgewiesene Variante c.247T>C (p.Tyr83His) (ACMG Klasse 4) ist in der Literatur bereits beschrieben (77) und führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Tyrosin nach Histidin. Die Aminosäure Tyrosin an Position 83 liegt in keiner bisher bekannten funktionellen Domäne des Proteins und ist evolutionär nur moderat konserviert. Es bestanden keine extraokulären Auffälligkeiten. Die Familienanamnese war negativ, die Variante trat de novo auf (vgl. Abb. 14-D), was die Annahme einer Pathogenität unterstützt.

○ PITX2 (assoz. Erkrankung: Vorderabschnittsdysgenese/ Axenfeld-Rieger-Syndrom, Erbgang: AD (77)):

Bei Patientin 23 mit bilateraler Rieger-Anomalie mit Polykorie und Irishypoplasie (vgl. Abb. 15-E) ergab sich in der Sequenzanalyse ein konkreter Hinweis auf eine Deletion des gesamten Gens *PITX2*, die in einer MLPA-Analyse bestätigt wurde (Deletion aller Sonden, heterozygot; ACMG-Klasse 4). Die resultierende Haploinsuffizienz dieses Gens ist ein bekannter Pathomechanismus für Fehlbildungen des ASD-Spektrums, insbesondere auch bei Patienten mit extraokulären Auffälligkeiten (u.a. Zähne, Bauchnabel), die auch bei Patientin 23 beschrieben wurden (85–87). Die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse war nicht möglich.

○ CYP1B1 (assoz. Erkrankung: Kongenitales Glaukom, Erbgang: AR (93)):

Patientin 8, bei der innerhalb der ersten Lebensmonate ein bilaterales Glaukom festgestellt wurde, wies zwei heterozygote Varianten der ACMG Klasse 5 auf. Die Variante c.1168C>A (p.Arg390Ser) ist in der Literatur vorherbeschrieben (124) und führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Arginin nach Serin. Die Aminosäure Arginin an Position 390 liegt in keiner bisher bekannten funktionellen Domäne des Proteins, jedoch ist sie evolutionär hoch konserviert. Die bisher in fachspezifischen Datenbanken oder der Literatur nicht beschriebene Variante c.1076_1082dup (p.Asp361Glufs*16) führt zu einer Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stop-Codon. Die Varianten wurden unter Annahme einer Compound-Heterozygotie als pathogen bzw. ursächlich eingestuft. Extraokuläre Auffälligkeiten bestanden nicht. Die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse war nicht möglich.

Bei Patient 27 mit der initialen Diagnose „komplexe Augenanlagestörung“ (vgl. Abb. 15-F) wurden ebenfalls zwei heterozygote Varianten der ACMG Klasse 5

nachgewiesen, die beide in der Literatur als pathogen vorbeschrieben wurden (96,133,134). Die Variante c.1159G>A (p.Glu387Lys) führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Glutaminsäure nach Lysin. Die Aminosäure Glutaminsäure an Position 387 liegt in keiner bisher bekannten funktionellen Domäne des Proteins, ist jedoch evolutionär hoch konserviert. Die Variante c.1064_1076del (p.Arg355Hisfs*69) führt zu einer Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stop-Codon. Die Varianten wurden unter Annahme einer Compound-Heterozygotie als pathogen bzw. ursächlich eingestuft. Extraokuläre Auffälligkeiten bestanden nicht. Die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse war nicht möglich.

○ ADAMTS18 (assoz. Erkrankungen: Mikrocornea, chorioretinale Atrophie, Telekanthus (MMCAT) / Vorderabschnittsdysgenesien / Ectopia lentis / kongenitale Katarakt / Netzhautdystrophien, Erbgang: AR (140–142)):

Bei Patient 20 mit bilateralem ARS und Mikrocornea (vgl. Abb. 15-C) wurde die bisher in Literatur und fachspezifischen Datenbanken nicht beschriebene homozygote Variante c.1399G>T (p.Gly467*) (ACMG Klasse 5) nachgewiesen, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon mit Translationsabbruch führt. Der Patient hatte zudem extraokuläre Auffälligkeiten (Taurodontismus, auffällige Ohrmuschel). Schwester und Bruder des Patienten zeigten den gleichen Phänotypen, bei der Schwester konnte dieselbe Variante nachgewiesen werden, beim Bruder wurde keine Diagnostik durchgeführt (vgl. Abb. 14-B).

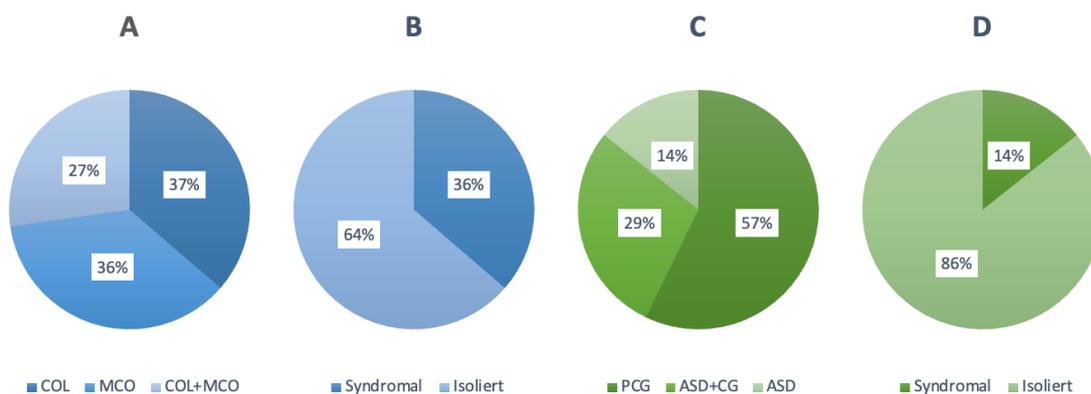


Abbildung 13: Verteilung klinischer Merkmale bei Patienten MAC und ASD/PCG. **A:** Verhältnis von Kolobom, Mikrophthalmie und kombiniertem Phänotyp. **B:** Anteil von MAC-Patienten mit und ohne extraokuläre Auffälligkeiten. **C:** Verhältnis von PCG, ASD mit Glaukom und ASD ohne Glaukom. **D:** Anteil von ASD/PCG-Patienten mit und ohne extraokuläre Auffälligkeiten. COL=Kolobom, MCO= Mikrophthalmie, PCG=Primäres kongenitales Glaukom, ASD=Vorderabschnittsdysgenesie.

3.3 Kongenitale Katarakt (CC)

Die drittgrößte Gruppe innerhalb der Studienpopulation bildeten Patienten mit kongenitaler Katarakt mit insgesamt 4 untersuchten Patienten. Davon waren alle Fälle bilateral, 2 Patienten (50%) hatte weitere okuläre Auffälligkeiten (Mikrocornea), ein Patient (25%) hatte extraokuläre Auffälligkeiten. Bei 2 Patienten (50%) bestand eine positive Familienanamnese. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die klinischen Merkmale aller untersuchten Patienten mit CC – sowohl für Fälle mit als auch ohne nachgewiesene ursächliche Variante.

Tabelle 7: Klinische Merkmale der Patienten mit CC.

FA = Familienanamnese; ursächliche Variante = ACMG-Klasse 4 und 5.

Indexpatient	Bilaterale Ausprägung	Weitere okuläre Auffälligkeiten	Extraokuläre Auffälligkeiten	Positive FA	Ursächliche Variante
CC-4	✓	–	✓	✓	✓
CC-14	✓	–	–	✓	–
CC-30	✓	✓	–	–	✓
CC-33	✓	✓	–	–	✓

Bei 3 Patienten (75%) wurden als ursächlich zu klassifizierende Varianten (Klasse 4 oder 5 der ACMG-Klassifikation) in insgesamt 3 Genen (*COL4A1*, *PAX6*, *GCNT2*) gefunden:

- *COL4A1* (assoz. Erkrankungen: *COL4A1*-assoziierte zerebrale Mikroangiopathie mit oder ohne Augenanlagestörungen, Erbgang: AD (125)):

Bei Patient 30 mit bilateraler kongenitaler Katarakt und Mikrocornea konnte die in der Literatur vorbeschriebene heterozygote Variante c.2317G>A (p.Gly773Arg) (ACMG Klasse 5) nachgewiesen werden (125,126). Die Variante führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Glycin nach Arginin. Die Aminosäure Glycin an Position 773 befindet sich in der in der Triple-Helix Domäne des Kollagens und ist evolutionär hoch konserviert. Extraokuläre Auffälligkeiten bestanden nicht. Die Familienanamnese war negativ, die Variante trat de novo auf (vgl. Abb. 14-C), was die Annahme einer Pathogenität unterstützt.

- *PAX6* (assoz. Erkrankung: Aniridie / Augenanlagestörungen, Erbgang: AD (127)):

Bei Patient 33 mit bilateraler kongenitaler Katarakt und Mikrocornea wurde die in der Literatur vorbeschriebene heterozygote Variante c.113G>A (p.Arg38Gln) (ACMG

Klasse 4) nachgewiesen (126). Die Variante führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Arginin nach Glutamin. Die Aminosäure Arginin an Position 38 befindet sich in der in der PAI-Subdomäne des Protein und ist evolutionär hoch konserviert. Extraokuläre Auffälligkeiten bestanden nicht. Die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse war nicht möglich.

- GCNT2 (assoz. Erkrankung: Kongenitale Katarakt / Blutgruppe „ adult i“, Erbgang: AR (128)):

Bei Patient 4 mit bilateraler kongenitaler Katarakt konnte die in der Literatur vorbeschriebene homozygote Variante c.1148G>A (p.Arg383His) (ACMG Klasse 4) nachgewiesen werden (128). Die Variante führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Arginin nach Histidin. Die Aminosäure Arginin an Position 383 befindet sich In der Luminal Domäne des Proteins und ist evolutionär hoch konserviert. Der Patient wies extraokuläre Auffälligkeiten auf (sprachbetonte Entwicklungsverzögerung/ Mikrozephalie). Der Bruder des Patienten wies ebenfalls eine Katarakt auf, jedoch liegen von ihm keine Sequenzdaten vor.

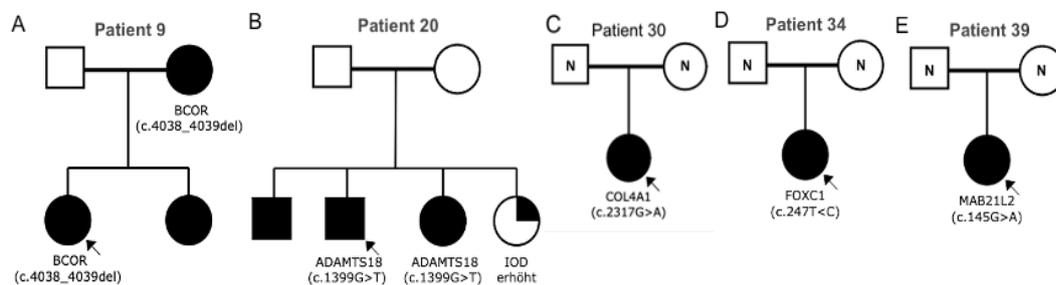


Abbildung 14: Ergebnisse der Segregationsanalysen: Bei 4 Patienten mit ursächlichen Varianten erfolgten Untersuchungen von Familienmitgliedern. **A** und **B**: Segregation von gefundenen Varianten innerhalb Eltern- und Geschwistergeneration. **C-E**: De Novo Varianten. Pfeil = Indexpatient, N = Variante bei Elternteil nicht gefunden, IOD = Intraokulardruck.

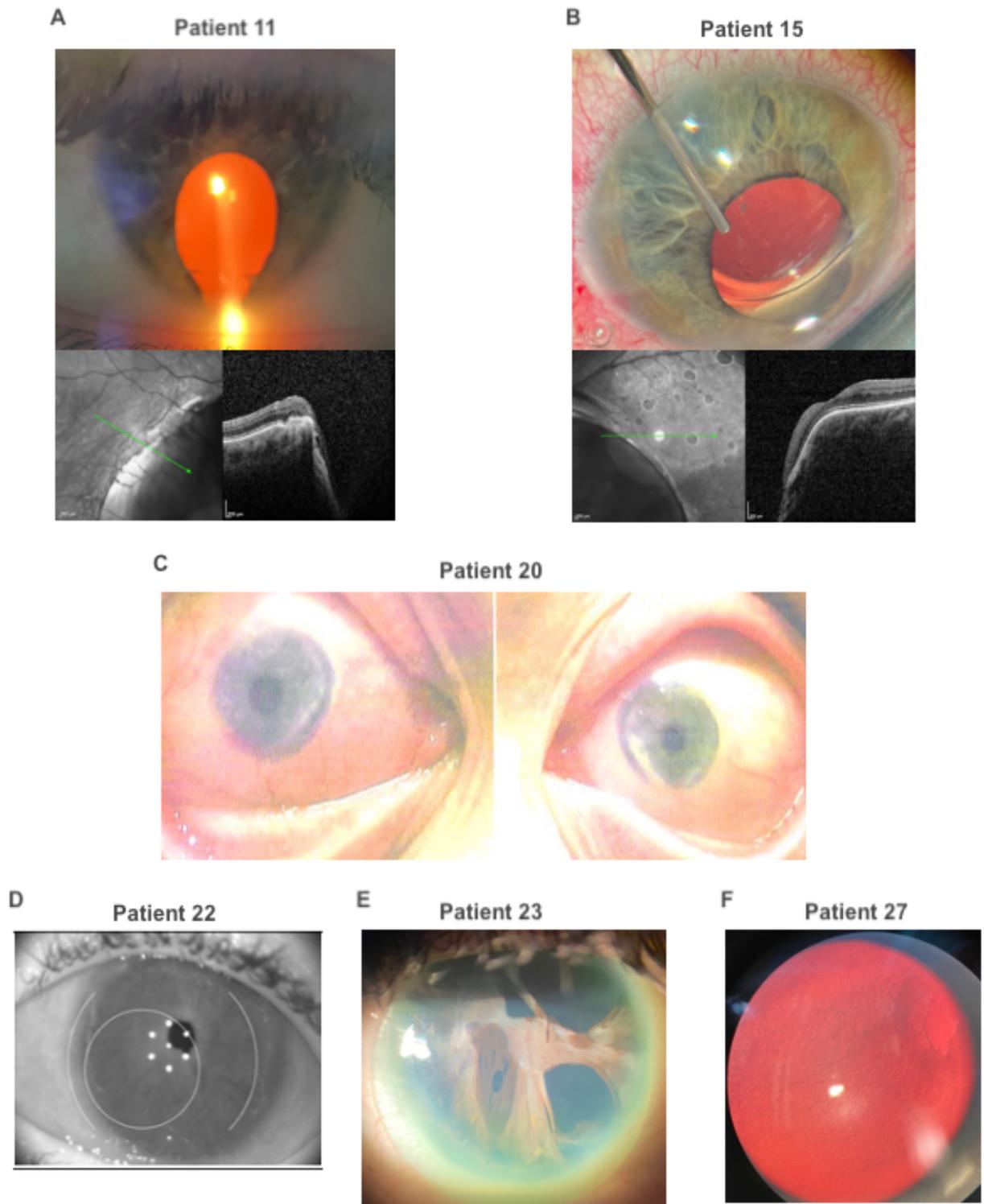


Abbildung 15: Bilder der phänotypischen Ausprägungen: **A** und **B** zeigen Iris- und Aderhautkolobome im (intraoperativen) Foto und der OCT bei 2 Patienten mit gleicher Frameshift-Variante im Gen *MAB21L2*. **C-E** zeigen unterschiedliche Ausprägungen des Axenfeld-Rieger-Spektrums mit deutlich erkennbarem Embryotoxon posterius bei Varianten in den Genen *ADAMTS18* (**C**) und *FOXC1* (**D**) und Polykorie bei *PITX2*-Veränderung (**E**). **F** zeigt atypische blasige stromale Trübungen bei *CYP1B1*-assoziiertem kongenitalem Glaukom.

4 Diagnostic Yield

Die Aufklärungsrate (engl. diagnostic yield) beschreibt den prozentualen Anteil an Patienten, bei denen eine ursächliche Variante (Klasse 4 oder 5 der ACMG-Klassifikation) Variante gefunden wurde. Sie wurde sowohl für die einzelnen Diagnoseschritte (Primärdiagnostik, Augen-Gesamtpanel, Exomanalyse) als auch für die einzelnen Phänotypen (MAC, ASD/PCG, CC) kalkuliert und zeigte sehr unterschiedliche Ergebnisse.

4.1 Diagnostic Yield pro Diagnoseschritt

In der **Primärdiagnostik** konnten bei allen untersuchten Patienten (n=40) aus allen phänotypischen Gruppen in 6 Fällen eine ursächliche Variante gefunden werden – der diagnostic yield lag somit bei 15%.

Im **Augen-Gesamtpanel** (n=34) konnten in 10 Fällen ursächliche Varianten gefunden werden, was bei isolierter Betrachtung einem diagnostic yield von 29% entspricht. Da im Augen-Gesamtpanel auch alle in der Primärdiagnostik enthaltenen Gene untersucht werden, kann für die gesamte Studienpopulation ein kumulierter diagnostic yield von 40% errechnet werden.

In der **Exomanalyse** (n=24) konnten in 1 Fall eine ursächliche Variante gefunden werden, was einem isoliert für dieses Panel betrachtetem diagnostic yield von 4% entspricht. Da im Exom wiederum alle Gene der kleineren Panels enthalten sind, kann für die gesamte Studienpopulation ein kumulierter diagnostic yield von 43% errechnet werden (vgl. hierzu Abb. 16).

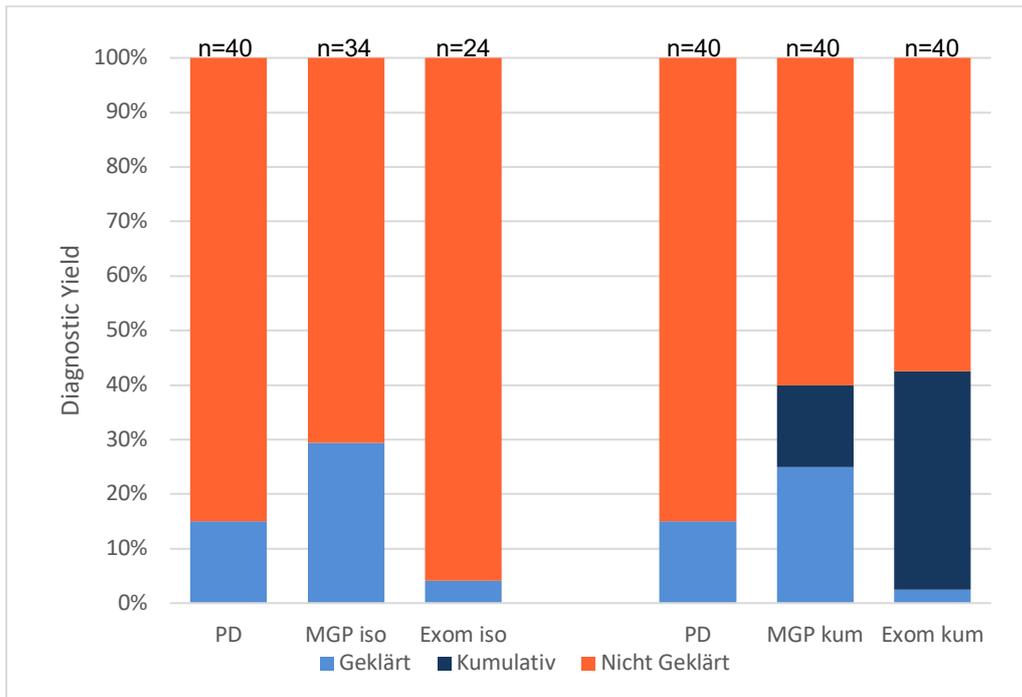


Abbildung 16: Diagnostic Yield pro Diagnoseschritt. Anteil von gefundenen ursächlichen Varianten (ACMG-Klassen 4+5) für die einzelnen diagnostischen Schritte. Nicht geklärte Varianten beinhalten VUS (ACMG-Klasse 3). PD = Primärdiagnostik, MGP = Augen-Gesamtpanel, Exom = Exomanalyse, geklärt = ursächliche Variante in diesem Diagnoseschritt gefunden, nicht geklärt = keine ursächliche Variante gefunden, Kumulativ = kombinierte Aufklärungsrate der Diagnoseschritte, n = Anzahl der Patienten, iso = isoliert, kum = kumulativ.

4.2 Diagnostic Yield pro Phänotyp

Bezogen auf die einzelnen Phänotyp-Gruppen, hatte die Sequenzanalyse eine sehr variablen Diagnoserate für ursächliche Varianten (ACMG-Klasse 4 und 5): am höchsten lag sie bei CC mit 75%, gefolgt von ASD/ PCG mit 43% und MAC mit 36% (vgl. Abb. 17).

Auch für einzelne Subgruppen war der diagnostic yield sehr unterschiedlich (vgl. Abb. 18): Bei Patienten mit unilateraler Ausprägung der Erkrankung konnte in keinem Fall (0%), bei Patienten mit bilateraler Ausprägung in 46% (CC: 75%, ASD/PCG: 46%, MAC: 40%) eine ursächliche Variante gefunden werden.

Bei Patienten einfachem okulärem Phänotyp konnten 32% (CC: 50%, ASD/PCG: 33%, MAC: 29%) der Fälle, bei Patienten mit zusätzlichen okulären Auffälligkeiten 78% (CC: 100%, MAC: 60%, ASD/PCG: 100%) mit einer ursächlichen Variante aufgeklärt werden. Bei Patienten mit zusätzlichen extraokulären bzw. syndromalen Auffälligkeiten wurde in 55% (CC: 100%, ASD/PCG: 100%, MAC: 38%), bei Patienten mit isoliert okulärem Phänotyp in 38% (CC: 67%, ASD/PCG: 33%, MAC: 36%) eine ursächliche Variante nachgewiesen. Bei positiver Familienanamnese lag der diagnostic yield bei 70% (MAC: 75%, ASD/PCG: 75%, CC: 50%), bei negativer Familienanamnese bei 33% (CC 100%, ASD/PCG: 30%, MAC: 28%).

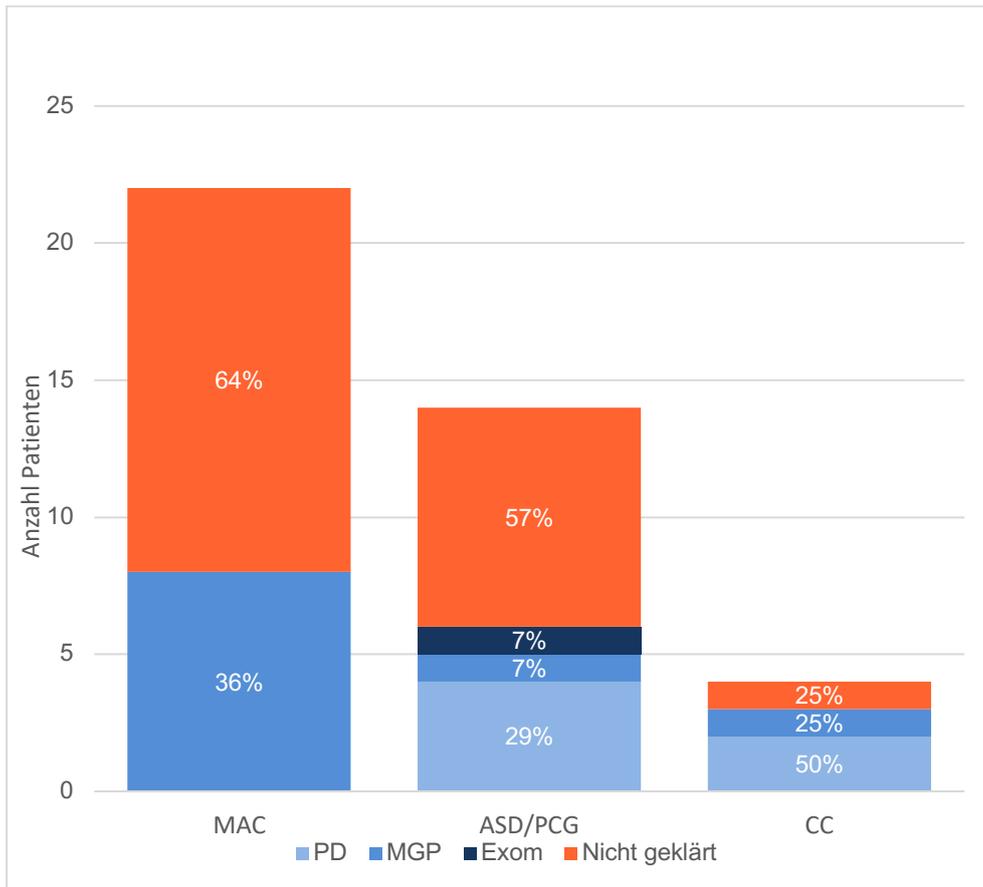


Abbildung 17: Diagnostic Yield pro Phänotyp: Anteil von gefundenen ursächlichen Varianten (ACMG-Klassen 4+5) für die einzelnen phänotypischen Entitäten und diagnostischen Schritte. Nicht geklärte Varianten beinhalten VUS (ACMG-Klasse 3). PD = Primärdiagnostik, MGP = Augen-Gesamtpanel, Exom = Exomanalyse.

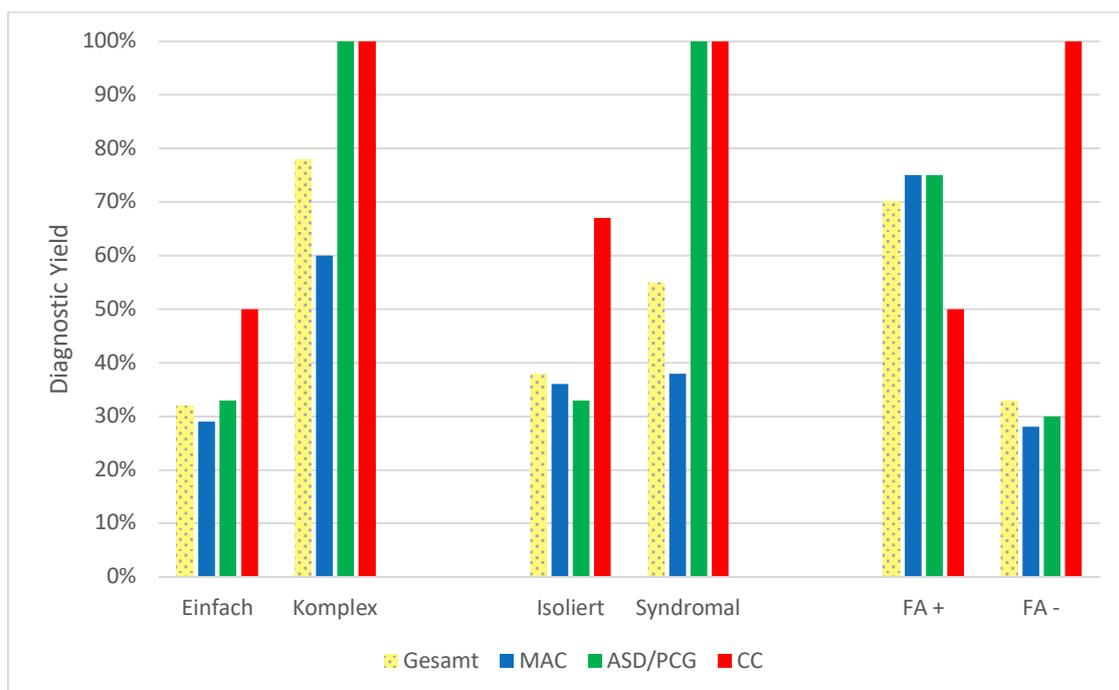


Abbildung 18: Diagnostic Yield pro Subgruppe: Anteil von gefundenen ursächlichen Varianten (ACMG-Klassen 4+5) für die einzelnen Subgruppen und phänotypischen Ausprägungsgrade. Einfach/Komplex = Fehlen/Vorliegen weiterer okulärer Auffälligkeiten, Isoliert/Extraokulär = Fehlen/Vorliegen von extraokulären/syndromalen Auffälligkeiten, FA +/- = Familienanamnese positiv oder negativ.

5 Unklare Sequenzvarianten und Kandidatengene

Bei 6 Patienten wurden Varianten unklarer Signifikanz (VUS, Klasse 3 der ACMG-Klassifikation) in insgesamt 5 Genen (*POGZ*, *COL18A1*, *FAT1*, *CRYBB1*, *MFRP*) gefunden (vgl. Tabelle 8), die bisher in klinischen Datenbanken selten oder noch nie beschrieben wurden und mögliche Relevanz bezüglich der jeweiligen Phänotypen besitzen, wie auch jeweils ausführlich in Kapitel E 2.8 – 2.12 dargestellt wird.

- *POGZ* (assoz. Erkrankung: White-Sutton-Syndrom, Erbgang: AD (143,144)):

Bei Patientin 1 mit Iris-/Aderhautkolobom am rechten Auge und Optikuskolobom am linken Auge konnte die in der Literatur und fachspezifischen Datenbanken bisher nicht beschriebene heterozygote Variante c.3271C>T (p.His1091Tyr) nachgewiesen werden. Die Variante führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Histidin nach Tyrosin. Die Aminosäure Histidin an Position 1091 liegt in keiner bisher bekannten funktionellen Domäne des Proteins, allerdings ist sie evolutionär hoch konserviert. Bei der Patientin lag zudem eine motorische Entwicklungsverzögerung vor. Die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse war nicht möglich.

Bei Patient 5 mit unilateralem Iris-/Aderhautkolobom wurde die heterozygote Variante c.4086A>C (p.Glu1362Asp) gefunden, die in bereits als VUS bei einem Patienten mit isolierter gastrointestinaler Anlagestörung beschrieben wurde (145). Die Variante führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Glutaminsäure nach Asparaginsäure. Die Aminosäure Glutaminsäure liegt in der Disordered Domäne des Proteins, ist evolutionär jedoch nur moderat konserviert. Bei dem Patienten bestand zudem eine generelle Entwicklungsverzögerung. Die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse war nicht möglich.

- *COL18A1* (assoz. Erkrankung: Knobloch-Syndrom, Erbgang: AR; Engwinkelglaukom, Erbgang: AD (146,147)):

Bei Patient 12, bei dem ein einseitiges frühkindliches Glaukom beschrieben wurde, wurde die bisher in der Literatur und fachspezifischen Datenbanken nicht beschriebene heterozygote Variante c.2156C>T (p.Thr719Met) nachgewiesen. Die Variante führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Threonin nach Methionin. Die Aminosäure Threonin an Position 719 liegt in der Disordered Domäne des Proteins, ist evolutionär jedoch nur moderat konserviert. Extraokuläre

Auffälligkeiten bestanden nicht. Die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse war nicht möglich.

○ CRYBB1 (assoz. Erkrankung: Kongenitale Katarakt, Erbgang: AD, AR (105)):

Bei Patientin 14 mit isolierter bilateraler kongenitaler Katarakt wurde die bisher in Literatur und fachspezifischen Datenbanken bisher nicht beschriebene heterozygote Variante c.588_602dup (p.Gln197_Tyr201dup) im nachgewiesen. Hierdurch kommt es zu einer Duplikation von 5 evolutionär hoch konservierten Aminosäuren (Glutamin, Tyrosin, Prolin, Glycin, Tyrosin) in der Beta/Gamma Domäne des Proteins. Extraokuläre Auffälligkeiten bestanden nicht. Die Familienanamnese ist positiv, die Segregationsanalyse der zur Testung verfügbaren Familienmitglieder ergab, dass alle betroffenen Familienmitglieder Träger der Variante sind, die nicht betroffenen Familienmitglieder hingegen nicht (vgl. Abb. 19-A); dennoch ist die Variante weiterhin formell als unklare Sequenzvariante (ACMG-Klasse 3) zu klassifizieren.

○ FAT1 (assoz. Erkrankung: Glomerotubuläre Nephropathie/ FAT1-assoziiertes multisystemisches Syndrom (u.a. Kolobom, Mikrophthalmie, Gesichtsdysmorphie, Syndakylie, Nephropathie), Erbgang: AR (148–150)):

Bei Patientin 26 mit beidseitigem Iris-/Netzhaut-/Aderhautkolobom wurde die bisher in der Literatur und fachspezifischen Datenbanken nicht beschriebene heterozygote Variante c.1025G>C (p.Gly342Ala) im gefunden. Die Variante führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Glycin nach Alanin. Die Aminosäure Glycin an Position 342 liegt in der Extracellulär Domäne des Proteins und ist evolutionär hoch konserviert. Die Patientin hatte keine extraokuläre Auffälligkeiten. Die Familienanamnese war negativ, eine Segregationsanalyse war nicht möglich.

○ MFRP (assoz. Erkrankung: Mikrophthalmie/ Nanophthalmos, Erbgang: AR (62)):

Bei Patientin 28, bei der klinisch eine bilaterale Mikrophthalmie beschrieben wurde, konnte die bisher nicht in der Literatur und fachspezifischen Datenbanken beschriebene homozygoten Variante c.572T>A (p.Ile191Lys) nachgewiesen werden. Die Variante führt zu einem vorhergesagten Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Lysin. Die Aminosäure Isoleucin an Position 191 liegt in keiner bisher bekannten Domäne des Proteins und ist evolutionär nur moderat konserviert. Extraokuläre Auffälligkeiten bestanden nicht. Der Bruder war gleichermaßen von der

Erkrankung betroffen; bei ihm konnte die Variante c.572T>A (p.Ile191Lys) in der Segregationsanalyse ebenfalls nachgewiesen werden (vgl. Abb. 19 B1-B3).

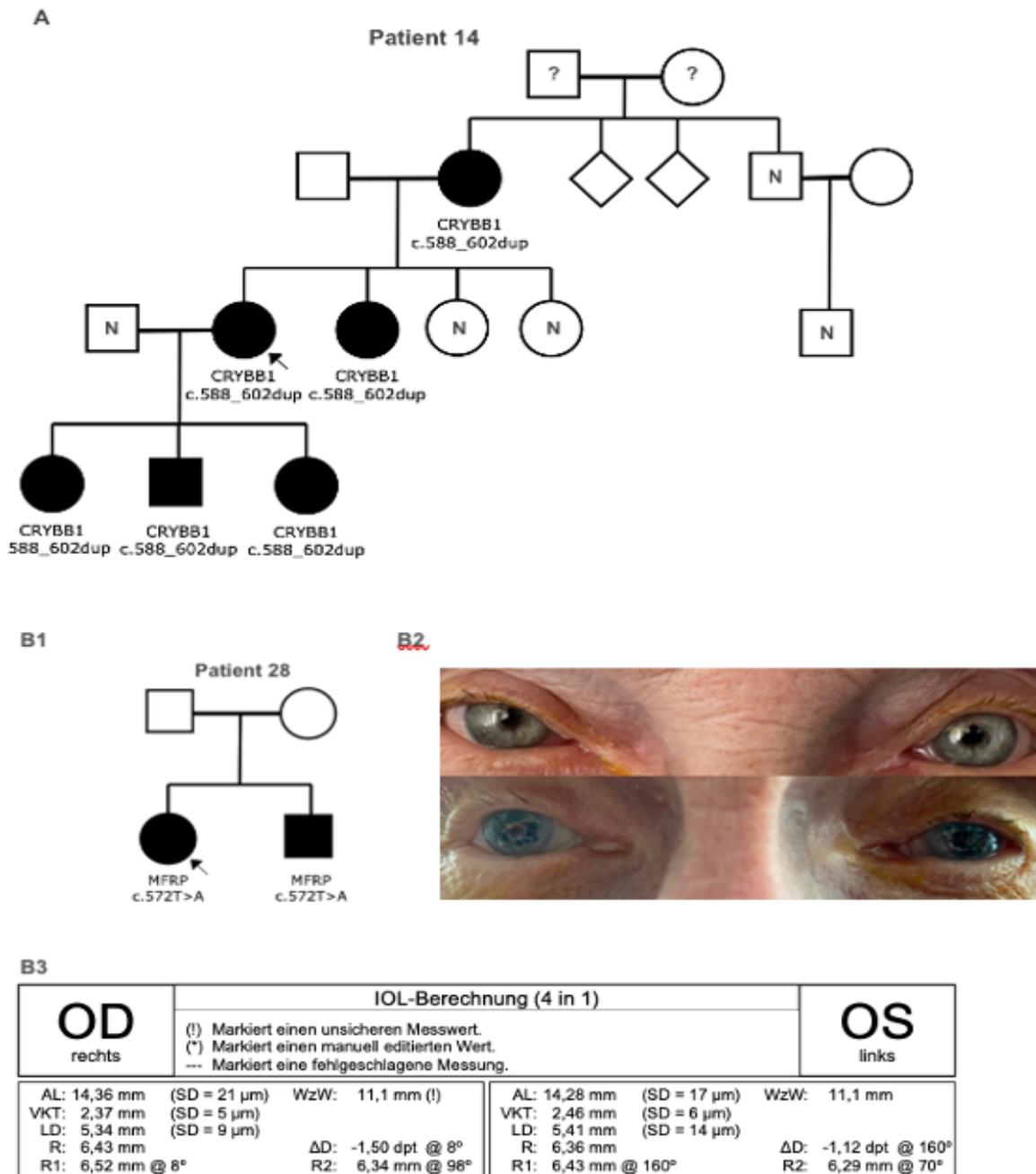


Abbildung 19: Segregationsanalyse und Phänotypen bei VUS. **A:** Segregation der *CRYBB1*-Variante innerhalb der Familie von Pat. 14. **B1-B3** betreffen Pat. 28: Segregation der *MFRP*-Variante, Bild des beidseitigen Nanophthalmos bei beiden betroffenen Geschwister, Biometriemessung mit extrem kurzer Achslänge, flacher Vorderkammer, kleinen Hornhautradien. VUS = Variante unklarer Signifikanz, ? = Phänotyp nicht bekannt, N = Variante nicht vorhanden, Pfeil = Indexpatient, OD/OS = rechtes/linkes Auge, AL = Achslänge, VKT = Vorderkammertiefe, LD = Linsendicke, R(1/2) = Hornhautradien, SD = Standardabweichung, WzW = Weiß-zu-Weiß Abstand.

Tabelle 8: Varianten unklarer Signifikanz und Kandidatengene:

Patienten, bei denen in NGS-Untersuchung eine Phänotyp-relevante Variante unklarer Signifikanz (VUS, ACMG-Klasse 3) gefunden wurde.

het = heterozygot, hom = homozygot, - = nicht zutreffend, Bekannt = in Literatur/ Datenbanken beschrieben, N.B. = in Literatur/ Datenbanken bisher nicht beschrieben, ø = nicht bekannt/ nicht erfolgt, de novo = Segregationsanalyse negativ.

Indexpatient	Beschriebener okulärer Phänotyp	Ausprägung	Extraokulärer Phänotyp	Familienanamnese	Gen	Sequenzvariante (cDNA-Veränderung)	Aminosäuren-Veränderung	Mutationstyp	ACMG-Klasse	Variante bekannt?	Segregation/ Familienmitglied mit gleicher Variante
MAC-1	Iris-/Aderhautkolobom rechts, Optikuskolobom links	Bilateral	motorische Entwicklungsverzögerung	Negativ	<i>POGZ</i>	c.3271C>T; het	p.His1091Tyr	Missense	Klasse 3	N.B.	ø
MAC-5	Iris-/Aderhautkolobom	Unilateral	Entwicklungsverzögerung	Negativ	<i>POGZ</i>	c.4086A>C; het	p.Glu1362Asp	Missense	Klasse 3	Bekannt (145)	ø
MAC-26	Iris-/ Netzhaut-/Aderhautkolobom	Bilateral	-	Negativ	<i>FAT1</i>	c.1025G>C; het	p.Gly342Ala	Missense	Klasse 3	N.B.	ø
MAC-28	Mikrophthalmie, extreme Hyperopie Engwinkelglaukom	Bilateral	-	Positiv (Bruder)	<i>MFRP</i>	c.572T>A ; hom	p.Ile191Lys	Missense	Klasse 3	N.B.	Bruder
ASD/PCG-12	Frühkindliches Glaukom	Unilateral	-	Negativ	<i>COL18A1</i>	c.2156C>T; het	p.Thr719Met	Missense	Klasse 3	N.B.	ø
CC-14	Kongenitale Katarakt	Bilateral	-	Positiv (Mutter, Schwester, Tochter, Tochter, Sohn)	<i>CRYBB1</i>	c.588_602dup; het	p.Gln197_Tyr201 dup	Intragenische Duplikation	Klasse 3	N.B.	Mutter, Schwester, Tochter, Tochter, Sohn

E Diskussion

1 Aufklärung von kongenitalen Augenfehlbildungen durch NGS

Im Rahmen der Studie sollte durch erweiterte Analyse der NGS-Daten von Patienten mit primären Augenanlagestörungen die jeweiligen molekulargenetischen Ursachen abgeklärt werden. Zudem sollte die Aufklärungsrate (diagnostic yield) verschiedener Gen-Panels bzw. Diagnostikstrategien ermittelt und miteinander verglichen werden. In 17 von 40 Fällen konnte durch NGS die molekulargenetische Diagnose durch Nachweis von ursächlichen Varianten (Klasse 4 und 5 ACMG-Klassifikation) – in insgesamt 12 bisher bekannten bzw. mit Augenerkrankungen assoziierten Genen – gesichert werden. Dabei waren 6 Varianten neu, da sie bisher weder in der Literatur oder in einer fachspezifischen Datenbank beschrieben wurden. Zudem wurden bei zwei Patienten Varianten unklarer Signifikanz (Klasse 3 ACMG-Klassifikation) in *CRYBB1* bzw. *MFRP* nachgewiesen, die in Zusammenschau der klinischen und genetischen Daten trotz formaler Klassifikation als VUS ebenfalls sehr wahrscheinlich als ursächlich anzusehen sind (vgl. Kap. E 2.8 und 2.9).

1.1 Diagnostic yield durch NGS

In der **Primärdiagnostik** konnten 6 von 40 Fällen, im **Augen-Gesamtpanel** weitere 10 Fälle, in der **Exomanalyse** schließlich noch ein weiterer Fall aufgeklärt werden. Folglich ist die Aufklärungsrate bzw. der diagnostic yield im Vergleich der einzelnen Diagnostikschritte bei isolierter Betrachtung im Augen-Gesamtpanel am höchsten (29%), gefolgt von der Primärdiagnostik (15%) und der Exomanalyse (4%). Demgegenüber lässt sich aus dem kumulierten diagnostic yield ablesen, um wieviel sich die Aufklärungsrate pro Diagnostikschritt erhöht, d.h. wie effizient eine erweiterte Diagnostik wäre: In der Primärdiagnostik bleibt er bei 15%, im Augen-Gesamtpanel beträgt er 40%, in der Exomanalyse 43%. Unter Einbeziehung der in den betroffenen Familien klinisch als ursächlich anzusehenden VUS (Klasse 3 ACMG-Klassifikation) in *MFRP* bzw. *CRYBB1* (vgl. Kap. E 2.8 / 2.9) erhöht sich der diagnostic yield in der Primärdiagnostik auf 18% und im Augen-Gesamtpanel auf 32%; dementsprechend erhöht sich der kumulierte diagnostic yield in der Primärdiagnostik auf 18%, im Augen-Gesamtpanel auf 45% und in der Exomanalyse auf 48%. Dies bedeutet im Ergebnis, dass das Augen-Gesamtpanel sowohl isoliert den höchsten diagnostic yield bietet, als auch die Aufklärungsrate ca. 2,5fach gegenüber der Primärdiagnostik erhöht. Durch eine

zusätzliche Exomanalyse konnte hingegen nur noch in einem weiteren Fall eine pathogene Variante nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bewegen sich im Rahmen anderer Studien, die für Phänotyp-übergreifende Augenpanels Aufklärungsraten von 24,5%-75% (4,23,145,151–154) berichten. Bezüglich des Unterschiedes der Aufklärungsrate von Primärdiagnostik mittels kleiner Phänotyp-spezifischer Panels und Phänotyp-übergreifenden MGP bei angeborenen Augenfehlbildungen zeigen frühere Studien, dass die Aufklärungsrate durch MGP gegenüber der Einzelgenanalyse bei erblichen Augenerkrankungen deutlich ansteigt (2) und grundsätzlich bei Erkrankungen mit heterogenem Phäno- und Genotyp die Anzahl von nachgewiesenen pathogenen Varianten durch parallele Sequenzierung vieler Gene deutlich erhöht wird (117,154) – dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Untersuchung (2,5fache Aufklärungsrate durch großes MGP ggü. PD) überein. Für MGP und WES werden für die kongenitale Augenerkrankungen vergleichbare Aufklärungsraten berichtet, wobei durch Exom-Analyse regelmäßig einzelne zusätzliche Fälle im Vergleich zum MGP aufgeklärt werden können (2,4,60,154); dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen. Hingegen konnte in anderen Studien eine Überlegenheit von MGP bezüglich des diagnostic yield gegenüber WES festgestellt werden (11,151). Insgesamt können die Literaturdaten jedoch nur als grobes Vergleichsraster dienen, da u.a. die konkret untersuchten Krankheitsbilder, das Patientenkollektiv, die Zusammenstellung der analysierten Gen-Panels – sowohl PD als auch MGP – und das Studiendesign jeweils extrem unterschiedlich sind und auch uneinheitliche Kriterien zur Variantenklassifikation verwendet wurden, was sich in den Unterschieden und der große Streubreite der berichteten Aufklärungsraten manifestiert.

Grundsätzlich kann aus der Datenlage und unseren Ergebnissen die generelle Schlussfolgerung gezogen werden, dass bei angeborenen Augenfehlbildungen der diagnostic yield bei Anwendung von Phänotyp-übergreifenden MGP und WES meist vielfach höher ausfällt als bei der Analyse eines kleinen Sets an Phänotyp-assoziierten Genen bzw. Einzelgenanalyse. MGP und WES sind dabei bzgl. des diagnostic yield im Wesentlichen vergleichbar und können in den meisten Studien in ungefähr der Hälfte der Fälle eine genetische Diagnosestellung ermöglichen. Damit ist die Aufklärungsrate durch NGS bei kongenitalen Augenfehlbildungen höher, als für andere kindliche (insbesondere neurologische) Erkrankungen (153).

1.2 Diagnostic yield für einzelne Phänotyp-Gruppen

In der Studienpopulation war der diagnostic yield für sicher pathogene Varianten (ACMG-Klasse 4 und 5) insgesamt am höchsten für den Phänotyp CC (75%), gefolgt von ASD/ PCG (43%) und MAC (36%). Diese grundsätzliche Reihenfolge bestätigte sich auch in fast allen Subgruppenanalysen.

In anderen Studien wurden ähnliche Ergebnisse berichtet; *Patel et al.* kamen in einer sehr großen MGP-Untersuchung zu einer Aufklärungsrate bei CC in 88,9%, bei ASD/PCG in 24,8% und bei MAC in 8,2% (23). Weitere NGS-basierte Untersuchungen zeigen bei CC ähnlich hohe Aufklärungsraten von 44,4%-88,9% (3,9,11,103,153,155). Auch bei ASD/PCG wurden ebenfalls Aufklärungsraten von 31%-60% (11,83,155) berichtet; in einer Studie wurde in 90% (153) eine ursächliche Variante gefunden wurde. Bei MAC war der diagnostic yield mit 36% höher als die meisten die in der Literatur berichteten Ergebnisse, die zwischen 11%-29% lagen (8,11,22,60,156,157); eine kürzlich veröffentlichte Studie erreichte eine höhere Aufklärungsrate von 47% (149).

Bei Patienten mit unilateraler Phänotypausprägung konnte kein einziger Fall aufgeklärt werden, während bei Patienten mit bilateraler Ausprägung mit 46% in fast der Hälfte der Fälle eine ursächliche Variante gefunden wurde; in der Literatur wird ebenfalls eine deutlich geringere Aufklärungsrate bei Patienten mit unilateraler MAC berichtet (8,23). Möglicherweise sind bei unilateralen Phänotypen vermehrt exogene Faktoren während der Augenentwicklung, wie intrauterine Infektionen (vgl. Kap. E 3.2.2), ursächlich. Zudem könnten Mosaik, die im Blut nicht nachgewiesen werden können, eine Rolle spielen; hierzu gibt es bisher jedoch keine entsprechenden Studien bzw. nur einzelne Fallberichte mit chromosomalen Aberrationen (158,159). Bei Patienten mit einfachem okulärem Phänotyp war die Aufklärungsrate insgesamt geringer (32%), als bei Patienten mit komplexeren okulären Phänotypen (78%), was sich auch bei Betrachtung der einzelnen Phänotypgruppen bestätigt. Bei Patienten mit extraokulären Auffälligkeiten konnten insgesamt mehr Fälle ursächlich geklärt werden (55%) als bei Patienten mit isoliert okulärem Phänotyp (38%), wobei bei CC und ASD/PCG eine deutlich höhere Aufklärungsrate für Patienten mit extraokulären Auffälligkeiten auffällt, während die Quote bei MAC für extraokuläre und rein okuläre Phänotypen vergleichbar ist – auch unter Einbeziehung der klinisch für die betroffene Familie als ursächlich anzusehenden VUS in *MFRP* (vgl. Kap. E 2.8). Diese

Ergebnisse stehen teilweise im Gegensatz zu Berichten anderer Autoren, dass sowohl bei Patienten mit MAC und extraokulären Auffälligkeiten gegenüber isolierter MAC als auch bei Patienten mit isolierter CC gegenüber Patienten mit syndromaler CC mehr Fälle ursächlich geklärt werden konnten (8,9,23,103,149).

Bei positiver Familienanamnese ergab sich eine Erhöhung des diagnostic yield auf 70% gegenüber 33% bei negativer Familienanamnese, was mit ähnlichen Ergebnissen in der Literatur vergleichbar ist (2,8,83,103). Dabei lag der diagnostic yield bei positiver Familienanamnese bei autosomal-dominantem Erbgang bei 50%, bei autosomal-rezessivem Erbgang bei 75%, bei X-chromosomalem Erbgang bei 100%. Unter Einbeziehung der klinisch für die betroffene Familie als ursächlich anzusehenden VUS in *MFRP* bzw. *CRYBB1* (vgl. Kap E 2.8 / 2.9) erhöht sich der diagnostic yield bei positiver Familienanamnese auf 90% (bei autosomal-dominantem Erbgang auf 75%, bei autosomal-rezessivem Erbgang auf 100%). In unserem Kollektiv konnten bei Patienten mit CC bei positiver Familienanamnese – bei jedoch auch geringer Fallzahl – weniger kausale Varianten nachgewiesen werden, auch im relativen Vergleich zu Patienten mit MAC und ASD/PCG. Unter Einbeziehung der für die betroffene Familie als ursächlich anzusehenden VUS in *CRYBB1* (vgl. Kap. E 2.9) erhöht sich der diagnostic yield bei CC und positiver Familienanamnese hingegen auf 100%.

Die Ergebnisse unserer Studienpopulation stehen somit im Wesentlichen im Einklang mit der bekannten Studienlage – jedoch sind auch hierbei die grundsätzlichen Limitationen der Vergleichbarkeit durch sehr große Unterschiede in Studiendesign, Patientenkollektiven, untersuchten Krankheitsbildern, Klassifikationskriterien, Untersuchungsmethoden und Panelauswahl zu beachten.

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass nach der Studienlage und den Ergebnissen dieses Patientenkollektivs in der Regel die höchsten Aufklärungsraten zu erwarten sind bei A) bilateraler Ausprägung der Erkrankung, B) bei positiver Familienanamnese, C) bei komplexen okulären Phänotypen und/ oder extraokulären Auffälligkeiten. Hingegen können insbesondere bei unilateraler Ausprägung und negativer Familienanamnese in der Regel weniger Fälle molekulargenetisch aufgeklärt werden.

2 Identifikation seltener und neuer Genotyp-Phänotyp Assoziationen und bisher unbekannter Ursachen kongenitaler Augenfehlbildungen

Weiteres Ziel der Studie war es, die phänotypische Ausprägung, die durch bestimmte genetische Veränderungen verursacht wird, besser zu definieren und ggf. um neue Assoziationen zu erweitern, um ein besseres Verständnis des möglichen klinischen Spektrums zu erreichen. Zudem sollten neue genetische Varianten in bereits in der Routinediagnostik enthaltenen Genen, sowie potentielle neue Kandidatengene identifiziert werden.

2.1 CYP1B1

Das Gen *CYP1B1* ist Teil der Cytochrom-P450 Superfamilie und spielt u.a. eine Rolle in der Entwicklung von Schlemm-Kanal und Trabekelwerk, wobei die genauen molekularen Mechanismen nicht bekannt sind (27,93,96). Biallelische Varianten in *CYP1B1* sind die bis heute die am häufigsten beschriebene Ursache des autosomal-rezessiv vererbten kongenitalen Glaukoms (PCG) (73).

Bei Patient 27, der wenige Tage nach der Geburt zur augenärztlichen Abklärung überwiesen wurde, lautete die initiale Diagnose zunächst komplexe Augenanlagestörung, Irishypoplasie, blasige stromale Hornhauttrübung und unklare Optikusveränderung mit hellem umgebendem Hof; eine Erhöhung des Intraokulardrucks konnte bei den ersten Messungen zunächst nicht festgestellt werden. Die initial durchgeführte Primärdiagnostik blieb ergebnislos; aufgrund der wenig spezifischen phänotypischen Beschreibung war die Auswahl der zu analysierenden Gene erschwert und es wurden primär Gene aus dem MAC-Spektrum analysiert; erst in der Folge konnte ca. zwei Monate nach den Erstuntersuchungen und der genetischen Primärdiagnostik ein manifestes Glaukom mit deutlich erhöhtem Intraokulardruck festgestellt werden. Im Multigen-Augenpanel wurden schließlich die zwei pathogenen Varianten c.1159G>A (p.Glu387Lys) und c.1064_1076del (p.Arg355Hisfs*69) in *CYP1B1* nachgewiesen. Aufgrund des spezifischen Phänotyps ist eine Compound-Heterozygotie anzunehmen. Während bei Patienten mit den gleichen Varianten, die in der Literatur in compound-heterozygotem Zustand schon im Zusammenhang mit *CYP1B1*-assoziiertem PCG beschrieben wurden, ein isoliertes kongenitales Glaukom ohne gleichzeitige Hornhauttrübungen, Irishypoplasie oder Optikusveränderungen vorlag (96,133,134), konnte in einzelnen anderen Fällen, in denen die Variante c.1064_1076del in

compound-heterozygotem Zustand mit anderen Varianten vorlag, ebenfalls zusätzliche Irisanlagestörungen (Irishypoplasie bzw. Axenfeld-Anomalie) festgestellt werden.

Das *CYP1B1*-assoziierte PCG wird in vielen berichteten Fällen von Hornhauttrübungen (engl. corneal opacity) begleitet, jedoch handelt es sich hierbei meist um ein Hornhautödem, Buphthalmus, Haab-Striae oder auch eine dichte zentrale Trübung im Rahmen einer Peters-Anomalie (75,93,95,160,161). Auch gibt es einzelne Charakterisierungen von *CYP1B1*-Patienten (ohne Iris-/Optikusveränderungen) mit einer diffusen, mattglasartigen, die gesamte Hornhaut betreffenden, vom Augeninnendruck unabhängigen kornealen Trübung (95,162), die am ehesten zur klinischen Präsentation bei unserem Patienten passt, sodass unsere Ergebnisse einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang dieser seltenen phänotypischen Ausprägung mit Veränderungen im Gen *CYP1B1* ergeben. Unsere Ergebnisse bestätigen somit bisher nur selten beschriebenen phänotypische Ausprägungen von *CYP1B1*-Veränderungen (Irisanlagestörungen im Zusammenhang mit der Variante c.1064_1076del / diffuse mattglasartige korneale Trübungen); insgesamt ergibt sich eine neue Phänotyp-Genotyp Assoziation für *CYP1B1*-assoziiertes PCG mit stromaler Hornhauttrübung, Irishypoplasie und Optikusveränderung mit blassem umgebendem Hof und erst sekundär festgestelltem Glaukom. Dies erweitert das klinische Bild von krankheitsverursachenden Varianten und steht im Einklang mit der beschriebenen ausgeprägten phänotypischen Variabilität von Patienten mit pathogenen Varianten in *CYP1B1* (75,94). Patientin 8 mit zeigte klinisch den klassischen Phänotypen eines isolierten PCG mit Diagnose eines manifesten Glaukoms innerhalb der ersten Lebensmonate; bei ihr wurden die pathogenen Varianten c.1168C>A (p.Arg390Ser) und c.1076_1082dup (p.Asp361Glufs*16), bei denen ebenfalls aufgrund des klassischen Phänotyps eine Compound-Heterozygotie anzunehmen ist, nachgewiesen. Dabei konnte die Frameshift-Variante c.1076_1082dup (p.Asp361Glufs*16) im Rahmen unserer Studie erstmals beschrieben werden und erweitert das Spektrum bekannter krankheitsursächlicher *CYP1B1*-Varianten bei isoliertem PCG.

2.2 ADAMTS18

Das Gen *ADAMTS18* ist ein Teil der ADAMTS-Proteasenfamilie und spielt eine bis heute nicht genau verstandene Rolle in der Embryonalentwicklung des Auges (163).

Biallelische Varianten wurden im Zusammenhang mit dem MMCAT-Syndrom (Mikrocornea, myope chorioretinale Atrophie, Telekanthus), bei Patienten mit Mikrocornea und Stäbchen-Zapfendystrophie, teilweise mit frühkindlicher Katarakt und/ oder Ectopia lentis und/ oder Korektomie, sowie bei einem Patienten mit frühkindlicher schwerer Netzhautdystrophie (ohne Vorderabschnittsdysgenese) beschrieben (140–142). Dabei folgten alle Krankheitsbilder einem autosomal-rezessiven Erbgang.

Bei Patient 20 lauteten die augenärztlichen Diagnosen bilaterale Axenfeld-Rieger-Anomalie, Mikrocornea und Glaukom. In der Primärdiagnostik und auch in der Nachauswertung mittels Augen-Gesamtpanel wurde keine ursächlich Variante gefunden; erst die Exomanalyse ergab die in Literatur und fachspezifischen Datenbanken bisher nicht beschriebene homozygote pathogene Variante c.1399G>T (p.Gly467*). Da die Literaturlage zum Zeitpunkt der Zusammenstellung des Augen-Gesamtpanels nur einzelne Fallberichte mit Retinopathie-assoziiertem Phänotyp umfasste, war das Gen *ADAMTS18* nicht im MGP enthalten. Der Phänotyp unseres Patienten geht weit über die in den Fallberichten beschriebenen Phänotypen hinaus. So wies er zusätzlich zu einer Mikrocornea ein ARS mit Embryotoxon posterius, iridocornealen Adhäsionen, Korektomie und Irishypoplasie auf; im jungen Erwachsenenalter hatte sich beidseits ein Glaukom entwickelt. Zudem bestanden – zum ARS passende – Zahnanomalien (Taurodontismus) und kraniofaziale Auffälligkeiten (Ohrmuschel) (88). Beidseits bestand hohe Myopie von -9 Dioptrien, im Bereich der Makula bestanden laut Befund myope Dehnungsherde mit atrophischen Arealen und Pigmentverschiebungen; dies passt zum Spektrum der bisher in der Literatur bei betroffenen Patienten beschriebenen retinalen Pathologien, auch wenn eine genauere Phänotypisierung wünschenswert wäre. Die Schwester des Patienten, bei der die gleiche Variante nachgewiesen werden konnte, wies anamnestisch die gleichen Auffälligkeiten auf, ein genauer ophthalmologischer Befund liegt jedoch nicht vor.

Unsere Ergebnisse bestätigen daher die bisherige Studienlage, dass *ADAMTS18* offensichtlich in der Embryonalentwicklung des gesamten Auges eine essentielle Rolle spielt und pathogene Varianten zu vielfältigen, in der Regel kombinierten Anlagestörungen der vorderen und hinteren Augenabschnitte führen können. Dabei können wir sowohl den Phänotyp – mit bilateral „klassischer“ Ausprägung des ARS inklusive extraokulärer Auffälligkeiten, Mikrocornea und Pathologie der Makula

(ob Netzhautdystrophie oder myope degenerative Atrophie kann nicht mit letzter Sicherheit festgestellt werden), jedoch ohne Katarakt, Ectopia lentis oder Telekanthus – als auch die gefundene Variante erstmals beschreiben, was zu einem besseren Verständnis von *ADAMTS18*-assoziierten Augenanlagestörungen beiträgt.

2.3 GCNT2

Das Gen *GCNT2* kodiert für eine Glykosyltransferase und spielt eine Rolle in der Entwicklung der menschlichen Linse und der Aufrechterhaltung ihrer Klarheit; zudem ist es verantwortlich für die Ausbildung der „adult i“ Blutgruppe (164,165).

Biallelische *GCNT2*-Varianten sind eine bekannte Ursache einer autosomal-rezessiven nichtsyndromalen kongenitalen Katarakt (CC) (128,135,165–168).

Bei Patient 4 mit bilateraler CC sowie Mikrozephalie und sprachbetonter Entwicklungsverzögerung konnte die in der Literatur bereits beschriebene (128,135) für die Katarakt ursächliche homozygote Missense-Variante c.1148G>A

(p.Arg383His) identifiziert werden. Ein möglicher Zusammenhang von *GCNT2*-Veränderungen mit Entwicklungsverzögerung und Mikrozephalie wird aufgrund der hohen Expression im fetalen Gehirn ebenfalls diskutiert (169), von den wenigen insgesamt bisher publizierten Fällen im Zusammenhang mit CC wird nur bei einer Patientin eine grenzwertige Mikrozephalie beschrieben, beim ebenfalls betroffenen Bruder jedoch nicht (170). Auch bei Patient 4 weist der ebenfalls betroffene Bruder nur eine Katarakt ohne extraokuläre Auffälligkeiten auf – ein Zusammenhang der Variante mit den mentalen Auffälligkeiten kann daher zwar nicht ausgeschlossen werden, ist aber insgesamt als unwahrscheinlich anzusehen.

Die Variante c.1148G>A (p.Arg383His) wurde bisher jedoch nur in compound-heterozygotem Zustand mit weiteren pathogenen Varianten nachgewiesen, während sie im Rahmen dieser Studie bei Patient 4 erstmals in homozygotem Zustand (bei Konsanguinität der Eltern) festgestellt werden konnte. Dass die Variante auch in homozygotem Zustand ursächlich für eine bilaterale kongenitale Katarakt sein kann, trägt bei insgesamt nur sehr wenigen berichteten *GCNT2*-Varianten im Zusammenhang mit autosomal-rezessiver CC zum weiteren Verständnis der Genotyp-Phänotyp Assoziation bei.

2.4 COL4A1

Das Gen *COL4A1* kodiert für eine Untereinheit von Kollagen Typ IV, das ein essentieller Bestandteil von Basalmembranen des vaskulären Endothels und vieler weiterer Gewebe ist (171). Monoallelische Varianten in *COL4A1* können ein breites Spektrum von Erkrankungen (u.a. zerebrale Mikroangiopathie, Epilepsie, Nierenfehlbildungen, Vorderabschnittsdysgenesien, spontane retinale Blutungen) verursachen, die autosomal-dominant vererbt werden, häufig als Folge intrazerebraler Blutungen entstehen und zu sehr variablen Verläufen von schwerer Entwicklungsverzögerung im Kindesalter bis zu asymptomatischem Verlauf im Erwachsenenalter führen kann, wobei die zugrundeliegenden Pathomechanismen u.a. bei der Ausbildung der okulären Fehlbildungen bis heute nicht eindeutig aufgeklärt sind (15,103,126,172).

Die bei Patientin 30 nachgewiesene pathogene de novo Missense-Variante c.2317G>A (p.Gly773Arg) wurde in der Literatur bereits in mehreren Fällen beschrieben, die verschiedene Phänotypen aufwiesen; alle Patienten waren jedoch neben einer bilateralen kongenitalen Katarakt von weiteren okulären (Mikrophthalmie und persistierende Pupillarmembran/ Pupillenirregularität und kindliches Glaukom) und/ oder typischen *COL4A1*-assoziierten extraokulären Auffälligkeiten (Entwicklungsverzögerung, Mikrozephalie und spastische Hemi- oder Quadriplegie, s.u.) betroffen (125,126).

Demgegenüber war die Erkrankung bei unserer Patientin mit bilateraler kongenitaler Katarakt und Mikrokornea vergleichsweise weniger schwerwiegend ausgeprägt, da insbesondere keine sonst mit dieser Variante assoziierten neurologische Pathologien zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vorlagen.

Unsere Ergebnisse unterstreichen somit die hohe phänotypische Variabilität Zusammenhang mit *COL4A1* und erweitern das phänotypische Spektrum im Zusammenhang mit der Variante c.2317G>A um eine im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Fällen deutlich mildere, primär rein okuläre Krankheitsausprägung mit isolierter bilateraler kongenitaler Katarakt und Mikrokornea.

2.5 PAX6

Der Transkriptionsfaktor *PAX6* spielt eine entscheidende Rollen in der embryonalen Entwicklung des Auges, des zentralen Nervensystems und des Pankreas (127,173). Monoallelische Varianten in *PAX6* sind ursächlich für schwerwiegende panokuläre

Anlagestörungen mit dem klassischen Bild der Aniridie, insbesondere bei Funktionsverlust des Gens (z.B. durch Nonsense- oder Frameshift-Varianten); daneben sind in der Literatur insbesondere für Missense-Varianten auch vielfältige weitere okuläre Anlagestörungen wie MAC, CC und/oder Foveahypoplasie mit hochvariabler Ausprägung beschrieben (127,174). Alle Krankheitsbilder folgen dabei einem autosomal-dominanten Erbgang.

Die bei Patient 33 – mit bilateraler CC und Mikrocornea – gefundene Missense-Variante c.113G>A (p.Arg38Gln) in *PAX6* wurde in der Literatur bereits bei zwei Brüdern mit Nystagmus und CC und bei einem Patienten mit bilateraler CC, ASD und Mikrophthalmie beschrieben (127,128).

Somit ergibt sich im Zusammenhang mit der Variante c.113G>A eine neue phänotypische Assoziation mit sehr milder Krankheitsausprägung – sowohl im Vergleich bezüglich der konkreten Variante als auch sonstiger krankheitsassoziierter *PAX6* Missense-Varianten.

2.6 NHS

Das auf dem X-Chromosom lokalisierten Gen *NHS* spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung von der Linse, Gehirn, Gesichtsschädel und Zähnen, wobei die genaue Funktion des *NHS*-Proteins nicht bekannt ist (175).

Monoallelische *NHS*-Varianten können Ursache des Nance-Horan Syndroms sein, einem X-chromosomalen Krankheitsbild, das in Männern zu stärkeren Ausprägungen führt als in Frauen und durch Augenfehlbildungen mit CC, Mikrocornea und/oder Mikrophthalmie, sowie Gesichtsdysmorphien und Zahnanomalien, verringerte Intelligenz und ggf. weitere Auffälligkeiten charakterisiert ist; auch ein sekundäres Glaukom und Nystagmus werden in einigen Fällen beschrieben (3,175–177). Jedoch gibt es eine große phänotypische Variabilität; während CC ein konsistentes Merkmal ist, das in milden Fällen auch isoliert bestehen kann, können die weiteren okulären und extraokulären Auffälligkeiten in unterschiedlichen Kombinationen vorkommen (3,103,175,178).

Auch hinsichtlich der bei den Patienten 10 und 37 nachgewiesenen ursächlichen hemizygoten Frameshift-Varianten c.320del (p.Gly107Alafs*89) und c.3659dup (p.Asn1220Lysfs*5) sind unterschiedliche phänotypische Ausprägungen auffällig. Während in beiden Fällen eine bilaterale CC und Mikrophthalmie besteht, unterscheiden sich die weiteren klinischen Merkmale (Patient 10: Nystagmus, Patient

37: Glaukom im Erwachsenenalter, Harnleiterenge, Psoriasis, Zahndoppelanlage) deutlich; zudem bestehen in beiden Fällen keine kraniofazialen oder mentalen Auffälligkeiten.

Somit bestätigen die beiden in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Varianten die große Variabilität der klinischen Ausprägung *NHS*-assoziierten Augenfehlbildungen und ergänzen sie um weitere mögliche Genotyp-Phänotyp Korrelationen; insbesondere unterstreichen unsere Ergebnisse, dass auch im männlichen Geschlecht pathogene *NHS*-Varianten ohne dysmorphologische bzw. neurokognitive Auffälligkeiten, sondern mit primär okulärem Phänotyp einhergehen können.

2.7 MAB21L2

Das Gen *MAB21L2* ist in die embryonale Entwicklung von Auge und Skelett involviert, wobei der genaue molekulare Mechanismus bisher nicht bekannt (60,179) ist. Es wird vermutet, dass das Gen regulatorische Funktion im Transkriptionsprozess einnimmt (136,180) und sowohl durch Funktionsgewinn als auch -verlust einen krankheitsverursachenden Effekt auslösen kann (60,131,179,181).

Bi- und monoallelische *MAB21L2*-Varianten wurden in den letzten Jahren als Ursache für Erkrankungen des MAC-Spektrums, sowohl mit als auch ohne extraokuläre Auffälligkeiten (u.a. mentale Retardierung und skelettale Dysplasien (Rhizomelie)) beschrieben, insgesamt ist die Anzahl von betroffenen Patienten und der bekannten ursächlichen Varianten jedoch klein; der Erbgang ist dabei primär autosomal-dominant, wobei auch eine Familie mit autosomal-rezessivem Erbgang beschrieben wurde (11,25,131,136,179,181–183).

In den meisten bekannten Fällen liegen heterozygote Missense-Varianten vor, die häufig – jedoch nicht immer – zu einem schweren okulären Phänotypen mit extraokulären Auffälligkeiten führen; in bisher drei Fällen wurden auch heterozygote LOF-Varianten beschrieben, die in zwei Fällen mit rein okulären Phänotypen (179,183), in einem Fall jedoch auch mit einer Skelettdysplasie (11) einhergingen. Daher kann aufgrund der unterschiedlichen beschriebenen Auswirkungen der wenigen bekannten Varianten bis heute keine eindeutige Genotyp-Phänotyp Korrelation definiert werden (71,181).

Die heterozygote Frameshift-Variante c.58del (p.Cys20Valfs*37) ist in der Literatur und fachspezifischen Datenbanken bisher nicht beschrieben worden und konnte daher im Rahmen der Studie bei den nicht-verwandten Patienten 11 und 15 erstmals

nachgewiesen werden. In beiden Fällen war der Phänotyp sehr ähnlich, mit isoliertem Iris-/Netzhaut-/Aderhautkolobom ohne extraokuläre Auffälligkeiten. Dies bekräftigt, dass monoallelische LOF-Varianten in *MAB21L2* einen relevanten krankheitsverursachenden Mechanismus darstellen und tendenziell zu einer milderen, rein okulären phänotypischen Ausprägung führen.

Die bei Patient 39 mit bilateralem Iris-/Netzhaut-/Aderhaut-/Optikuskolobom und extraokulär lediglich einer verbreiterten Großzehenlücke identifizierte Missense-Variante c.145G>A (p.Glu49Lys) wurde bisher einmalig bei einem Patienten mit sehr ähnlichem Phänotyp (bilaterales Kolobom und nur milde Skelettdysplasie) beschrieben (131), sodass der krankheitsverursachende Effekt sowie die vergleichsweise milde phänotypische Ausprägung durch unsere Ergebnisse bestätigt werden können.

2.8 MFRP

Das Gen *MFRP* kodiert für ein Transmembranprotein, das hauptsächlich im retinalen Pigmentepithel und dem Ziliarkörper exprimiert wird (130).

Biallelische Veränderungen in *MFRP* gehören, wie einleitend bereits ausgeführt, zu den häufigsten bekannten Ursachen für die Krankheitsbilder des autosomal-rezessiven posterioren Mikrophthalmos und Nanophthalmos, die beide seltene Subtypen des MAC-Spektrums darstellen (58,184).

Bei Patient 19 – mit der Diagnose bilaterale Mikrophthalmie, extreme Hyperopie und Glaukom – konnte die heterozygote Missense-Variante c.1534T>G (p.Cys512Gly) erstmalig nachgewiesen werden; zudem trägt der Patient die bisher einmalig in der Literatur einmalig beschriebene (130) heterozygote Nonsense-Variante c.201G>A (p.Trp67*). Aufgrund des spezifischen Phänotyps ist eine Compound-Heterozygotie anzunehmen; Segregationsdaten lagen zwar nicht vor, die Familienanamnese mit ebenfalls betroffener Schwester bei gesunden Eltern unterstützt diese Annahme jedoch.

Der Phänotyp des Patienten, bei dem auch eine flache Vorderkammer beschrieben ist, kann daher nach den klinischen und genetischen Befunden konkreter als Nanophthalmos eingestuft werden.

Bei Patientin 28 und dem gleichermaßen betroffenen Bruder wurden ebenfalls bilaterale Mikrophthalmie, extreme Hyperopie und ein Engwinkelglaukom beschrieben, was nach den klinischen Befunden (vgl. Abb.19) auch als typischer

Nanophthalmos klassifiziert werden kann. Bei beiden konnte die bisher unbekannte homozygote Missense-Variante c.572T>A (p.Ile191Lys) nachgewiesen werden. Diese kann nach den ACMG-Kriterien zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur als Variante unklarer Signifikanz (Klasse 3) klassifiziert werden: Insbesondere kann, unter anderen Kriterien, die Abwesenheit in populationsspezifischen Datenbanken für eine Pathogenität sprechen, andererseits ergibt sich nach bioinformatischen Vorhersagen keine pathogene Wirkung, wobei die Vorhersagen nicht durch funktionelle Studien bestätigt wurden. Jedoch ist in der Zusammenschau von Klinik und Erbgang aufgrund der typischen Genotyp-Phänotyp Korrelation für diese Familie eine wahrscheinliche Pathogenität der Variante anzunehmen. Die beiden neu beschriebenen Varianten erweitern somit das Spektrum (wahrscheinlich) pathogener *MFRP*-Varianten im Zusammenhang mit dem klinischen Bild eines klassischen Nanophthalmos.

2.9 CRYBB1

Das Gen *CRYBB1* gehört zu den Kristallinen, die für Linsenproteine kodieren; Mono- und biallelische Veränderungen in diesen Genen sind in bis zu 50% der Fälle nichtsyndromaler CC beschrieben (90,99,103,105,106).

Die heterozygote Variante c.588_602dup (p.Gln197_Tyr201dup) konnte bei Patientin 14 mit isolierter bilateraler CC und fünf weiteren betroffenen Familienmitgliedern nachgewiesen werden, während sie in den untersuchten nicht-betroffenen Familienmitgliedern abwesend war. Auch hier ist nach den ACMG-Kriterien zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur die Einstufung als VUS (Klasse 3) möglich, jedoch an der Grenze zu einer wahrscheinlich pathogenen Variante (Klasse 4): Die Variante liegt in einer hochkonservierten Domäne des *CRYBB1*-Proteins und die Abwesenheit in populationsspezifischen Datenbanken kann für eine Pathogenität sprechen, jedoch können bioinformatischen Vorhersagen keine Vorhersagen treffen und es liegen keine funktionellen Studien vor.

Daher kann diese Variante ebenfalls in der Zusammenschau von eindeutiger Klinik und Erbgang nach der Familienanalyse für diese Familie klinisch als wahrscheinlich pathogen angesehen werden. Die Variante konnte im Rahmen unserer Studie erstmals beschrieben werden.

2.10 FAT1

Das Gen *FAT1* kodiert für ein atypisches Cadherin, das eine Rolle in verschiedenen embryonalen Entwicklungsprozessen zu spielen scheint (150).

Biallelische Varianten in *FAT1* stehen seit wenigen Jahren zunehmend im Zusammenhang mit autosomal-rezessiven Erkrankungen aus dem MAC-Spektrum. In einer kürzliche publizierte Studie wurde in fünf Familien eine homozygote Frameshift-Variante in *FAT1* im Zusammenhang mit Mikrophthalmie und/oder Kolobomen und zusätzlichen syndromalen Auffälligkeiten beschrieben (148); in einer weiteren Publikation wurde eine Frameshift-Variante (ACMG-Klasse 3, VUS) in *FAT1* in compound-heterozygotem Zustand mit einer Deletion des gesamten Gens und angrenzender Regionen im Zusammenhang mit MAC und ebenfalls extraokulären Auffälligkeiten beschrieben (149). Im Maus- und Zebrafischmodell konnte die Rolle von *FAT1* beim Verschluss der Augenbecherspalte während der Embryonalentwicklung des Auges und somit bei der Entstehung Kolobomen durch LOF-Varianten gezeigt werden, wobei nur homozygote Varianten zu MAC-Phänotypen führten, heterozygote jedoch nicht (148,150).

Die bei Patientin 26 mit bilateralem Iris-/Netzhaut-/Aderhautkolobom nachgewiesene bisher unbekannt heterozygote Missense-Variante c.1025G>C (p.Gly342Ala) kann ebenfalls nur als VUS (Klasse 3) eingestuft werden. Auffällig ist jedoch, dass sie nur einmal in populationsspezifischen Datenbanken beschrieben ist, zudem kommt es nach bioinformatischen Vorhersagen zu einem schädlichen Effekt auf Aminosäuren-Ebene. Insgesamt kann eine Pathogenität der *FAT1*-Variante in diesem Fall zum momentanen Zeitpunkt weder nach den ACMG-Kriterien noch klinisch eindeutig angenommen werden; sie ist jedoch ein weiterer interessanter Kandidat im erst seit kurzem beschriebenen Zusammenhang mit Erkrankungen des MAC-Spektrums.

2.11 POGZ

Das Gen *POGZ* spielt eine Rolle in der neuronalen Embryonalentwicklung (185); dabei können monoallelische Varianten in *POGZ* zum sehr seltenen, kürzlich identifizierten autosomal-dominanten White-Sutton Syndrom führen, das ein Krankheitsbild von u.a. Entwicklungsverzögerung, Intelligenzminderung, Verhaltensauffälligkeiten, Mikrozephalie, Seh- und Hörschwierigkeiten und gastrointestinalen Auffälligkeiten umfasst (143,145); verschiedenartige Varianten wurden dabei mit unterschiedlichen Ausprägungsgraden beschrieben, eine klare

Genotyp-Phänotyp Korrelation kann bisher nicht definiert werden, Missense-Varianten scheinen häufiger zu mildereren Phänotyp-Ausprägungen zu führen (186). Die berichteten Sehschwierigkeiten beinhalten u.a. Ametropien, kortikale Blindheit, Netzhautdystrophien und Strabismus, in einzelnen Fällen werden auch Kolobome (uni- und bilateral) beschrieben (143,144). Insgesamt liegen jedoch nur bei einzelnen Patienten genaue Angaben zu den okulären Auffälligkeiten vor.

Die bei Patient 1 und 5 beschriebenen okulären (bi- bzw. unilaterale Kolobome) und extraokulären Phänotypen (motorische bzw. generelle Entwicklungsverzögerung) passen somit grundsätzlich in das mögliche Spektrum von *POGZ*-assoziierten Veränderungen, wie auch der Zusammenhang zwischen den Missense-Varianten und dem vergleichsweise geringen Ausprägungsgrad.

Die bei Patient 1 nachgewiesene Variante c.3271C>T (p.His1091Tyr) ist dabei bisher in Literatur und fachspezifischen Datenbanken nicht beschrieben, die bei Patient 5 nachgewiesene Variante c.4086A>C (p.Glu1362Asp) wurde einmalig als VUS (Klasse 3) in einem Fall mit isolierter angeborener Zwerchfellhernie beschrieben (145). Beide Varianten sind bioinformatisch auffällig und in populationsspezifischen Datenbanken abwesend (Patient 1) oder nur einmalig vorhanden (Patient 5), jedoch können sie nach den ACMG-Kriterien nur als VUS (Klasse 3) eingestuft werden. Eine Pathogenität kann somit nicht nachweislich angenommen werden, jedoch stellen beide Varianten weitere interessante Kandidaten für eine Krankheitsassoziation dar. Es steht zur Diskussion, ob Patienten mit einem *POGZ*-assoziierten White-Sutton-Syndrom somit ein erhöhtes Risiko für kongenitale Augenfehlbildungen haben.

2.12 COL18A1

Das Gen *COL18A1* gehört zu den Kollagenen und spielt eine wichtige Rolle in der embryonale Augenentwicklung und beim Schluss des Neuralrohrs (146). Biallelische Varianten sind bekannte Ursache des autosomal-rezessiven Knobloch-Syndroms (u.a. Hohe Myopie, Katarakt, Vitreoretinopathie, Makuladegeneration) (146,153,187), jedoch wurde eine monoallelische Variante in einer publizierten Studie als wahrscheinliche Ursache für ein autosomal-dominantes primäres Engwinkelglaukom beschrieben (147).

Bei Patient 12, mit einseitigem frühkindlichem Glaukom, konnte die bisher nicht beschriebene heterozygote Missense-Variante c.2156C>T (p.Thr719Met) identifiziert werden. Die Variante ist in populationsspezifischen Datenbanken selten

beschrieben, jedoch passt der Phänotyp des Patienten insgesamt wenig zu den bisher beschriebenen Erkrankungsbildern, insbesondere da auch kein enger Kammerwinkel besteht. Daher kann die Variante sowohl nach ACMG-Kriterien als auch klinisch nur als VUS (Klasse 3) eingestuft werden, ist jedoch ein möglicher Kandidat für eine Krankheitsassoziation mit einem frühkindlichen Glaukom ohne engen Kammerwinkel.

3 Schlussfolgerungen für die Klinik

3.1 Rolle von NGS bei kongenitalen Augenfehlbildungen

Die Ergebnisse der Studie unterstreichen, dass durch NGS-basierte Diagnostik sehr hohe Aufklärungsraten der molekulargenetischen Ursache bei Patienten mit kongenitalen Augenfehlbildungen erreicht werden können. Dabei konnten in der exombasierten Analyse sowohl im Phänotyp-übergreifenden MGP als auch in der Exomanalyse vergleichbare Aufklärungsraten erreicht werden und beide Diagnostikarten waren der Phänotyp-spezifischen Primärdiagnostik mit Analyse einzelner Gene deutlich überlegen. Diese Ergebnisse stehen allesamt im Einklang mit der überwiegenden Studienlage in der Literatur.

3.2 Phänotyp-übergreifende Genpanels als diagnostischer Standard

Teilweise wird zwar diskutiert, dass eine Analyse von wenigen Genen auf Basis einer konkreten Phänotypisierung bei der Diagnostik von Augenentwicklungsstörungen vorzuziehen ist, da dies mit weniger Kosten und höherer Effizienz verbunden sei (61,153), jedoch sprechen die weit überwiegenden Argumente dafür, dass Phänotyp-übergreifenden MGP bzw. WES in der Routine-Diagnostik gegenüber der Phänotyp-spezifischen Einzelgenanalyse priorisiert werden sollten:

Insbesondere aufgrund der ausgeprägten phänotypischen und genotypischen Heterogenität und Überlappung von Phänotypen ist gerade bei MAC und ASD, aber auch CC die konkrete augenärztliche Diagnosestellung und die Wahl des richtigen Phänotyp-spezifischen Subpanels oft sehr schwer. Alleine das MAC-Spektrum zeigte in der Studienpopulation sehr verschiedene Ausprägungen, auch sind teilweise extrem seltene Gene involviert, wie auch die Ergebnisse dieser Studie zeigen. So wurde in dieser Kohorte keine ursächliche Varianten in den Genen *OTX2* und *SOX2* nachgewiesen, obwohl diese als häufigste Ursachen von Erkrankungen des MAC-Spektrums gelten (21,55,71), während bisher als selten geltende Varianten im Gen

MAB21L2 – das daher auch nicht in der Primärdiagnostik untersucht wurde – mit 3 Fällen die häufigste Ursache darstellten. Die Varianten in *SOX2* und *OTX2* sind oft mit sehr ausgeprägten Phänotypen assoziiert, bei denen auch in der Zeit vor der NGS-Ära bereits eine molekulargenetische Abklärung indiziert wurde. Durch die hohe Heterogenität des MAC-Komplexes und der zunehmenden molekulargenetischen Abklärungsrate bei Patienten mit auch mildereren Phänotypen (insbesondere auch isolierte Kolobome) ist die Häufigkeitsverteilung jedoch möglicherweise in Realität deutlich abweichend.

Auch wurden bei Patienten 10, 27 und 37 in der Primärdiagnostik aufgrund der augenärztlichen Phänotypisierung zunächst die häufigsten MAC-assoziierten Gene untersucht, was zu keinen Ergebnissen führten – in der Nachanalyse mittels Augen-Gesamtpanel konnten alle Fälle jedoch geklärt werden, da die ursächlichen Gene bisher eher mit ASD/PCG oder CC assoziiert waren.

Durch große MGP und WES entfallen sowohl für die indizierenden Fachärzte, als auch die untersuchenden Humangenetiker die Schwierigkeiten bei der Auswahl des richtigen Panels, was sowohl Zeit als auch Kosten sparen kann.

Bei Patienten mit CC konnten in der Primärdiagnostik immerhin die Hälfte der Fälle geklärt werden, 25% jedoch erst im Augen-Gesamtpanel; insgesamt ist die Anzahl mit vier Fällen jedoch nicht als repräsentativ anzusehen. Das Kostenargument ist sicherlich zu beachten, jedoch sinken die Kosten für NGS zunehmend; in diesem Zusammenhang ist in Deutschland seit Januar 2021 die Beschränkung der Diagnostik bzgl. der Größe des Analysepanels durch die gesetzliche Krankenversicherung gefallen.

3.2.1 Vorteile stufenweiser Auswertung auf WES-Basis

Bei der Wahl zwischen MGP und WES als primärem Diagnoseschritt lassen sich für beide Ansätze gute Argumente finden. So kann durch MGP, bei denen nur die im Panel enthaltenen Gene angereichert und sequenziert werden, eine bessere Abdeckung der spezifischen Regionen erreicht werden, insbesondere auch von tief-intronischen Varianten und Dosisveränderungen (153,187). Demgegenüber gibt es bei WES aufgrund der hohen Datenmenge Fälle, in denen pathogene Varianten nicht abgedeckt oder aufgrund bioinformatischer Algorithmen herausgefiltert und nicht

erfasst werden können (117,154). Zudem sind MGP weniger kosten- und zeitintensiv als WES (4).

Vorteile des WES sind hingegen die Möglichkeit, neue kausale Varianten in erst aktuell beschriebenen Genen und Kandidatengenen identifizieren zu können. MGP bilden immer nur den Wissenstand zum Zeitpunkt des Designs des Panels dar, so dass ggf. neu identifizierte Ursachen für den jeweiligen Phänotyp nicht mit erfasst werden – wie bei der hier beschriebenen *ADAMTS18*-Variante – während diese Gene bei WES naturgemäß (fast) immer bereits enthalten sind (153).

Bei den Patienten dieser Studienkohorte wurde primär WES durchgeführt, jedoch zunächst stufenweise (virtuell) einzelne Phänotyp-spezifische Gene, dann das Multigen-Augenpanel und erst dann die gesamten Exomdaten ausgewertet. Dies stellt einen in der Praxis sehr praktikablen Kompromiss dar, der die meisten Vorteile der einzelnen diagnostischen Ansätze verbindet, wie auch andere Autoren feststellen (2,152). So können bei den Patienten im ersten Schritt die erhobenen Sequenzdaten zunächst auf Varianten gefiltert werden, die in einem Multigen-Augenpanel abgedeckt sind, wodurch zunächst eine genauere Phänotyp-basierte Auswertung der für Augenanlagestörungen relevantesten krankheitsursächlichen Gene und Varianten möglich ist. Dies hat eine deutliche Effizienzsteigerung und somit auch Zeit- und Kostenvorteile gegenüber einer primären Exomanalyse zur Folge. Zudem können Nachauswertungen – beispielsweise bei neuen Erkenntnissen in Befund/ Diagnose oder nach Hinzufügen neuer Kandidatengenen – in gewissen Zeiträumen auf Basis der bereits vorliegenden Sequenzdaten durchgeführt werden, indem das Augen-Gesamtpanel entsprechend virtuell erweitert wird, ohne dass hierfür zwingend eine erneute Genanreicherung und Sequenzierung mit aktualisierten Sequenzierkits erfolgen muss.

Ein Nachteil dieses stufenweisen Vorgehens auf WES-Basis ist, dass theoretisch aufgrund schlechterer Abdeckung (sog. coverage) der Zielregionen und bioinformatischer Limitationen pathogene Varianten verpasst werden können, während bei MGP mit panelspezifischer Genanreicherung besonderes Augenmerk auf genspezifische Besonderheiten wie beispielsweise tief-intronische Bereiche oder Pseudogenregionen gelegt werden kann (117,188). Jedoch scheint dies in der Praxis nur Einzelfälle zu betreffen; zudem entwickeln sich Genanreicherungs- und

Sequenziertechniken sowie die bioinformatische Auswertung stetig weiter, sodass diese Einschränkungen zunehmend geringer werden (2).

Insbesondere, da eine große Anzahl von Augenentwicklungsstörungen weiterhin nicht ursächlich geklärt werden kann und laufend neue pathogene Mechanismen und Kandidatengene identifiziert werden, ist der Ansatz einer stufenweisen Analyse auf WES-Basis sehr sinnvoll, da somit auf Basis der sequenzierten Daten ggf. eine Nachanalyse erfolgen kann, wodurch mit wenig zusätzlichem Aufwand in einigen Fällen eine genetische Ursache im Verlauf nachgewiesen werden kann. Da sich jedoch auch die Sequenziertechniken stetig verbessern, ist je nach Zeitpunkt auch eine erneute Sequenzierung nach aktuellem Stand der Technik in die differentialdiagnostischen Überlegungen miteinzubeziehen.

Da mit keinem diagnostischen Ansatz immer alle ursächlichen Varianten nachgewiesen werden können, ist in einzelnen Fällen an die Anwendung weiterer genetischer Untersuchungsmethoden mit Fokus auf Phänotyp-spezifische Gene zu denken; beispielsweise ergab sich bei Patienten 22 und 23 in der Sequenzanalyse aufgrund der klassischen Phänotyp-Genotyp Korrelation Hinweise auf pathogene Deletionen in *FOXC1* und *PITX2*, die sich in einer zusätzlichen MLPA bestätigten. Auch neuere Techniken zum Nachweis von Strukturvarianten (z.B. Genomsequenzierung, optische Genomkartierung (189)) sollten bei spezifischen Phänotypen in der ergänzenden Diagnostik zum Einsatz kommen, wenn in der Exomanalyse keine Ursache identifiziert werden kann.

3.2.2 Schwierigkeiten der NGS-Diagnostik

Vor allem bei seltenen Syndromen mit nur wenigen publizierten Fällen wird zum Teil wenig Fokus auf konkrete Augenbefunde gelegt. Als Beispiel werden beim oben diskutierten White-Sutton Syndrom oder auch beim KBG-Syndrom statt konkreter Augenbefunde wie Kolobome oder spezifische Hornhautpathologien oft nur generelle Sehbeeinträchtigung beschrieben (engl. visual impairment oder decreased visual acuity). Dadurch wird die HPO-Verknüpfung der Syndrome mit spezifischen Augen-Phänotypen erschwert, sodass diese Fälle bei HPO-basierter Auswertung gegebenenfalls unentdeckt bleiben können. Eine detaillierte augenärztliche phänotypische Beschreibung und humangenetische Auswertung der Befunde sind daher für die molekulargenetische Diagnosefindung und Literaturbeschreibung der Phänotypen essentiell – dies gilt selbstverständlich grundsätzlich in allen Fällen,

auch bei Anwendung von MGP/ WES, da der genaue Phänotyp für die Eingrenzung der in Betracht kommenden Gene und die Bestätigung der genetischen Ergebnisse von hoher Wichtigkeit ist, gerade bei Neubeschreibung von Genotyp-Phänotyp- bzw. Krankheitsassoziationen.

In dieser Studie konnten bei insgesamt 17 Fällen auch in der Exomanalyse weder eine ursächliche noch eine verdächtige Variante (VUS) gefunden werden. Dies kann dadurch bedingt sein, dass nicht-genetische Ursachen für die Fehlbildung verantwortlich sind; beispielsweise kommen dabei intrauterine Infektionen mit dem Rubella-, CMV- oder Herpes Simplex-Virus in Betracht, gerade bei unilateralem Phänotyp (104,190,191).

Auch können pathogene Varianten in nicht-kodierenden Abschnitten des Genoms liegen, sodass sie in der Exomanreicherung nicht erfasst werden. Auch sind gegebenenfalls Assoziationen von krankheitsrelevanten Genen mit der Augenentwicklung bisher nicht bekannt, sodass erst weitere funktionelle Studien abgewartet werden müssen (2,103).

3.3 Bedeutung interdisziplinärer Diagnosestellung und Zusammenarbeit

Beim überwiegenden Teil der von kongenitalen Augenerkrankungen betroffenen Patienten erfolgt die Diagnosestellung primär durch den Augenarzt, in einzelnen Fällen beispielsweise auch durch den Kinderarzt. Aufgrund der extrem unterschiedlichen Ausprägungen der kongenitalen Augenerkrankungen und schlechter Kooperation durch das meist sehr junge Alter der Patienten bei der Erstuntersuchung ist die genaue Diagnosestellung jedoch klinisch oft sehr schwierig, aufwändig oder nicht möglich.

Daher sollte bei jedem betroffenen Fall oder Verdachtsfall die Einleitung einer genetischen Abklärung zur absoluten Routine-Diagnostik gehören, da nur hierdurch bei einem auffälligen Befund die genaue Diagnose bestätigt oder oft erst gestellt werden kann. Kosten- und Praktikabilitätserwägungen können in der Vergangenheit möglicherweise in bestimmten Fällen zum Verzicht auf eine genetische Abklärung geführt haben, jedoch sind diese Gründe zum heutigen Zeitpunkt nicht mehr sinnvoll zu rechtfertigen – die genetische Diagnostik ist schnell und einfach durchführbar, die Kosten für NGS-Diagnostik haben in den vergangenen Jahren zunehmend abgenommen und werden von den Versicherungsträgern in Deutschland

grundsätzlich übernommen. Die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Augenheilkunde (phänotypische Charakterisierung/Verdachtsdiagnose und Therapie) und Humangenetik (Diagnosesicherung und genetische Beratung) ist bei der Betreuung der betroffenen Patienten somit essentiell.

3.4 Relevanz der genetischen Diagnosestellung

Aus der genauen genetischen Diagnosestellung ergeben sich bei Patienten mit kongenitalen Augenfehlbildungen erhebliche Konsequenzen bezüglich (Visus-)Prognose und Therapie, Risiko für Komorbiditäten und entsprechende medizinische Versorgung sowie Lebens- und Familienplanung der Betroffenen und Ihrer Angehörigen. Auch sind die Entwicklung und Anwendung neuer (gen-)therapeutischer Ansätze für kongenitale Augenfehlbildungen ohne Abklärung der genauen genetischen Ursache nicht möglich. Nicht zuletzt ist auch das menschliche Kausalitätsbedürfnis ein wichtiger, nicht zu unterschätzender Faktor. Viele der Studienpatienten waren auch im Alter noch sehr erleichtert, „endlich“ eine Erklärung für die Veränderungen zu haben, die sie teilweise ein Leben lang beeinträchtigt haben – selbst wenn sich für Therapie, Komorbiditäten und Familienplanung keine relevanten Konsequenzen mehr ergeben haben.

So ergab die genetische Diagnostik bei mehreren Patienten mit diagnostizierter kongenitaler Katarakt bei ähnlichem Phänotyp ursächliche Varianten in verschiedenen Genen:

Dabei können Veränderungen in *COL4A1* wie bei Patient 30 zu schwerwiegenden Erkrankungen führen (vgl. Kap. E 2.4), was auch Konsequenzen für die weitere Betreuung nach sich zieht: Da sich beispielsweise mögliche intrazerebrale Blutungen auch erst im Verlauf manifestieren und ggf. auch verhindern oder frühzeitig erkennen lassen (15), ist eine frühe Diagnosestellung auch prognostisch für die Patienten hoch relevant; betroffene Patienten sollten gerinnungshemmende Medikamente und bestimmte Sportarten möglichst vermeiden (171).

Hingegen können Veränderungen in *PAX6* wie bei Patient 33 mit einer Foveahypoplasie einhergehen (127). Prognose, Therapie, (interdisziplinäre) medizinische Betreuung und Konsequenzen für die Familienplanung unterscheiden sich in diesen Fällen selbstverständlich grundlegend von Fällen mit isolierter

kongenitaler Katarakt, wie z.B. bei Patientin 14 mit wahrscheinlich ursächlicher *CRYBB1*-Variante.

Die Gene *BCOR* und *NHS* liegen auf dem X-Chromosom, daher folgen die assoziierten Erkrankungen einem X-chromosomalem Erbgang und stehen im Zusammenhang mit CC und zusätzlichen syndromalen Auffälligkeiten (OFCD-Syndrom bzw. Nance-Horan Syndrom, vgl. Kap E 2.6); zudem sind Frameshift-Varianten in *BCOR* für männliche Nachkommen letal (129,137,176). Hierdurch ergeben sich für die betroffenen Patienten 9, 10 und 37 durch die jeweilige genetische Ursache spezifische und wichtige Konsequenzen bezüglich Komorbiditäten und Wiederholungsrisiko bzw. Familienplanung.

Im Rahmen der ASD unterscheiden sich Visus und visuelle Prognose bei Patient 20 mit *ADAMTS18*-Variante insbesondere aufgrund der Netzhautpathologie deutlich gegenüber den Patienten mit Veränderungen in *PITX2* oder *FOXC1*.

In mehreren Fällen, die von Iris-Kolobomen betroffen waren, wurde bei augenärztlichen Untersuchungen sowohl die Diagnose Kolobom als auch (partielle) Aniridie gestellt. Für beide Krankheitsbilder unterscheiden sich visuelle Prognose und Behandlungsstrategie sowie mögliche Komorbiditäten und ggf. auch Konsequenzen für die Familienplanung grundlegend – insbesondere ist hier das WAGR-Syndrom bei Aniridie zu nennen, bei dem neben dem *PAX6*-Gen auch das benachbarte *WT1*-Gen deletiert ist, was zu einem erhöhten Risiko für Wilmstumoren führt (174), sodass in diesen Fällen eine spezifische Nierenvorsorge indiziert ist. Wie bereits erwähnt, gibt es zudem potentielle Therapieansätze Aniridie bei *PAX6* Nonsense-Varianten, wofür zwingend die Kenntnis der genauen molekularen Ursache notwendig ist (192). Die Patienten 19 und 28 wurden bisher unter der Diagnose Mikrophthalmie geführt, die infolge der genetischen Testung auf die Diagnose Nanophthalmos konkretisiert werden konnte. Dabei besteht ein deutlich erhöhtes Glaukomrisiko (58,63) – das sich in beiden Fällen auch manifestiert hat. Zudem wurde im Falle einer operativen Intervention (insbesondere Katarakt-Operation) bei Nanophthalmos-Augen ein erhöhtes Risiko für uveale Effusionen festgestellt, welches möglicherweise durch eine Sklerotomie relevant gesenkt werden kann (193). Die Aufklärung der genetischen Ursache und dadurch bedingte Revision der initialen Diagnose ist somit in diesen Fällen von entscheidender therapeutischer und prognostischer Bedeutung und hätte möglicherweise zu einer optimierten Behandlung führen können.

4 Limitationen der Studie

Ein großer Teil der dargestellten klinischen Informationen, insbesondere die augenärztlichen und sonstigen Diagnosen, wurde nicht selbst erhoben, sondern beruht auf den Befunden von zuweisenden Ärzten. So lagen beispielsweise Alter bei Erstmanifestation, Familienanamnese und Komorbiditäten nicht oder nur teilweise vor. Auch konnte in vielen Fällen, insbesondere bei VUS, keine Segregationsanalyse durchgeführt werden. Einzelne augenärztliche Befunde waren, wie schon dargestellt, widersprüchlich bezüglich der genauen Phänotypisierung (z.B. Unterscheidung Iris-Kolobom/ Aniridie, Mikrophthalmie/ Nanophthalmos). Hierdurch ist es möglich, dass die dargestellten Ergebnisse nicht vollständig die tatsächlichen Befunde widerspiegeln. Dies sollte insbesondere bei Betrachtung der Aufklärungsraten der einzelnen Subpanels beachtet werden. Im Gegenzug unterstreicht diese Einschränkung jedoch auch das Argument, dass die zusätzliche genetische Diagnostik von entscheidender Bedeutung für die Diagnosefindung ist und Phänotyp-übergreifende Panels aufgrund oft nur ungenauer Möglichkeit der rein klinischen Zuordnung von Vorteil sind.

Insgesamt können durch die große Zahl von untersuchten Patienten und von aufgeklärten Fällen zweifellos sehr gute Aussagen zur Häufigkeit und Ausprägung von ursächlichen Varianten und zur Sinnhaftigkeit der Diagnostikstrategie für die Klinik getroffen werden.

Eine weitere Limitation besteht in der schnellen Weiterentwicklung der genetischen Diagnostik und Methodik, sodass bei den untersuchten Patienten unter anderem verschiedene Analysesoftware zum Einsatz kam. Auch besteht die Möglichkeit, dass bei Patienten, bei denen die Sequenzierung bereits einige Jahren zurückliegt, möglicherweise ursächliche Gene bzw. Varianten noch nicht in den Exom-Sequenzierkits abgedeckt waren und sich bei erneuter Sequenzierung ein positiver Befund ergeben könnte. Dies trifft naturgemäß jedoch auf alle (klinischen und wissenschaftlichen) genetischen Untersuchungen zu und kann als Argument dafür gesehen werden, dass die hier festgestellte Aufklärungsrate ein Minimum darstellt und potentiell sogar noch als höher anzusehen ist und dass es sinnvoll ist, mit zeitlichem Abstand bei Patienten mit negativem Ergebnis eine erneute genetische Testung durchzuführen.

5 Fazit

Die Studie zeigt, dass eine Exom-basierte NGS-Analyse eine sehr effektive Methode für die Diagnostik von kongenitalen Augenfehlbildungen ist. Insgesamt konnten von 40 Patienten in 17 Fällen (42,5%) ursächliche Varianten (ACMG-Klasse 4 und 5), in 6 weiteren Fällen (15%) verdächtige Varianten in krankheitsrelevanten Genen (ACMG-Klasse 3) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bestätigen die hohe genotypische und phänotypische Heterogenität von angeborenen Augenfehlbildungen und zeigen, dass ein Phänotyp-übergreifendes Multigen-Augenpanel bzw. die Exomanalyse gegenüber Phänotyp-spezifischen kleineren Genpanels in diesem Patientenkollektiv zu deutlich höheren Aufklärungsraten führt und sich daher für die klinische Routinediagnostik die bevorzugte Anwendung dieser Untersuchungsmethoden empfiehlt – dabei ist insbesondere ein kombinierter Ansatz mit primärer Auswertung eines Multigen-Augenpanels auf WES-Basis sinnvoll.

Die genaue genetische Diagnosestellung ist für Prognose, Therapie, Risiko für Komorbiditäten und Lebens- und Familienplanung der Betroffenen von entscheidender Bedeutung. Daher sollte eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Augenheilkunde und Humangenetik stattfinden und die genetische Ursachenklärung bei Verdacht auf eine kongenitale Augenfehlbildung immer eingeleitet werden.

Insgesamt 8 (wahrscheinlich) pathogene Varianten in 6 Genen (*CYP1B1*, *ADAMTS18*, *MAB21L2*, *NHS*, *MFRP*, *CRYBB1*) konnten erstmal nachgewiesen werden. Zudem konnten mögliche seltene Phänotyp-Genotyp Assoziationen und Kandidatengene (*FAT1*, *POGZ*) identifiziert und beschrieben werden. Durch den Nachweis der beschriebenen Varianten und Assoziationen in weiteren Patientenkollektiven und durch funktionelle Studien können die hier gefundenen Ergebnisse gegebenenfalls bestätigt und erweitert werden.

Die Studie trägt somit zum weiteren Verständnis der molekulargenetischen Zusammenhänge bei kongenitalen Augenfehlbildungen bei und ermöglicht darauf basierend eine Optimierung der klinischen Diagnostik und zeigt neue Ansatzpunkte für weitere Erforschung. Die rapide Weiterentwicklung der genetischen Diagnostikmethoden, insbesondere die Genomsequenzierung, lässt zukünftig auf noch umfangreichere und detailliertere Ursachenklärung humangenetische Analyseverfahren hoffen.

Literaturverzeichnis

1. Hu Z, Yu C, Li J, Wang Y, Liu D, Xiang X, et al. A Novel Locus for Congenital Simple Microphthalmia Family Mapping to 17p12-q12. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(6):3425–9.
2. Haer-Wigman L, van Zelst-Stams WA, Pfundt R, van den Born LI, Klaver CC, Verheij JB, et al. Diagnostic exome sequencing in 266 Dutch patients with visual impairment. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(5):591–9.
3. Sun W, Xiao X, Li S, Guo X, Zhang Q. Exome Sequencing of 18 Chinese Families with Congenital Cataracts: A New Sight of the NHS Gene. *PLoS ONE.* 2014;9(6):e100455.
4. Wang P, Li S, Sun W, Xiao X, Jia X, Liu M, et al. An Ophthalmic Targeted Exome Sequencing Panel as a Powerful Tool to Identify Causative Mutations in Patients Suspected of Hereditary Eye Diseases. *Transl Vis Sci Technol.* 2019;8(2):21.
5. Morrison D. National study of microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) in Scotland: investigation of genetic aetiology. *J Med Genet.* 2002;39(1):16–22.
6. Rahi JS, Dezateux C, British Congenital Cataract Interest Group. Measuring and interpreting the incidence of congenital ocular anomalies: lessons from a national study of congenital cataract in the UK. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(7):1444–8.
7. Messina-Baas O, Cuevas-Covarrubias SA. Inherited Congenital Cataract: A Guide to Suspect the Genetic Etiology in the Cataract Genesis. *Mol Syndromol.* 2017;8(2):58–78.
8. Chassaing N, Causse A, Vigouroux A, Delahaye A, Alessandri JL, Boespflug-Tanguy O, et al. Molecular findings and clinical data in a cohort of 150 patients with anophthalmia/microphthalmia. *Clin Genet.* 2014;86(4):326–34.
9. Gillespie RL, O’Sullivan J, Ashworth J, Bhaskar S, Williams S, Biswas S, et al. Personalized Diagnosis and Management of Congenital Cataract by Next-Generation Sequencing. *Ophthalmology.* 2014;121(11):2124-2137.e2.
10. Ma AS, Grigg JR, Ho G, Prokudin I, Farnsworth E, Holman K, et al. Sporadic and Familial Congenital Cataracts: Mutational Spectrum and New Diagnoses Using Next-Generation Sequencing. *Hum Mutat.* 2016;37(4):371–84.
11. Jackson D, Malka S, Harding P, Palma J, Dunbar H, Moosajee M. Molecular diagnostic challenges for non-retinal developmental eye disorders in the United Kingdom. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2020;184(3):578–89.
12. Vidya NG, Rajkumar S, Vasavada AR. Genetic investigation of ocular developmental genes in 52 patients with anophthalmia/microphthalmia. *Ophthalmic Genet.* 2018;39(3):344–52.
13. Wiggs JL, Pierce EA. Genetic Testing for Inherited Eye Disease: Who Benefits? *JAMA Ophthalmol.* 2013;131(10):1265–6.
14. Müllner-Eidenböck A, Moser E, Klebermass N, Amon M, Walter MC, Lochmüller H, et al. Ocular features of the congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Ophthalmology.* 2004;111(7):1415–23.
15. Magnin E, Ayrignac X, Berger E, Mine M, Tournier-Lasserre E, Labauge P. Late

Diagnosis of COL4A1 Mutation and Problematic Vascular Risk Factor Management. *Eur Neurol.* 2014;72(3–4):150–2.

16. Richardson R, Sowden J, Gerth-Kahlert C, Moore AT, Moosajee M. Clinical utility gene card for: Non-Syndromic Microphthalmia Including Next-Generation Sequencing-Based Approaches. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(4):512–512.
17. Gregory-Evans CY, Wang X, Wasan KM, Zhao J, Metcalfe AL, Gregory-Evans K. Postnatal manipulation of Pax6 dosage reverses congenital tissue malformation defects. *J Clin Invest.* 2014;124(1):111–6.
18. Méjécasse C, Malka S, Guan Z, Slater A, Arno G, Moosajee M. Practical guide to genetic screening for inherited eye diseases. *Ther Adv Ophthalmol.* 2020;12:2515841420954592.
19. Deng H, Yuan L. Molecular genetics of congenital nuclear cataract. *Eur J Med Genet.* 2014;57(2–3):113–22.
20. Prokudin I, Simons C, Grigg JR, Storen R, Kumar V, Phua ZY, et al. Exome sequencing in developmental eye disease leads to identification of causal variants in GJA8, CRYGC, PAX6 and CYP1B1. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(7):907–15.
21. Williamson KA, FitzPatrick DR. The genetic architecture of microphthalmia, anophthalmia and coloboma. *Eur J Med Genet.* 2014;57(8):369–80.
22. Lopez Jimenez N, Flannick J, Yahyavi M, Li J, Bardakjian T, Tonkin L, et al. Targeted „Next-Generation“ sequencing in anophthalmia and microphthalmia patients confirms SOX2, OTX2 and FOXE3 mutations. *BMC Med Genet.* 2011;12:172.
23. Patel A, Hayward JD, Tailor V, Nyanhete R, Ahlfors H, Gabriel C, et al. The Oculome Panel Test: Next-Generation Sequencing to Diagnose a Diverse Range of Genetic Developmental Eye Disorders. *Ophthalmology.* 2019;126(6):888–907.
24. Abicht A, Neuhaus T, Mehnert L, Rost I, Reis A, Zweier C, et al. Diagnostik seltener Erkrankungen mit „next generation sequencing“ – angekommen oder abgewehrt? *Med Genet.* 2019;31(3):335–43.
25. Harding P, Gore S, Malka S, Rajkumar J, Oluonye N, Moosajee M. Real-world clinical and molecular management of 50 prospective patients with microphthalmia, anophthalmia and/or ocular coloboma. *Br J Ophthalmol.* 2022;bjo-2022-321991.
26. Singh M, Tyagi SC. Genes and genetics in eye diseases: a genomic medicine approach for investigating hereditary and inflammatory ocular disorders. *Int J Ophthalmol.* 2018;11(1):117–34.
27. Williams AL, Bohnsack BL. The Ocular Neural Crest: Specification, Migration, and Then What? *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:595896.
28. Casey MA, Lusk S, Kwan KM. Build me up optic cup: Intrinsic and extrinsic mechanisms of vertebrate eye morphogenesis. *Dev Biol.* 2021;476:128–36.
29. Tamm ER, Ohlmann A. Entwicklung des menschlichen Auges. *Ophthalmologe.* 2012;109(9):911–28.
30. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, et al. *Duale Reihe Anatomie.* 1. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017
31. Traboulsi, EI. *Genetic Diseases of the Eye.* 2. Auflage. New York: Oxford Monographs on Medical Genetics; 2012.

32. Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M, Helms JA. Cranial neural crest cells on the move: Their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet A*. 2011;155(2):270–9.
33. O’Rahilly R, Müller F. The development of the neural crest in the human. *J Anat*. 2007;211(3):335–51.
34. Paulsen F, Waschke J. Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen. Kopf, Hals und Neuroanatomie. 23. Auflage. München: Elsevier; 2010.
35. Kanakubo S, Nomura T, Yamamura K, Miyazaki J, Tamai M, Osumi N. Abnormal migration and distribution of neural crest cells in Pax6 heterozygous mutant eye, a model for human eye diseases. *Genes Cells*. 2006;11(8):919–33.
36. Williams AL, Bohnsack BL. Neural crest derivatives in ocular development: Discerning the eye of the storm. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2015;105(2):87–95.
37. Davis-Silberman N, Ashery-Padan R. Iris development in vertebrates; genetic and molecular considerations. *Brain Res*. 2008;1192:17–28.
38. Cvekl A, Tamm ER. Anterior eye development and ocular mesenchyme. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2004;26(4):374–86.
39. Tamm ER. Entwicklung des Kammerwinkels und kongenitales Glaukom *Ophthalmologie*. 2011;108(7):610-617.
40. Patel A, Sowden JC. Genes and pathways in optic fissure closure. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;91:55–65.
41. Graw J. Eye development. *Curr Top Dev Biol*. 2010;90:343-386
42. Quinn PMJ, Wijnholds J. Retinogenesis of the Human Fetal Retina: An Apical Polarity Perspective. *Genes (Basel)*. 2019;10(12):987.
43. Hendrickson AE, Yuodelis C. The morphological development of the human fovea. *Ophthalmology*. 1984;91(6):603–12.
44. Sellheyer K. Development of the choroid and related structures. *Eye Lond Engl*. 1990;4 (Pt 2):255–61.
45. Bohnsack BL, Gallina D, Thompson H, Kasprick D, Lucarelli MJ, Dootz G, et al. Development of extraocular muscles require early signals from periocular neural crest and the developing eye. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(8):1030–41.
46. Kish PE, Bohnsack BL, Gallina D, Kasprick DS, Kahana A. The eye as an organizer of craniofacial development. *Genesis*. 2011;49(4):222–30.
47. LaMantia AS. Why Does the Face Predict the Brain? Neural Crest Induction, Craniofacial Morphogenesis, and Neural Circuit Development. *Front Physiol*. 2020;11:610970
48. Adameyko I, Fried K. The Nervous System Orchestrates and Integrates Craniofacial Development: A Review. *Front Physiol*. 2016;7:49
49. Du H, Taylor HS. The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(1):a023002.

50. Benetti N, Gouil Q, Tapia del Fierro A, Beck T, Breslin K, Keniry A, et al. Maternal SMCHD1 regulates Hox gene expression and patterning in the mouse embryo. *Nat Commun.* 2022;13(1):4295.
51. Shaham O, Menuchin Y, Farhy C, Ashery-Padan R. Pax6: a multi-level regulator of ocular development. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31(5):351–76.
52. He B, Ni ZL, Kong SB, Lu JH, Wang HB. Homeobox genes for embryo implantation: From mouse to human. *Animal Model Exp Med.* 2018;1(1):14-22.
53. Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, Barsacchi G, Harris WA. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Dev Camb Engl.* 2003;130(21):5155–67.
54. Harding P, Moosajee M. The Molecular Basis of Human Anophthalmia and Microphthalmia. *J Dev Biol.* 2019;7(3):16
55. Verma AS, FitzPatrick DR. Anophthalmia and microphthalmia. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2(1):47.
56. Yang N, Zhao LL, Liu J, Ma LL, Zhao JS. Nanophthalmos: An Update on the Biological Parameters and Fundus Abnormalities. *J Ophthalmol.* 2021;2021:8853811.
57. Lingam G, Sen AC, Lingam V, Bhende M, Padhi TR, Xinyi S. Ocular coloboma- a comprehensive review for the clinician. *Eye (Lond).* 2021;35(8):2086–109.
58. Siggs OM, Awadalla MS, Souzeau E, Staffieri SE, Kearns LS, Laurie K, et al. The genetic and clinical landscape of nanophthalmos and posterior microphthalmos in an Australian cohort. *Clin Genet.* 2020;97(5):764–9.
59. Auffarth GU, Naujokaitis T, Hammer M. Die Kataraktchirurgie und das kleine Auge: Relativer anteriorer Mikrophthalmus, hohe Hyperopie und Nanophthalmus. *Ophthalmologe.* 2022;119(1):89–93.
60. Plaisancié J, Ceroni F, Holt R, Zazo Seco C, Calvas P, Chassaing N, et al. Genetics of anophthalmia and microphthalmia. Part 1: Non-syndromic anophthalmia/microphthalmia. *Hum Genet.* 2019;138(8–9):799–830.
61. Käsmann-Kellner B, Moslemani K, Seitz B. Klinik und Genetik von Augenentwicklungsstörungen: MAC-Spektrum und Vorderabschnittsdysgenesien. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2019;236(03):269–85.
62. Almoallem B, Arno G, De Zaeytijd J, Verdin H, Balikova I, Casteels I, et al. The majority of autosomal recessive nanophthalmos and posterior microphthalmia can be attributed to biallelic sequence and structural variants in MFRP and PRSS56. *Sci Rep.* 2020;10(1):1289.
63. Carricondo PC, Andrade T, Prasov L, Ayres BM, Moroi SE. Nanophthalmos: A Review of the Clinical Spectrum and Genetics. *J Ophthalmol.* 2018;2018:2735465.
64. Nakamura KM, Diehl NN, Mohny BG. Incidence, Ocular Findings and Systemic Associations of Ocular Coloboma: A Population-Based Study. *Arch Ophthalmol.* 2011;129(1):69–74.
65. Schneider A, Bardakjian T, Reis LM, Tyler RC, Semina EV. Novel SOX2 mutations and genotype–phenotype correlation in anophthalmia and microphthalmia. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(12):2706–15.

66. Yoon KH, Fox SC, Dicipulo R, Lehmann OJ, Waskiewicz AJ. Ocular coloboma: Genetic variants reveal a dynamic model of eye development. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2020;184(3):590-610
67. Slavotinek AM, Chao R, Vacik T, Yahyavi M, Abouzeid H, Bardakjian T, et al. VAX1 mutation associated with microphthalmia, corpus callosum agenesis, and orofacial clefting: The first description of a VAX1 phenotype in humans. *Hum Mutat.* 2012;33(2):364–8.
68. Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, et al. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(3):514–8.
69. Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A, Zechi-Ceide RM. Holoprosencephaly spectrum, ano/microphthalmia, and first branchial arch defects: evidence for a new disorder. *Clin Dysmorphol.* 2008;17(1):41–6.
70. Islam F, Htun S, Lai L, Krall M, Poranki M, Martin P, et al. Exome sequencing in patients with microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) from a consanguineous population. *Clin Genet.* 2020;98(5):499–506.
71. Slavotinek A. Genetics of anophthalmia and microphthalmia. Part 2: Syndromes associated with anophthalmia–microphthalmia. *Hum Genet.* 2019;138(8):831–46.
72. ALSomiry AS, Gregory-Evans CY, Gregory-Evans K. An update on the genetics of ocular coloboma. *Hum Genet.* 2019;138(8–9):865–80.
73. Lewis CJ, Hedberg-Buenz A, DeLuca AP, Stone EM, Alward WLM, Fingert JH. Primary congenital and developmental glaucomas. *Hum Mol Genet.* 2017;26(R1):R28–36.
74. Gould DB, John SWM. Anterior segment dysgenesis and the developmental glaucomas are complex traits. *Hum Mol Genet.* 2002;11(10):1185–93.
75. Tanwar M, Dada T, Dada R. Axenfeld-Rieger Syndrome Associated with Congenital Glaucoma and Cytochrome P4501B1 Gene Mutations. *Case Rep Med.* 2010;2010:e212656.
76. Nischal KK. Genetics of Congenital Corneal Opacification-Impact on Diagnosis and Treatment. *Cornea.* 2015;34 Suppl 10:S24-34.
77. Zhang Y, Chen X, Wang L, Sun X, Chen Y. Heterogeneity of Axenfeld-Rieger Syndrome: Molecular and Clinical Findings in Chinese Patients. *Front Genet.* 2021;12:732170.
78. Pang J, Le L, Zhou Y, Tu R, Hou Q, Tsuchiya D, et al. NOTCH Signaling Controls Ciliary Body Morphogenesis and Secretion by Directly Regulating Nectin Protein Expression. *Cell Rep.* 2021;34(2):108603.
79. Siggs OM, Souzeau E, Taranath DA, Dubowsky A, Chappell A, Zhou T, et al. Biallelic CPAMD8 Variants Are a Frequent Cause of Childhood and Juvenile Open-Angle Glaucoma. *Ophthalmology.* 2020;127(6):758–66.
80. Seifi M, Walter MA. Axenfeld-Rieger syndrome. *Clin Genet.* 2018;93(6):1123–30.
81. Reis LM, Semina EV. Genetics of anterior segment dysgenesis disorders. *Curr Opin Ophthalmol.* 2011;22(5):314–24.

82. Reichl S, Böhringer D, Richter O, Lagrèze W, Reinhard T. Langzeitprognose der Peters-Anomalie. *Ophthalmologe*. 2018;115(4):309–13.
83. Ma A, Yousoof S, Grigg JR, Flaherty M, Minoche AE, Cowley MJ, et al. Revealing hidden genetic diagnoses in the ocular anterior segment disorders. *Genet Med*. 2020;22(10):1623–32.
84. Salik I, Gupta A, Tara A, Zaidman G, Barst S. Peters anomaly: A 5-year experience. *Pediatr Anesth*. 2020;30(5):577–83.
85. Protas ME, Weh E, Footz T, Kasberger J, Baraban SC, Levin AV, et al. Mutations of conserved non-coding elements of PITX2 in patients with ocular dysgenesis and developmental glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2017;26(18):3630–8.
86. D'haene B, Meire F, Claerhout I, Kroes HY, Plomp A, Arens YH, et al. Expanding the Spectrum of FOXC1 and PITX2 Mutations and Copy Number Changes in Patients with Anterior Segment Malformations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(1):324–33.
87. Reis LM, Tyler RC, Volkmann Kloss BA, Schilter KF, Levin AV, Lowry RB, et al. PITX2 and FOXC1 spectrum of mutations in ocular syndromes. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(12):1224–33.
88. Gokce G, Oren NC, Ozgonul C. Axenfeld-Rieger syndrome associated with severe maxillofacial and skeletal anomalies. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2015;19(1):109.
89. Ma AS, Grigg JR, Jamieson RV. Phenotype-genotype correlations and emerging pathways in ocular anterior segment dysgenesis. *Hum Genet*. 2019;138(8–9):899–915.
90. Bell SJ, Oluonye N, Harding P, Moosajee M. Congenital cataract: a guide to genetic and clinical management. *Ther Adv Rare Dis*. 2020;1:2633004020938061.
91. Ling C, Zhang D, Zhang J, Sun H, Du Q, Li X. Updates on the molecular genetics of primary congenital glaucoma (Review). *Exp Ther Med*. 2020;20(2):968–77.
92. Pedersen KB, Kappelgaard P, Kessel L, Sandfeld L, Zibrandtsen N, Bach-Holm D. Primary congenital glaucoma in Denmark, 1977-2016. *Acta Ophthalmol*. 2020;98(2):182–9.
93. Coêlho REA, Sena DR, Santa Cruz F, Moura BCFS, Han CC, Andrade FN, et al. CYP1B1 Gene and Phenotypic Correlation in Patients from Northeastern Brazil with Primary Congenital Glaucoma. *J Glaucoma*. 2019;28(2):161–4.
94. de Melo MB, Mandal AK, Tavares IM, Ali MH, Kabra M, de Vasconcellos JPC, et al. Genotype-Phenotype Correlations in CYP1B1-Associated Primary Congenital Glaucoma Patients Representing Two Large Cohorts from India and Brazil. *PLOS ONE*. 2015;10(5):e0127147.
95. Kelberman D, Islam L, Jacques TS, Russell-Eggitt I, Bitner-Glindzicz M, Khaw PT, et al. CYP1B1-related anterior segment developmental anomalies novel mutations for infantile glaucoma and von Hippel's ulcer revisited. *Ophthalmology*. 2011;118(9):1865–73.
96. Reis LM, Tyler RC, Weh E, Hendee KE, Kariminejad A, Abdul-Rahman O, et al. Analysis of CYP1B1 in pediatric and adult glaucoma and other ocular phenotypes.

Mol Vis. 2016;22:1229–38.

97. Désir J, Sznajder Y, Depasse F, Roulez F, Schrooyen M, Meire F, et al. LTBP2 null mutations in an autosomal recessive ocular syndrome with megalocornea, spherophakia, and secondary glaucoma. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(7):761–7.
98. Khan AO, Aldahmesh MA, Alkuraya FS. Congenital megalocornea with zonular weakness and childhood lens-related secondary glaucoma - a distinct phenotype caused by recessive LTBP2 mutations. *Mol Vis.* 2011;17:2570–9.
99. Fernández-Alcalde C, Nieves-Moreno M, Noval S, Peralta JM, Montaña VEF, Del Pozo Á, et al. Molecular and Genetic Mechanism of Non-Syndromic Congenital Cataracts. Mutation Screening in Spanish Families. *Genes (Basel).* 2021;12(4).
100. Bell S, Malka S, Lloyd IC, Moosajee M. Clinical Spectrum and Genetic Diagnosis of 54 Consecutive Patients Aged 0-25 with Bilateral Cataracts. *Genes (Basel).* 2021;12(2).
101. Wu X, Long E, Lin H, Liu Y. Prevalence and epidemiological characteristics of congenital cataract: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6:28564.
102. Pichi F, Lembo A, Serafino M, Nucci P. Genetics of Congenital Cataract. *Dev Ophthalmol.* 2016;57:1-14.
103. Rechsteiner D, Issler L, Koller S, Lang E, Bähr L, Feil S, et al. Genetic Analysis in a Swiss Cohort of Bilateral Congenital Cataract. *JAMA Ophthalmol.* 2021;139(7):691–700.
104. Chacon Fonseca I, Wong J, Mireskandari K, Chitayat D. Newborn with bilateral congenital cataracts: Never forget congenital rubella syndrome. *Paediatr Child Health.* 2020;25(2):72–6.
105. Berry V, Ionides A, Pontikos N, Georgiou M, Yu J, Ocaka LA, et al. The genetic landscape of crystallins in congenital cataract. *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1):333.
106. Reis LM, Semina EV. Genetic landscape of isolated pediatric cataracts: extreme heterogeneity and variable inheritance patterns within genes. *Hum Genet.* 2019;138(8–9):847–63.
107. Sheeladevi S, Lawrenson JG, Fielder AR, Suttle CM. Global prevalence of childhood cataract: a systematic review. *Eye (Lond).* 2016;30(9):1160–9.
108. Shiels A, Hejtmancik JF. Biology of Inherited Cataracts and Opportunities for Treatment. *Annu Rev Vis Sci.* 2019;5:123–49.
109. Berry V, Georgiou M, Fujinami K, Quinlan R, Moore A, Michaelides M. Inherited cataracts: molecular genetics, clinical features, disease mechanisms and novel therapeutic approaches. *Br J Ophthalmol.* 2020;104(10):1331–7.
110. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74(12):5463–7.
111. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol.* 2021;82(11):801–11.
112. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):e59.
113. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.*

2010;11(1):31–46.

114. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013;155(1):27–38.

115. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of „next-generation“ DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(7):887–900.

116. Schouten J, van Vught P, Galjaard RJ. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) for Prenatal Diagnosis of Common Aneuploidies. *Methods Mol Biol*. 2019;1885:161–70.

117. Bravo-Gil N, Méndez-Vidal C, Romero-Pérez L, González-del Pozo M, Rodríguez-de la Rúa E, Dopazo J, et al. Improving the management of Inherited Retinal Dystrophies by targeted sequencing of a population-specific gene panel. *Sci Rep*. 2016;6:23910.

118. Yang Y, Xia C, Zhou Z, Wei D, Xu K, Jia J, et al. A multiplex ligation-dependent probe amplification-based next-generation sequencing approach for the detection of copy number variations in the human genome. *Mol Med Rep*. 2018;18(6):5823–33.

119. Köhler S, Gargano M, Matentzoglou N, Carmody LC, Lewis-Smith D, Vasilevsky NA, et al. The Human Phenotype Ontology in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D1207–17.

120. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–23.

121. Houdayer C, Caux-Moncoutier V, Krieger S, Barrois M, Bonnet F, Bourdon V, et al. Guidelines for splicing analysis in molecular diagnosis derived from a set of 327 combined in silico/in vitro studies on BRCA1 and BRCA2 variants. *Hum Mutat*. 2012;33(8):1228–38.

122. Jarvik GP, Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1077–81.

123. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016;37(6):564–9.

124. Hilal L, Boutayeb S, Serrou A, Refass-Buret L, Shisseh H, Bencherifa F, et al. Screening of CYP1B1 and MYOC in Moroccan families with primary congenital glaucoma: Three novel mutations in CYP1B1. *Mol Vis*. 2010;16:1215–26.

125. Deml B, Reis LM, Maheshwari M, Griffis C, Bick D, Semina EV. Whole exome analysis identifies dominant COL4A1 mutations in patients with complex ocular phenotypes involving microphthalmia. *Clin Genet*. 2014;86(5):475–81.

126. Shah S, Ellard S, Kneen R, Lim M, Osborne N, Rankin J, et al. Childhood presentation of COL4A1 mutations. *Dev Med Child Neurol*. 2012;54(6):569–74.

127. Williamson KA, Hall HN, Owen LJ, Livesey BJ, Hanson IM, Adams GGW, et al. Recurrent heterozygous PAX6 missense variants cause severe bilateral microphthalmia via predictable effects on DNA–protein interaction. *Genet Med*. 2020;22(3):598–609.

128. Li J, Leng Y, Han S, Yan L, Lu C, Luo Y, et al. Clinical and genetic characteristics of Chinese patients with familial or sporadic pediatric cataract. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):94.
129. Ng D, Thakker N, Corcoran CM, Donnai D, Perveen R, Schneider A, et al. Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR. *Nat Genet.* 2004;36(4):411–6.
130. Mukhopadhyay R, Sergouniotis PI, Mackay DS, Day AC, Wright G, Devery S, et al. A detailed phenotypic assessment of individuals affected by MFRP-related oculopathy. *Mol Vis.* 2010;16:540–8.
131. Rainger J, Pehlivan D, Johansson S, Bengani H, Sanchez-Pulido L, Williamson KA, et al. Monoallelic and Biallelic Mutations in MAB21L2 Cause a Spectrum of Major Eye Malformations. *Am J Hum Genet.* 2014;94(6):915–23.
132. Gal A, Rau I, El Matri L, Kreienkamp HJ, Fehr S, Baklouti K, et al. Autosomal-Recessive Posterior Microphthalmos Is Caused by Mutations in PRSS56, a Gene Encoding a Trypsin-Like Serine Protease. *Am J Hum Genet.* 2011;88(3):382–90.
133. Lim SH, Tran-Viet KN, Yanovitch TL, Freedman SF, Klemm T, Call W, et al. CYP1B1, MYOC, and LTBP2 mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States. *Am J Ophthalmol.* 2013;155(3):508-517.e5.
134. Chavarria-Soley G, Michels-Rautenstrauss K, Pasutto F, Flikier D, Flikier P, Cirak S, et al. Primary congenital glaucoma and Rieger's anomaly: extended haplotypes reveal founder effects for eight distinct CYP1B1 mutations. *Mol Vis.* 2006;12:523-531.
135. Yu LC, Twu YC, Chang CY, Lin M. Molecular basis of the adult phenotype and the gene responsible for the expression of the human blood group I antigen. *Blood.* 2001;98(13):3840–5.
136. Seese SE, Reis LM, Deml B, Griffith C, Reich A, Jamieson RV, et al. Identification of missense MAB21L1 variants in microphthalmia and aniridia. *Hum Mutat.* 2021;42(7):877–90.
137. Redwood A, Douzgou S, Waller S, Ramsden S, Roberts A, Bonin H, et al. Congenital cataracts in females caused by BCOR mutations; report of six further families demonstrating clinical variability and diverse genetic mechanisms. *Eur J Med Genet.* 2020;63(2):103658.
138. Yu X, Zhao Y, Yang Z, Chen X, Kang G. Genetic research on Nance-Horan syndrome caused by a novel mutation in the *NHS* gene. *Gene.* 2024;906:148223.
139. Wang R, Wang WQ, Li XQ, Zhao J, Yang K, Feng Y, et al. A novel variant in FOXC1 associated with atypical Axenfeld-Rieger syndrome. *BMC Med Genomics.* 2021;14(1):277.
140. Aldahmesh MA, Alshammari MJ, Khan AO, Mohamed JY, Alhabib FA, Alkuraya FS. The syndrome of microcornea, myopic chorioretinal atrophy, and telecanthus (MMCAT) is caused by mutations in ADAMTS18. *Hum Mutat.* 2013;34(9):1195–9.
141. Chandra A, Arno G, Williamson K, Sergouniotis PI, Preising MN, Charteris DG, et al. Expansion of ocular phenotypic features associated with mutations in ADAMTS18. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(8):996–1001.

142. Peluso I, Conte I, Testa F, Dharmalingam G, Pizzo M, Collin RW, et al. The ADAMTS18 gene is responsible for autosomal recessive early onset severe retinal dystrophy. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:16.
143. Murch O, Jain V, Benneche A, Metcalfe K, Hobson E, Prescott K, et al. Further delineation of the clinical spectrum of White–Sutton syndrome: 12 new individuals and a review of the literature. *Eur J Hum Genet.* 2022;30(1):95–100.
144. White J, Beck CR, Harel T, Posey JE, Jhangiani SN, Tang S, et al. POGZ truncating alleles cause syndromic intellectual disability. *Genome Med.* 2016;8(1):3.
145. Batzir NA, Posey JE, Song X, Akdemir ZC, Rosenfeld JA, Brown CW, et al. Phenotypic expansion of POGZ-related intellectual disability syndrome (White-Sutton syndrome). *Am J Med Genet A.* 2020;182(1):38–52.
146. Wang P, Jia X, Xiao X, Li S, Long Y, Liu M, et al. An Early Diagnostic Clue for COL18A1- and LAMA1-Associated Diseases: High Myopia With Alopecia Areata in the Cranial Midline. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:644947.
147. Suri F, Yazdani S, Chapi M, Safari I, Rasooli P, Daftarian N, et al. COL18A1 is a candidate eye iridocorneal angle-closure gene in humans. *Hum Mol Genet.* 2018;27(21):3772–86.
148. Lahrouchi N, George A, Ratbi I, Schneider R, Elalaoui SC, Moosa S, et al. Homozygous frameshift mutations in FAT1 cause a syndrome characterized by colobomatous-microphthalmia, ptosis, nephropathy and syndactyly. *Nat Commun.* 2019;10(1):1180.
149. Haug P, Koller S, Maggi J, Lang E, Feil S, Wlodarczyk A, et al. Whole Exome Sequencing in Coloboma/Microphthalmia: Identification of Novel and Recurrent Variants in Seven Genes. *Genes (Basel).* 2021;12(1):65.
150. Sugiyama Y, Shelley EJ, Badouel C, McNeill H, McAvoy JW. Atypical Cadherin Fat1 Is Required for Lens Epithelial Cell Polarity and Proliferation but Not for Fiber Differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(6):4099–107.
151. Consugar MB, Navarro-Gomez D, Place EM, Bujakowska KM, Sousa ME, Fonseca-Kelly ZD, et al. Panel-based genetic diagnostic testing for inherited eye diseases is highly accurate and reproducible, and more sensitive for variant detection, than exome sequencing. *Genet Med.* 2015;17(4):253-261.
152. Jiman OA, Taylor RL, Lenassi E, Smith JC, Douzgou S, Ellingford JM, et al. Diagnostic yield of panel-based genetic testing in syndromic inherited retinal disease. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(5):576–86.
153. Moon D, Park HW, Surl D, Won D, Lee ST, Shin S, et al. Precision Medicine through Next-Generation Sequencing in Inherited Eye Diseases in a Korean Cohort. *Genes (Basel).* 2021;13(1):27.
154. Kamenarova K, Mihova K, Veleva N, Mermeklieva E, Mihaylova B, Dimitrova G, et al. Panel-based next-generation sequencing identifies novel mutations in Bulgarian patients with inherited retinal dystrophies. *Mol Genet Genomic Med.* 2022;10(8):e1997
155. Lenassi E, Clayton-Smith J, Douzgou S, Ramsden SC, Ingram S, Hall G, et al. Clinical utility of genetic testing in 201 preschool children with inherited eye disorders. *Genet Med.* 2020;22(4):745–51.

156. Slavotinek AM, Garcia ST, Chandratillake G, Bardakjian T, Ullah E, Wu D, et al. Exome Sequencing in 32 Patients with Anophthalmia/Microphthalmia and Developmental Eye Defects. *Clin Genet*. 2015;88(5):468–73.
157. Gerth-Kahlert C, Williamson K, Ansari M, Rainger JK, Hingst V, Zimmermann T, et al. Clinical and mutation analysis of 51 probands with anophthalmia and/or severe microphthalmia from a single center. *Mol Genet Genomic Med*. 2013;1(1):15–31.
158. Prontera P, Stangoni G, Ardisia C, Rogaia D, Mencarelli A, Donti E. Trisomy 2 mosaicism with caudal dysgenesis, Hirschsprung disease, and micro-anophthalmia. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(4):928–30.
159. Sanderson B, Leach C, Zein M, Islam O, MacLean G, Strube YNJ, et al. Bilateral severe microphthalmia in a neonate with trisomy 8 mosaicism: A new finding. *Am J Med Genet A*. 2021;185(2):534–8.
160. Geyer O, Wolf A, Levinger E, Harari-Shacham A, Walton DS, Shochat C, et al. Genotype/phenotype correlation in primary congenital glaucoma patients from different ethnic groups of the Israeli population. *Am J Ophthalmol*. 2011;151(2):263-271.e1.
161. Vincent A. Phenotypic heterogeneity of CYP1B1: mutations in a patient with Peters' anomaly. *J Med Genet*. 2001;38(5):324–6.
162. Nischal KK. A new approach to the classification of neonatal corneal opacities: *Curr Opin Ophthalmol*. 2012;23(5):344–54.
163. Wei J, Liu CJ, Li Z. ADAMTS-18: A metalloproteinase with multiple functions. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:1456–67.
164. Ganatra S, Kekunnaya R, Sachdeva V. Bilateral congenital membranous cataracts due to Glucosaminyl (N-Acetyl) Transferase 2 (GCNT2) mutation: Life-saving genetic analysis. *Indian J Ophthalmol*. 2022;70(7):2622–3.
165. Irum B, Khan SY, Ali M, Daud M, Kabir F, Rauf B, et al. Deletion at the GCNT2 Locus Causes Autosomal Recessive Congenital Cataracts. *PLOS One*. 2016;11(12):e0167562.
166. Chograni M, Alkuraya FS, Maazoul F, Lariani I, Chaabouni-Bouhamed H. RGS6: A Novel Gene Associated With Congenital Cataract, Mental Retardation, and Microcephaly in a Tunisian Family. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(2):1261–6.
167. Cheong SS, Hull S, Jones B, Chana R, Thornton N, Plagnol V, et al. Pleiotropic effect of a novel mutation in GCNT2 causing congenital cataract and a rare adult i blood group phenotype. *Hum Genome Var*. 2017;4:17004.
168. Pras E, Raz J, Yahalom V, Frydman M, Garzosi HJ, Pras E, et al. A Nonsense Mutation in the Glucosaminyl (N-acetyl) Transferase 2 Gene (GCNT2): Association with Autosomal Recessive Congenital Cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(6):1940–5.
169. Chograni M, Chaabouni M, Maazoul F, Bouhamed HC. Investigation of Four Genes Responsible for Autosomal Recessive Congenital Cataract and Highly Expressed in the Brain in Four Unrelated Tunisian Families. *Open J Ophthalmol*. 2012;02(03):64–70.
170. Happ H, Weh E, Costakos D, Reis LM, Semina EV. Case report of homozygous deletion involving the first coding exons of GCNT2 isoforms A and B and part of the

- upstream region of TFAP2A in congenital cataract. *BMC Med Genet.* 2016;17(1):64.
171. Guey S, Hervé D. Main features of COL4A1-COL4A2 related cerebral microangiopathies. *Cereb Circ Cogn Behav.* 2022;3:100140.
172. Xia XY, Li N, Cao X, Wu QY, Li TF, Zhang C, et. al. A novel COL4A1 gene mutation results in autosomal dominant non-syndromic congenital cataract in a Chinese family. *BMC Med Genet.* 2014;15:97.
173. Yogarajah M, Matarin M, Vollmar C, Thompson PJ, Duncan JS, Symms M, et al. PAX6, brain structure and function in human adults: advanced MRI in aniridia. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016;3(5):314–30.
174. Kit V, Cunha DL, Hagag AM, Moosajee M. Longitudinal genotype-phenotype analysis in 86 patients with PAX6-related aniridia. *JCI Insight.* 2021;6(14):e148406.
175. Li H, Yang L, Sun Z, Yuan Z, Wu S, Sui R. A novel small deletion in the NHS gene associated with Nance-Horan syndrome. *Sci Rep.* 2018;8(1):2398.
176. Sharma S, Datta P, Sabharwal JR, Datta S. Nance–Horan Syndrome: A Rare Case Report. *Contemp Clin Dent.* 2017;8(3):469–72.
177. Ding X, Patel M, Herzlich AA, Sieving PC, Chan CC. Ophthalmic Pathology of Nance-Horan Syndrome: Case Report and Review of the Literature. *Ophthalmic Genet.* 2009;30(3):127–35.
178. Lopez Martinolich M, Northrup H, Mancias P, Hillman P, Rao K, Mowrey K. Identification of a novel microdeletion causative of Nance-Horan syndrome. *Mol Genet Genomic Med.* 2022;10(3):e1879.
179. Patel N, Khan AO, Alsahli S, Abdel-Salam G, Nowilaty SR, Mansour AM, et al. Genetic investigation of 93 families with microphthalmia or posterior microphthalmos. *Clin Genet.* 2018;93(6):1210–22.
180. Gath N, Gross JM. Zebrafish mab21l2 mutants possess severe defects in optic cup morphogenesis, lens and cornea development. *Dev Dyn.* 2019;248(7):514–529.
181. Deml B, Kariminejad A, Borujerdi RHR, Muheisen S, Reis LM, Semina EV. Mutations in MAB21L2 Result in Ocular Coloboma, Microcornea and Cataracts. *PLoS Genet.* 2015;11(2):e1005002.
182. Horn D, Prescott T, Houge G, Brække K, Rosendahl K, Nishimura G, et al. A Novel Oculo-Skeletal syndrome with intellectual disability caused by a particular MAB21L2 mutation. *Eur J Med Genet.* 2015;58(8):387–91.
183. Aubert-Mucca M, Pernin-Grandjean J, Marchasson S, Gaston V, Habib C, Meunier I, et al. Confirmation of FZD5 implication in a cohort of 50 patients with ocular coloboma. *Eur J Hum Genet.* 2021;29(1):131–40.
184. Müller PL, Treis T, Alsaedi A, Webster AR, Khaw P, Michaelides M, et al. Foveal structure and visual function in nanophthalmos and posterior microphthalmos. *Br J Ophthalmol.* 2022;106(8):1164–1170
185. Stessman HAF, Willemsen MH, Fenckova M, Penn O, Hoischen A, Xiong B, et al. Disruption of POGZ Is Associated with Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders. *Am J Hum Genet.* 2016;98(3):541–52.
186. Nagy D, Verheyen S, Wigby KM, Borovikov A, Sharkov A, Slegesky V, et al. Genotype-Phenotype Comparison in POGZ-Related Neurodevelopmental Disorders

by Using Clinical Scoring. *Genes (Basel)*. 2022;13(1):154.

187. Haarman AEG, Thiadens AAHJ, van Tienhoven M, Loudon SE, de Klein JEMMA, Brosens E, et al. Whole exome sequencing of known eye genes reveals genetic causes for high myopia. *Hum Mol Genet*. 2022;31(19):3290–8.

188. Meyts I, Bosch B, Bolze A, Boisson B, Itan Y, Belkadi A, et al. Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):957–69.

189. Dremsek P, Schwarz T, Weil B, Malashka A, Laccone F, Neesen J. Optical Genome Mapping in Routine Human Genetic Diagnostics-Its Advantages and Limitations. *Genes (Basel)*. 2021;12(12):1958.

190. Mets MB, Chhabra MS. Eye manifestations of intrauterine infections and their impact on childhood blindness. *Surv Ophthalmol*. 2008;53(2):95–111.

191. Kaushik S, Choudhary S, Dhingra D, Singh MP, Gupta G, Arora A, et al. Newborn Glaucoma: A Neglected Manifestation of Congenital Rubella Syndrome. *Ophthalmol Glaucoma*. 2022;5(4):428–35.

192. Liu X, Zhang Y, Zhang B, Gao H, Qiu C. Nonsense suppression induced readthrough of a novel PAX6 mutation in patient-derived cells of congenital aniridia. *Mol Genet Genomic Med*. 2020;8(5):e1198.

193. Rajendrababu S, Babu N, Sinha S, Balakrishnan V, Vardhan A, Puthuran GV, et al. A Randomized Controlled Trial Comparing Outcomes of Cataract Surgery in Nanophthalmos With and Without Prophylactic Sclerostomy. *Am J Ophthalmol*. 2017;183:125–33.

Anhang A: Genpanels

Die Tabellen A1-4 listen die im Rahmen der Primärdiagnostik untersuchten Phänotyp-spezifischen Genpanels, Tabelle A5 die im Augen-Gesamtpanel enthaltenen Gene auf:

Tabelle A1: Panel Kongenitale Katarakt (CC).

<i>COL4A1</i>	<i>CRYAA</i>	<i>CRYAB</i>	<i>CRYBB1</i>	<i>CRYBB3</i>	<i>CRYGC</i>	<i>FOXE3</i>	<i>GJA3</i>
<i>GJA8</i>	<i>HSF4</i>	<i>LIM2</i>	<i>PAX6</i>	<i>NHS</i>	<i>SIL1</i>		

Tabelle A2: Panel Mikrophthalmie-Anophthalmie-Kolobom (MAC).

<i>ALDH1A3</i>	<i>FRAS1</i>	<i>OTX2</i>	<i>PAX6</i>	<i>RAX</i>	<i>SOX2</i>	<i>STRA6</i>	<i>VSX2</i>
----------------	--------------	-------------	-------------	------------	-------------	--------------	-------------

Tabelle A3: Panel Vorderabschnittsdysgenesien (ASD).

<i>FOXC1</i>	<i>PITX2</i>	<i>PAX6</i>					
--------------	--------------	-------------	--	--	--	--	--

Tabelle A4: Panel Kongenitales Glaukom (PCG).

<i>CYP1B1</i>	<i>FOXC1</i>	<i>LTBP2</i>	<i>MYOC</i>	<i>PAX6</i>	<i>PITX2</i>		
---------------	--------------	--------------	-------------	-------------	--------------	--	--

Tabelle A5: Augen-Gesamtpanel.

<i>ABCB6</i>	<i>ACTB</i>	<i>ACTG1</i>	<i>ADAMTS10</i>	<i>ADAMTS17</i>	<i>ADAMTS2</i>	<i>ADAMTSL4</i>	<i>AGBL1</i>
<i>ALDH1A3</i>	<i>ASPH</i>	<i>ATOH7</i>	<i>ATP1A3</i>	<i>B3GLCT</i>	<i>BCOR</i>	<i>BFSP1</i>	<i>BFSP2</i>
<i>BMP4</i>	<i>BMP7</i>	<i>C12orf57</i>	<i>CAPN15</i>	<i>CBS</i>	<i>CEP83</i>	<i>CHD7</i>	<i>CHMP4B</i>
<i>CHRNE</i>	<i>CHST6</i>	<i>COL11A1</i>	<i>COL11A2</i>	<i>COL17A1</i>	<i>COL18A1</i>	<i>COL2A1</i>	<i>COL3A1</i>
<i>COL4A1</i>	<i>COL4A2</i>	<i>COL5A1</i>	<i>COL5A2</i>	<i>COL8A2</i>	<i>COL9A1</i>	<i>COL9A2</i>	<i>CRYAA</i>
<i>CRYAB</i>	<i>CRYBA1</i>	<i>CRYBA4</i>	<i>CRYBB1</i>	<i>CRYBB2</i>	<i>CRYBB3</i>	<i>CRYGB</i>	<i>CRYGC</i>
<i>CRYGD</i>	<i>CRYGS</i>	<i>CTC1</i>	<i>CTDP1</i>	<i>CTNNA1</i>	<i>CYP1B1</i>	<i>CYP27A1</i>	<i>CYP4V2</i>
<i>DCN</i>	<i>DNAJC30</i>	<i>DOK7</i>	<i>DYNC2H1</i>	<i>EPG5</i>	<i>EPHA2</i>	<i>ERCC1</i>	<i>ERCC2</i>
<i>ERCC5</i>	<i>ERCC6</i>	<i>EYA1</i>	<i>FAM126A</i>	<i>FBN1</i>	<i>FOXC1</i>	<i>FOXE3</i>	<i>FOXL2</i>
<i>FRAS1</i>	<i>FREM2</i>	<i>FRMD7</i>	<i>FTL</i>	<i>FYCO1</i>	<i>FZD4</i>	<i>GALK1</i>	<i>GCNT2</i>
<i>GDF3</i>	<i>GDF6</i>	<i>GEMIN4</i>	<i>GJA1</i>	<i>GJA3</i>	<i>GJA8</i>	<i>GLA</i>	<i>GPATCH3</i>
<i>GPR143</i>	<i>GRIP1</i>	<i>GSN</i>	<i>HCCS</i>	<i>HESX1</i>	<i>HMX1</i>	<i>HSF4</i>	<i>IMPG1</i>
<i>JAM3</i>	<i>KIF21A</i>	<i>KRT3</i>	<i>LIM2</i>	<i>LONP1</i>	<i>LRMDA</i>	<i>LRP2</i>	<i>LRP5</i>
<i>LTBP2</i>	<i>MAB21L2</i>	<i>MAF</i>	<i>MFN2</i>	<i>MFRP</i>	<i>MIP</i>	<i>MTPAP</i>	<i>MTRFR</i>
<i>MYH2</i>	<i>MYH9</i>	<i>MYOC</i>	<i>NDP</i>	<i>NDUFB11</i>	<i>NHS</i>	<i>NR2F1</i>	<i>OCA2</i>
<i>OCRL</i>	<i>OPA1</i>	<i>OPA3</i>	<i>OTX2</i>	<i>OVOL2</i>	<i>P3H2</i>	<i>PAX2</i>	<i>PAX6</i>
<i>PHOX2A</i>	<i>PIKFYVE</i>	<i>PITX2</i>	<i>PRDM5</i>	<i>PRSS56</i>	<i>PXDN</i>	<i>RAB18</i>	<i>RAB3GAP1</i>
<i>RAB3GAP2</i>	<i>RAPSN</i>	<i>RARB</i>	<i>RAX</i>	<i>RTN4IP1</i>	<i>SALL2</i>	<i>SHH</i>	<i>SIL1</i>
<i>SIPA1L3</i>	<i>SIX3</i>	<i>SIX6</i>	<i>SLC16A12</i>	<i>SLC24A5</i>	<i>SLC25A46</i>	<i>SLC33A1</i>	<i>SLC38A8</i>
<i>SLC45A2</i>	<i>SLC4A11</i>	<i>SLC6A6</i>	<i>SMOC1</i>	<i>SOX2</i>	<i>SOX21</i>	<i>SSBP1</i>	<i>STRA6</i>
<i>TAGSTD2</i>	<i>TBC1D20</i>	<i>TDRD7</i>	<i>TENM3</i>	<i>TFAP2A</i>	<i>TGFBI</i>	<i>TGIF1</i>	<i>TMEM114</i>
<i>TMEM126A</i>	<i>TMEM98</i>	<i>TREX1</i>	<i>TUBB2B</i>	<i>TUBB3</i>	<i>TYR</i>	<i>TYRP1</i>	<i>UBIAD1</i>
<i>VAX1</i>	<i>VCAN</i>	<i>VIM</i>	<i>VPS13B</i>	<i>VSX1</i>	<i>VSX2</i>	<i>WFS1</i>	<i>ZEB1</i>
<i>ZIC2</i>	<i>ZNF469</i>						

Anhang B: ACMG-Kriterien

Die Tabellen (alle nach *Richards et al.* (120)) A2 und A3 zeigen die ACMG-Kriterien für die Klassifikation von pathogenen und benignen Varianten; Tabelle A4 stellt die Regeln zur Kombination der Kriterien für die Variantenklassifizierung dar.

Tabelle A2: ACMG-Kriterien zur Klassifikation pathogener Varianten. LOF=Loss-of-function; OR=Odds Ratio.

Evidence of Pathogenicity	Category
<u>Very Strong</u>	<p><u>PVS1:</u> Null variant (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease.</p> <p>Caveats:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g., GFAP, MYH7) • Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene • Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact • Use caution in the presence of multiple transcripts
<u>Strong</u>	<p><u>PS1:</u> Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change</p> <ul style="list-style-type: none"> • Example: Val→Leu caused by either G>C or G>T in the same codon • Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at amino acid/protein level <p><u>PS2:</u> De novo (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history</p> <p>Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, and so on, can contribute to non maternity.</p> <p><u>PS3:</u> Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product</p> <p>Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well established.</p> <p><u>PS4:</u> The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls</p> <p>Note 1: Relative risk or OR, as obtained from case–control studies, is >5.0, and the confidence interval around the estimate of relative risk or OR does not include 1.0. See the article for detailed guidance.</p> <p>Note 2: In instances of very rare variants where case–control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.</p>
<u>Moderate</u>	<p><u>PM1:</u> Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation.</p> <p><u>PM2:</u> Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium</p> <ul style="list-style-type: none"> • Caveat: Population data for insertions/deletions may be poorly called by next-generation sequencing. <p><u>PM3:</u> For recessive disorders, detected in trans with a pathogenic variant</p>

<p>Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase.</p> <p>PM4: Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants</p> <p>PM5: Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before</p> <ul style="list-style-type: none"> • Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys • Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level. <p>PM6: Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity</p>
<p>PP1: Co segregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease</p> <p>Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data</p> <p>PP2: Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease</p> <p>PP3: Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Caveat: Because many in-silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant. <p>PP4: Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology</p> <p>PP5: Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p>

Supporting

Tabelle A3: ACMG-Kriterien zur Klassifikation benigner Varianten.

Evidence of benign impact

Category

<u>Standalone</u>	BA1: Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium
<u>Strong</u>	<p>BS1: Allele frequency is greater than expected for disorder</p> <p>BS2: Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age</p> <p>BS3: Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing</p> <p>BS4: Lack of segregation in affected members of a family</p> <ul style="list-style-type: none"> • Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (i.e., cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.

Supporting

BP1: Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease

BP2: Observed in trans with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in cis with a pathogenic variant in any inheritance pattern

BP3: In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function

BP4: Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)

• Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.

BP5: Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease

BP6: Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation

BP7: A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved

Tabelle A4: Regeln zur Kombination von ACMG-Kriterien zur Varianten-Klassifizierung.

Pathogenic	(i) 1 Very strong (PVS1) AND a) ≥ 1 Strong (PS1–PS4) OR b) ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) OR c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) OR d) ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) (ii) ≥ 2 Strong (PS1–PS4) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND a) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR b) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) OR c) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Likely Pathogenic	(i) 1 Very strong (PVS1) AND 1 moderate (PM1–PM6) OR (ii) 1 Strong (PS1–PS4) AND 1–2 moderate (PM1–PM6) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (iv) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR (v) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (vi) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Benign	(i) 1 Stand-alone (BA1) OR (ii) ≥ 2 Strong (BS1–BS4)
Likely Benign	(i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) OR (ii) ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)
Uncertain Significance	(i) Other criteria shown above are not met OR (ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory

Anhang C: Klinische Merkmale ungeklärter Patienten

Tabelle A5 zeigt die phänotypischen Merkmale der Studien-Patienten, bei denen weder eine ursächliche Variante (Klasse 4 oder 5 nach ACMG) noch eine Phänotyp-relevante Variante unklarer Signifikanz (Klasse 3 nach ACMG) gefunden wurde.

Tabelle A5: Ungeklärte Patienten.

Indexpatient	Beschriebener okulärer Phänotyp	Ausprägung	Extraokulärer Phänotyp	Familienanamnese
MAC-2	Mikrophthalmie, Netzhaut-/Aderhautkolobom	Bilateral	-	Negativ
MAC-6	Mikrophthalmie, Optikuskolobom	Bilateral	part. Balkenagenesie, Choanalatresie, komplexe Hirnfehlbildung	Negativ
MAC-7	Mikrophthalmie, Iris-/Optikuskolobom	Bilateral	-	Negativ
MAC-13	Mikrophthalmie	Bilateral	-	Negativ
MAC-17	Netzhaut-/Aderhautkolobom	Bilateral	Wirbelkörperfehlbildung, leichte Nierenagenesie	Negativ
MAC-18	Mikrophthalmie, Iriskolobom	Bilateral	-	Negativ
MAC-21	Mikrophthalmie, Katarakt, Iriskolobom	Bilateral	Choanalatrasie, fehlender Schneidzahn	Negativ
MAC-31	Mikrophthalmie, Mikrocornea, Netzhaut-/Aderhautkolobom	Bilateral	-	Negativ
MAC-32	Iriskolobom	Bilateral	-	Negativ
MAC-38	Mikrophthalmie, PHPV	Unilateral	-	Negativ
ASD/PCG-3	Kongenitales Glaukom	Bilateral	-	Positiv (Tante, Onkel, Cousin, 2 Nichten)
ASD/PCG-16	Kongenitales Glaukom	Bilateral	-	Negativ
ASD/PCG-24	Kongenitales Glaukom	Bilateral	-	Negativ
ASD/PCG-25	Kongenitales Glaukom	Bilateral	-	Negativ
ASD/PCG-29	Kongenitales Glaukom	Bilateral	-	Negativ
ASD/PCG-35	Kongenitales Glaukom	Bilateral	-	Negativ
ASD/PCG-36	Irishypoplasie, Vorderabschnittsdysgenesie	Bilateral	-	Negativ

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Prof. Elke Holinski-Feder für die Möglichkeit zur Promotion und für die Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Zudem möchte mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des MGZ für die Zusammenarbeit und die sehr engagierte und konstruktive Hilfe bei der Datenerhebung und -analyse bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Andreas Laner.

Auch bei den Patientinnen und Patienten, die sich zur Teilnahme an der Studie bereit erklärt haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Frau, meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre uneingeschränkte Unterstützung, Geduld, Beratung und Motivation. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meiner Schwester Dr. Teresa Neuhann dafür, dass sie mich für die Ophthalmogenetik begeistert hat, und für ihre unermüdliche und unersetzbare Unterstützung bei der Konzeption des Themas und der Fertigstellung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung



Neuhann, Lukas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Next Generation Sequencing bei kongenitalen Augenfehlbildungen: Identifizierung genetischer Ursachen und Vergleich unterschiedlicher panelbasierter Diagnostikstrategien

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 28.11.2024

Ort, Datum

Lukas Neuhann

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand