

**Diplomarbeit**

**Molekulargenetische Charakterisierung konsanguiner Familien  
mit Polydaktylie mittels Homozygotiekartierung und NGS**

eingereicht von

**Magdalena Anna Wiener, BSc**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde  
(Dr.<sup>in</sup> med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Diagnostik- & Forschungsinstitut für Humangenetik Graz**

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Christian Windpassinger

*Diagnostik- & Forschungsinstitut für Humangenetik Graz*

Graz, am 28. Jänner 2023

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

*Graz, am 28.01.2023*

*Magdalena Anna Wiener, BSc eh.*

## Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meinem Betreuer, seine Herrschaft, Professor Wolfgang, auch bekannt als Christian Windpassinger bedanken. Stets konnte ich auf seine Unterstützung zählen (zumindest, wenn ich einen Kuchen mitbrachte). Sei es hinsichtlich praktischer Fragen oder moralischer Unterstützung gewesen, Chris stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und half mir auch durch meine Motivationstiefs. So ermöglichte er es mir nicht nur, meine analytischen Fertigkeiten im Labor sowie der Arbeit mit Datenbanken sehr zu erweitern, sondern auch einiges an Selbständigkeit für meinen weiteren Weg zu erlangen.

Weiters möchte ich mich bei Jasmin Blatterer für die großartige und unglaublich verlässliche Unterstützung bei der Auswertung der WES-Daten bedanken.

Ein weiteres Dankeschön gilt auch Erwin Petek. Seit Beginn meiner Schaffenszeit am Institut gelang es ihm immer wieder mich durch gleichsam unterhaltsame und tiefgründige Gespräche zu motivieren und konnte mir bei dem einen oder anderen Kaffee bei Fragen jeglicher Art weiterhelfen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch beim gesamten Team der Humangenetik für die freundliche, nette und hilfsbereite Zusammenarbeit bedanken. Ich fühlte mich gut aufgenommen und die Pläusche in den Mittagspausen schafften einen angenehmen Ausgleich.

Last but not least danke ich von Herzen meiner Familie und meinen Freund\*innen. Während meinem gesamten Medizinstudium und somit auch dem Verfassen der Diplomarbeit hatte ich das ein oder andere Mal mit der ein oder anderen Sinnkrise zu kämpfen. Ihr habt mich jedes Mal aufs Neue aufgebaut, mich an meine großen Ziele erinnert und mich so zur Weiterarbeit motiviert. Ihr hattet Tag und Nacht ein offenes Ohr für mich. Ihr habt mit mir auch die Fortschritte gefeiert und mir immer wieder gezeigt, wie stolz ihr auf mich seid. Ihr alle glaubt immer an mich, wenn ich es auch manchmal selbst nicht tue, und habt euch dennoch schon als meine ersten Patient\*innen angekündigt. Danke für das Vertrauen und die Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung .....	I
Danksagung .....	II
Inhaltsverzeichnis .....	III
Abkürzungen und deren Erklärung .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Datenbanken- und Softwareverzeichnis .....	X
Zusammenfassung in Deutsch .....	XI
Abstract in Englisch .....	XII
1 Einleitung .....	1
1.1 Entwicklung der Hand in der Embryogenese .....	1
1.2 Polydaktylie der Hand .....	3
1.2.1 Formen und Vererbung der Polydaktylie .....	4
1.3 Aktueller Forschungsstand betreffend „isolierte, postaxiale Polydaktylie“ in der Genetik .....	5
1.4 Behandlung der isolierten Polydaktylie .....	6
1.5 Konsanguinität und das damit einhergehende erhöhte Risiko autosomal rezessiv vererbter Erkrankungen .....	7
1.6 SNP-Array, CNV-Analyse und Homozygotiekartierung .....	9
1.7 Whole Exome Sequencing (WES) .....	10
1.8 Ziel dieser Arbeit .....	12
2 Material und Methoden .....	13
2.1 Material .....	13
2.1.1 Familie „PD1“ .....	13
2.1.2 Familie „PD2“ .....	15
2.2 Methoden .....	16
	III

---

2.2.1	DNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop™ .....	16
2.2.2	Auswertung der WES-Daten.....	18
3	Ergebnisse .....	31
3.1	Familie PD1.....	31
3.1.1	Resultate der Mikrosatellitenmarker-Analysen in <i>Gli3</i> .....	31
3.1.2	Resultate der DNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop®	32
3.1.3	Resultate der WES-Datenauswertung .....	33
3.1.4	Homozygotiekartierung mittels homozygotymapper.org und „ChAS 4.2.1“ (Illumina) .....	38
3.2	Familie PD2.....	43
3.2.1	Resultate der DNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop®	43
3.2.2	Resultate der WES-Datenauswertung .....	44
3.2.3	Homozygoty Mapping mittels homozygotymapper.org und „ChAS 4.2.1“ (Illumina) .....	49
3.2.4	Familie PD2 - Resultate der Sanger Sequenzierung .....	51
3.2.5	Resultate des Abgleichs der Kandidatenvariante mittels „IGV Version 272“	55
4	Diskussion.....	56
4.1	Familie PD1.....	56
4.2	Familie PD2.....	59
5	Literaturverzeichnis .....	62

## Abkürzungen und deren Erklärung

AD	Autosomal dominant vererbt
AR	Autosomal rezessiv vererbt
bp	Basenpaar(e)
CNV	Copy Number Variation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
HGB	UCSC Human Genome Browser
HSM	Qiagen Hot Star Taq Mastermix
kB	Kilobasen
MIP	Mirror Image Polydaktylie
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
NTC	Negative Templet Ccontrol
PAP	Postaxiale Polydaktylie
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Polydaktylie
rcf	Zentrifugalbeschleunigung
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variant
TC	Fast Thermal Cycler
VAF	Variant Allele Frequence
WES	Whole Exome Sequenzierung
WGS	Whole Genome Sequenzierung
µL	Mikroliter

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Autosomal rezessiver Erbgang (beide Elternteile tragen Variante heterozygot): p(erkrankt): 25%. p(ÜberträgerIn): 50%. p(gesund): 25% (in beiden Allelen liegt Wildtyp vor) (31).....	8
Abbildung 2: Foto der Hand des Betroffenen „PD1-1“. An der ulnaren Handseite ein rudimentärer Finger.....	13
Abbildung 3: Foto der Hand der Betroffenen „PD1-4“. An der ulnaren Handseite ein rudimentärer Finger.....	14
Abbildung 4: Stammbaum der Familie „PD1“. ■ = männlich, erkrankt, am Leben, □ = männlich, gesund, am Leben, ● = weiblich, erkrankt, am Leben, ○ = weiblich, gesund, am Leben. Ist das jeweilige Symbol mit einem Querstrich gekennzeichnet, ist die Person verstorben.....	14
Abbildung 5: Stammbaum der Familie „PD2“.....	15
Abbildung 6: Homozygoty Mapping des Individuums PD1-4. Erstellt mittels homozygotymapper.org. In Rot dargestellt alle homozygoten Bereiche auf den Chromosomen 1 bis 22, in Schwarz dargestellt alle heterozygoten Bereiche. ....	38
Abbildung 7: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 2: 205.843.303–208.715.314. ....	39
Abbildung 8: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 6: 47.318.885–52.817.144. ....	39
Abbildung 9: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 12: 54.955.324–57.616.013. ....	39
Abbildung 10: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 13: 100.188.067-102.357.497.....	40
Abbildung 11: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 15: 50.354.592–54.308.996 sowie 69.302061–76.002654. ....	40

Abbildung 12: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 18: 50.354.592 – 54.308.996 sowie 69.302061 – 76.002654. ....	40
Abbildung 13: Homozygosity Mapping des Individuums PD2-1 auf homozygositymapper.org. In Rot dargestellt alle homozygoten Bereiche auf den Chromosomen 1 bis 22, in Schwarz dargestellt alle heterozygoten Bereiche. ....	49
Abbildung 14: Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR der DNA der Individuen PD2-1 und PD2-2. ....	52
Abbildung 15: Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung des Individuums PD2-1. Sequenz mit forward-Primer. Blau hinterlegt die homozygot vorhandene missense Variante NM_003441.4:c.292C>T. ....	53
Abbildung 16: Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung des Individuums PD2-2. Sequenz mit forward-Primer. Blau hinterlegt die Base der missense Variante NM_003441.4:c.292C>T. Der Wildtyp liegt vor. ....	53
Abbildung 17: Kandidatenvariante (rote Ts) dargestellt in "IGV Version 272". Rechts: Daten zur Kandidatenvariante. ....	55
Abbildung 18: 3D Model des Proteins des Gens ZNF141. (Quelle: ZNF141 - Zinc finger protein 141 - Homo sapiens (Human) - ZNF141 gene & protein (uniprot.org). ....	59
Abbildung 19: Spezies, in welchen das Gen ZNF141 hoch konserviert ist. In blau geschrieben: Primaten. In dieser Spezies ist das Gen hoch konserviert. In grün geschrieben: Euarchontogliren. In dieser Spezies ist das Gen nicht konserviert(44). ....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gene, in welchen bereits für isolierte, postaxiale Polydaktylie kausale Varianten beschrieben wurden.....	5
Tabelle 2: Filtereinstellungen zur Auswertung der WES-Daten des Individuums PD1-4 mit „Variant Studio 3.0“ (Illumina).....	18
Tabelle 3: Filtereinstellungen zur Auswertung der WES-Daten des Individuums PD2-1 mit „Variant Studio 3.0“ (Illumina).....	18
Tabelle 4: Filtereinstellungen zur Auswertung der WES-Daten mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®).....	20
Tabelle 5: Allgemeine Filtereinstellungen zur Auswertung der WES-Daten mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®).....	20
Tabelle 6: Benötigte Volumina, um eine 100µM Lösung der Primer herzustellen.	24
Tabelle 7: Einstellungen in "IGV Version 272".....	30
Tabelle 8: Die für die vorab meiner Arbeit durchgeführten Mikrosatellitenmarker-Analysen verwendeten Marker.....	31
Tabelle 9: Resultate der in Familie PD1 durchgeführten Mikrosatellitenmarker-Analysen aller vorhandenen DNAs.....	31
Tabelle 10: DNA-Konzentrationen der Familie PD1 gemessen mittels NanoDrop®. .....	32
Tabelle 11: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.....	33
Tabelle 12: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.....	33
Tabelle 13: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“ mit geänderter Population Frequency. ..	34
Tabelle 14: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“ mit geänderter Population Frequency. ..	34
Tabelle 15: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.....	35
Tabelle 16: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.....	36

Tabelle 17: Auswertung der Whole Exome Sequencing Daten des Individuums PD1-4 mittels homozygotymapper.org sowie „ChAS 4.2.1“. Bekannte Genloci aus: Hum Genet. 2019 June ; 138(6): 593–600. doi:10.1007/s00439-019-02000-0.....	41
Tabelle 18: Daten zu den Varianten in GLI1.....	41
Tabelle 19: DNA-Konzentrationen der Familie PD2 gemessen mittels NanoDrop®. ....	43
Tabelle 20: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.....	44
Tabelle 21: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“ mit geänderter Population Frequency. ...	44
Tabelle 22: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.....	45
Tabelle 23: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.....	46
Tabelle 24: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.....	47
Tabelle 25: Nach dem Schlagwort „polydactyly“ gefilterte Varianten des Individuums PD2- 1 in Gen ZNF141.....	48
Tabelle 26: Auswertung der Whole Exome Sequencing Daten des Individuums PD2-1 mittels homozygotymapper.org. Bekannte Genloci aus: Hum Genet. 2019 June; 138(6): 593–600. doi:10.1007/s00439-019-02000-0.....	50
Tabelle 27: Die mittels Primer3plus designten Primer, welche Variante NM_003441.4:c.292C>T umfassen.....	51

## Datenbanken- und Softwareverzeichnis

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>

<https://www.genecards.org/>

<http://genome.ucsc.edu>

<https://gnomad.broadinstitute.org/uniprot.org>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>

<http://www.homozygositymapper.org/>

<https://www.malacards.org/>

<https://www.mutationtaster.org/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim.org>

<https://www.omim.org/>

<https://www.snapgene.com/>

<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>

## Zusammenfassung in Deutsch

Polydaktylie bezeichnet eine angeborene Extremitätenfehlbildung im Rahmen welcher bei Betroffenen zusätzliche Finger oder Zehen vorhanden sind.

Einzuteilen ist Polydaktylie je nach Phänotyp in syndromale und nicht-syndromale (isolierte) sowie in präaxiale, zentrale und postaxiale Formen. Das Vererbungsmuster kann sowohl autosomal rezessiv als auch dominant vorliegen. Aktuell sind 12 Gene, welche mit isolierter, postaxialer Polydaktylie in Zusammenhang gebracht wurden, bekannt.

Ziel dieser Arbeit war die Detektion der kausalen Mutation in zwei konsanguinen, pakistanischen Familien mit isolierter, postaxialer Polydaktylie.

Aufgrund der Erwartung einer autosomal rezessiven vererbten Variante wurden als Methoden der Wahl die Whole Exome Sequenzierung (WES) je eines betroffenen Familienmitglieds sowie SNP-Arrays mit nachfolgender Homozygotiekartierung gewählt. Segregationsanalysen wurden mittels Markeranalysen und Sanger Sequenzierung erstellt.

Resultate der WES, des SNP-Arrays sowie der Markeranalysen in Familie PD1 konnten *Gli3* als kausalen Genlokus ausschließen und erbrachten im übrigen keine Kandidatenvarianten. Ein weiterer SNP-Array mit CNV-Analyse sowie eine WES sind für die Mutationsdetermination notwendig.

Resultate der WES in Familie PD2 ergaben eine Kandidatenvariante NM\_003441.4:c.292C>T im Gen *ZNF141*. Um die Variante in diesem bereits 2012 von Kalsoom et al. mit postaxialer Polydaktylie in Verbindung gebrachten Gen als kausale Mutation bestätigen zu können, sind eine erweiterte Segregationsanalyse sowie zelluläre Experimente und Tiermodelle notwendig. Die zukünftige Evaluierung dieser Kandidatenvariante fließt maßgeblich in die Bewertung des Gens *ZNF141* als Krankheitsgen für isolierte Polydaktylie ein.

## Abstract in English

Polydactyly is a congenital limb malformation characterized by extra toes or fingers. The phenotype is classified as syndromal and non-syndromic as well as preaxial, central and postaxial types. The inheritance mode can be autosomal recessive but mostly polydactyly is inherited autosomal dominantly. To date 12 genes causing non-syndromic postaxial polydactyly are identified.

The aim of this thesis was to detect the disease-causing variations in two inbred families living in Pakistan and presenting non-syndromic postaxial polydactyly of both hands.

We applied whole exome sequencing (WES) in one affected individual of each family as well as a genome wide SNP-array in combination with homozygosity mapping analysis due to the expectation of an autosomal recessive mode of inheritance. Segregation analysis was done by microsatellite analysis as well as by Sanger sequencing.

Based on WES data, SNP-array data and marker analysis data in family PD1 we could exclude *Gli3* as a potential disease-causing locus and could not identify further candidate variants. Further investigation of additional family members applying SNP-array with CNV-analysis as well as WES are required.

WES results in family PD2 revealed the candidate variant NM\_003441.4:c.292C>T in *ZNF141*. In 2012, Kalsoom et al. described mutations in *ZNF141* as underlying genetic cause of non-syndromic postaxial polydactyly in a large consanguineous Pakistani family. To evaluate the pathogenicity of this variant concerning non-syndromic postaxial polydactyly, further segregation analysis, cellular experiments and animal models are required.

# 1 Einleitung

## **1.1 Entwicklung der Hand in der Embryogenese**

Um die Grundzüge der Erkrankung Polydaktylie verstehen zu können, ist es essenziell die folgenden Abschnitte der physiologischen fetalen Entwicklung der Hand betrachtet zu haben.

### **Die makroskopische Entstehung**

Spricht man von der Entwicklung des Kindes im Mutterleib, so muss die fetale Entstehung in drei Perioden untergliedert werden. Im Zeitraum der ersten beiden Wochen nach der Befruchtung spricht man von der zellulären Phase, in welcher die Nidation geschieht. Darauf folgt die embryonale Phase bis zur achten Woche, welche schließlich zu Beginn des dritten Monats in die fetale Phase übergeht (1).

Die Entwicklung der oberen Extremität beginnt in der embryonalen Phase mit Ausbildung der Extremitätenknospen ungefähr in der fünften Schwangerschaftswoche. Sie bilden sich als laterale Ausstülpungen in der Rumpffregion aus der Somatopleura aus. An der Spitze der Extremitätenknospen liegt als Epithelverdickung die apikale epidermale Randleiste (AER), welche beim Längenwachstum der Extremität eine führende Rolle spielt (1).

Von diesen Extremitätenknospen schnüren sich im Verlauf Handplatten ab, welche sich jeweils in fünf Segmente teilen. Bereits in der sechsten Schwangerschaftswoche beginnt die Ausbildung der Knochenkerne anstelle deren knorpeligen Vorläufer. Im Zeitraum zwischen der sechsten und achten Woche entwickeln sich beginnend von Schultergürtel bis zu den Fingern die Grundzüge der Gelenkhöhlen mit Bändern sowie Muskeln, welche noch weitere Entwicklungsschritte durchlaufen, was in dieser Arbeit nicht ausführlicher beschrieben werden soll (1,2).

Die fetale Entwicklung der Hand kann ebenfalls in drei Phasen eingeteilt werden und geschieht zum größten Teil zwischen der sechsten und vierzehnten Entwicklungswoche (1). In der ersten Phase (Woche sechs bis zehn) bildet sich die äußere Form der Hand. Zunächst liegt diese als ein asymmetrischer Entwicklungszwischenschritt vor und entwickelt sich im Laufe weiter zur menschlichen Hand mit vier Fingern in einer Ebene und einem aus dieser Ebene

rotierten Daumen. In den weiteren beiden Phasen entstehen die Hautfalten und -leisten (1).

Die Ausbildung der einzelnen und freibeweglichen Finger findet auf zellulärer Ebene statt. So bilden sich durch Apoptose sowie einen Lysozym-medierten Zelltod die getrennten Finger. Das Gewebe, das zwischen den nun getrennten Fingern lag, geht physiologisch zugrunde und wird durch Phagozytose abtransportiert (1).

### **Die biochemische Entstehung (1,3)**

Auf biochemischer Ebene spricht man von drei Achsen der Handentwicklung:

- die *proximodistale* Achse – für das Längenwachstum der Extremität verantwortlich
- die *anteroposteriore* Achse – für die präaxiale und postaxiale (auch genannt ulnare und radiale) Orientierung verantwortlich
- die *dorsoventrale* Achse – für die dorsale und palmare (Handrücken und Handfläche) Orientierung verantwortlich

Die sogenannte „zone of polarizing activity“ vermittelt die anteroposteriore Achse und das Sonic hedgehog Protein (Shh) wird synthetisiert. Die prä- und postaxiale Seite der Hand werden entwickelt; es ist die erste Achse, welche abläuft.

Die Funktion der dorsoventralen Achse ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht gut erforscht. Produziert wird ein Protein, welches den Namen „wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member 7a“ (Wnt-7a) trägt. Dieses veranlasst die Transkription des „LIM homeobox transcription factor“ (Lmx1), welcher in gewisser Weise für die Ausbildung des Handrückens (dorsale Handseite) wichtig ist. Ist dieser Prozess abgeschlossen, beginnt an der Handfläche (ventrale Handseite) ein negativer Feedbackmechanismus: Der Transkriptionsfaktor engrailed-1 (En-1) inhibiert die Expression von Wnt-7a. Im Zuge dieser Mechanismen bilden sich die dorsalen und palmaren Anteile der Hand aus.

Die proximodistale Achse ist die letzte der drei Achsen, die ausgeführt wird. Diese Achse wird durch die AER, welche verschiedene Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) sezerniert, geführt. FGFs wiederum lassen die Extremitätenknospen durch Proliferation der Fibroblasten ausdifferenzieren, wodurch das Längenwachstum der Extremität gefördert wird (1).

Shh und FGFs spielen eine wichtige Rolle hinsichtlich der Kommunikation zwischen den Zellen in der Entwicklung der Hand. Diese Faktoren bestimmen über Proliferation und Differenzierung benachbarter Zellen und Zellgruppen innerhalb der sich entwickelnden Gliedmaßen. Ebenfalls bewirken sie die Bildung neuer DNA und somit neuer Gene, indem sie durch Signaltransduktion strukturelle und funktionelle Veränderungen im Zellverhalten auslösen und Transkriptionsfaktoren in den Zellkern wandern (1,3).

Eine weitere zentrale Funktion nehmen die drei *Gli*-Gene *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* ein. Die Proteine dieser Gene spielen in ihrer Funktion eng mit Shh zusammen. So ist es den Zellen möglich, ihre intrazelluläre Shh-Konzentration aufgrund der *Gli*-Proteine zu messen. *Gli*-Proteine in ihrer vollen Länge entstehen durch das Vorhandensein von Shh. Fehlt die Signalübertragung durch Shh, so werden nicht die vollständigen langkettigen *Gli*-Proteine, sondern lediglich kurzgekettete sezerniert. In Mausmodellen konnte festgestellt werden, ist *Gli3* funktionell inaktiv, wird Shh in der anterioren Ebene gebildet und überzählige Finger derselben Art in dieser Ebene entstehen: man spricht von präaxialer Polydaktylie. Eine funktionelle Inaktivität der Gene *Gli1* und *Gli2* hat keine derart gravierenden Auswirkungen. Auch dem Transkriptionsfaktor *5'Hoxa/d* wird eine Funktion in der Entwicklung der Hand zugeschrieben. Restlos ist die Entwicklung der Hand jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht verstanden (3).

## **1.2 Polydaktylie der Hand**

Der Begriff „polydactyly“ geht ins 17. Jahrhundert auf einen niederländischen Physiker namens Theodor Kerckring zurück (4). Der Begriff beschreibt das Auftreten zusätzlicher rudimentär ausgebildeter bis hin zu vollständig entwickelten Fingern oder Daumen und/oder Zehen. Das Krankheitsbild ist ein äußerst heterogenes (4). Polydaktylie ist die häufigste erblich bedingte Handfehlbildung (5). Dem österreichischen Jahrbuch der Gesundheitsstatistik ist zu entnehmen, dass Polydaktylie im Jahr 2013 in Österreich mit einer Inzidenz von einem Neugeborenen auf 6100 Lebendgeborene aufgetreten ist (6). Studien zufolge sind Männer häufiger betroffen als Frauen (7)(8).

Unbehandelt kann eine Polydaktylie eine Einschränkung in der Funktionsfähigkeit der Hand hinsichtlich der alltäglich benötigten Greiffunktion darstellen. Daneben

kann das Auftreten überzähliger Finger ein kosmetisches Problem darstellen. In den folgenden Abschnitten werden Formen, Vererbung sowie Behandlungsmöglichkeiten der Polydaktylie beschrieben.

### **1.2.1 Formen und Vererbung der Polydaktylie**

Polydaktylie kann im Rahmen von Syndromen auftreten, in der Mehrheit der Fälle präsentiert sich jedoch eine nicht-syndromale (isolierte) Form der Polydaktylie (5,7). Neben der Unterscheidung zwischen syndromal und nicht-syndromal kann Polydaktylie in eine präaxiale, postaxiale oder zentrale Form eingeteilt werden (5).

#### **Zentrale Polydaktylie**

Die Charakteristika der zentralen Polydaktylie sind das Auftreten zusätzlicher Finger im Bereich des Zeigefingers, Mittelfingers und Ringfingers sowie der radialen Seite des kleinen Fingers. Diese Form der Polydaktylie tritt am seltensten in Erscheinung (5).

#### **Präaxiale Polydaktylie**

Liegt präaxiale Polydaktylie vor, die synonyme Bezeichnung ist radiale Polydaktylie, beschreibt dies das Vorhandensein eines doppelt angelegten Daumenendglieds ab der Phalanx distalis oder ab der Phalanx proximalis bis hin zu einem vollständig ausgebildeten zusätzlichen Daumen ab dem Os metacarpale. Ebenso kann neben dem anatomisch physiologisch angelegten Daumen ein triphalangealer zweiter Finger entwickelt sein (5). Die Inzidenz der präaxialen Polydaktylie beträgt 0,08 bis 1,4 pro 1000 Lebendgeburten und ist verglichen zur postaxialen Polydaktylie um ein Vielfaches geringer (5,9).

#### **Postaxiale Polydaktylie**

Spricht man von postaxialer Polydaktylie, auch bezeichnet als ulnare Polydaktylie, liegen zusätzliche Finger oder rudimentär angelegte Fingerglieder an der ulnaren Handkante vor. Diese ist die am häufigsten auftretende Form der Polydaktylie. Die Ausprägung der Fehlbildung ist sehr variabel und kann von einem kleinen Hautknubbel bis hin zu einem vollständig angelegten zusätzlichen Finger samt

Gelenken mit Bändern und Muskeln, sowie Nerven und einem Fingernagel reichen (5).

Verschiedene Systeme zur Einteilung der postaxialen Polydaktylie sind bekannt; in dieser Arbeit wird das von Temtamy und McKusick zur Beschreibung des Phänotyps in den Familien herangezogen. Temtamy und McKusick schafften 1966 die Unterteilung der postaxialen Polydaktylie in Typ A und Typ B (10). Typ A bezeichnet einen gut ausgebildeten und funktionsfähigen Finger. Eine knöcherne Verbindung zur übrigen Hand ist nachweisbar. Typ B beschreibt einen rudimentär angelegten, nicht funktionsfähigen zusätzlichen Finger ohne knöcherne Verbindung zur übrigen Hand (5).

Garet C. Comer und Kolleg\*innen beschrieben 2018 in deren Review „Polydactyly of the hand“, dass Polydaktylie Typ B in unterschiedlichen Populationen mit unterschiedlichen Inzidenzen auftritt. So ist 1 Kind von 100 bis 300 Lebendgeburten unter Kindern in einer afrikanischen Population betroffen, der Phänotyp ist meist autosomal dominant vererbt, wohingegen die Inzidenz in einer weißen Population auf 1 betroffenes Kind von 1500 bis 3000 Kinder sinkt und der Phänotyp meist durch eine Spontanmutation begründet ist (5).

Erblich bedingte Formen der Polydaktylie tritt in den meisten Fällen symmetrisch auf, spontan auftretende Formen meist nur einseitig (8).

### **1.3 Aktueller Forschungsstand betreffend „isolierte, postaxiale Polydaktylie“ in der Genetik**

Der nachstehend angeführten Tabelle sind die zum aktuellen Zeitpunkt beschriebenen Gene zu entnehmen, welche bereits mit isolierter, postaxialer Polydaktylie in Zusammenhang gebracht wurden.

*Tabelle 1: Gene, in welchen bereits für isolierte, postaxiale Polydaktylie kausale Varianten beschrieben wurden. Mit „?“ markiert, bedeutet, dass der Forschungsstand unklar ist.*

Gen	Chr.	Vererbung (omim.org)	syndromal	nicht-syndromal	Phänotyp
ZNF141 (11)	4	AR		X	postaxial, A6
GLI3 (12)(13)	7	AD	X	X	präaxial, T IV/postaxial, A1, B
MIPOL1 (14)	14	AD?		X	postaxial/MIP
IQCE (15)	7	AR		X	postaxial, A7
PITX1 (16)	5	AD	X		präaxial/postaxial/MIP
GLI1 (13)	12	AR	möglich	X	präaxial T I/postaxial, A8
FAM92A (17)	8	AR		X	postaxial, A9

KIAA0825 (18)	5	AR		X	postaxial, A10
PAPA1 (17)	7	AD		X	postaxial, A
PAPA2 (19)	13	AD		X	postaxial, A2
PAPA3 (20)	19	AD		X	postaxial, A3
PAPA4 (21)	7	AD		X	postaxial, A4
PAPA5 (17)	13	AR		X	postaxial, A5

### **1.4 Behandlung der isolierten Polydaktylie**

Das Ziel der Behandlung einer Handfehlbildung besteht darin, dem\*der Betroffenen die bestmögliche Funktion der Extremität zu gewähren. Zudem ist auch ein optisch ansprechendes Ergebnis erwünscht (22).

#### **Anamnese und klinische Untersuchung**

Den ersten Schritt jeder Behandlung stellen Anamnese und klinische Untersuchung des\*der betroffenen Patient\*in dar. Bereits in den ersten Lebensmonaten eines betroffenen Kindes soll so der Ausschluss einer syndromalen Erkrankung und der Bestätigung einer isolierten Polydaktylie begonnen werden. Im Rahmen eines Syndroms treten neben der Polydaktylie weitere Symptome wie beispielsweise Gesichts- und Kopfveränderungen oder Skelettdeformitäten wie bei dem Short Rib-Polydaktylie Syndrom auf. Bei isolierter Polydaktylie treten neben der Polydaktylie keine weiteren Symptome auf (23). Klinisch wird auf Funktions- und Bewegungseinschränkungen wie eine beeinträchtigte Greiffunktion geachtet. Zusätzlich werden Röntgenaufnahmen der Extremitäten angefertigt, um das Ausmaß der Fehlbildung auf knöcherner Ebene hinsichtlich der Einteilung in Typ A oder Typ B beurteilen zu können (22).

#### **Invasive Behandlungsmöglichkeiten**

Die chirurgische Behandlung ist abhängig von der vorliegenden Form der Polydaktylie.

Bei präaxialer Polydaktylie kann die chirurgische Versorgung der Fehlbildung komplex sein. Dies begründet sich dadurch, dass der Daumen grundlegend wichtig für die Greiffunktion ist. Bei Entfernung eines zweiten Daumens muss somit mit höchster Sorgfalt auf alle umliegenden Strukturen, Knochen, Gelenke, Bänder, Muskeln, Sehnen und Nerven, geachtet werden (24). In vielen Fällen müssen für

ein zufriedenstellendes Ergebnis rekonstruktive Methoden angewendet werden, da kein anatomisch physiologischer Daumen angelegt ist (5),(24).

Bei postaxialer Polydaktylie ist die chirurgische Vorgehensweise simpler. Da in vielen Fällen kein vollständiger Finger entwickelt ist, kann der Hautvorsprung mittels einer Ligatur abgebunden werden. Handelt es sich um einen vollständig entwickelten Finger, wird dieser chirurgisch entfernt (5),(24).

Liegt eine zentrale Form der Polydaktylie vor, kann die operative Versorgung sehr anspruchsvoll sein (5).

Die chirurgische Vorgehensweise ist nicht in jedem Fall einer Polydaktylie nach demselben Schema durchführbar, da sich die Fehlbildungen oftmals stark unterscheiden und eine individuelle Lösung gefunden werden muss (22). In diesen Fällen sind lediglich wenige grundlegende Richtlinien als Hilfestellung vorhanden. Dies ist vor allem bei Vorliegen einer zentralen Form der Polydaktylie geltend (5).

### ***1.5 Konsanguinität und das damit einhergehende erhöhte Risiko autosomal rezessiv vererbter Erkrankungen***

Unter Konsanguinität versteht man die Eheliche, Heirat oder sexuelle Beziehung zwischen Personen, welche auf dieselben Vorfahren zurücklaufen und mindestens Cousins\*Cousinen zweiten Grades sind (25). Während in westlichen Ländern innerfamiliäre Beziehungen mit einem Vorkommen von weniger als einem Prozent kaum vorhanden sind, gehören diese in Nordafrika, West-, Zentral- und Südasien mit einem Vorkommen von bis zu 50% aller Heiraten zur Normalität (26).

Als Konsequenz der Konsanguinität besteht in erster Linie das erhöhte Risiko des Auftretens bestimmter Erbkrankungen. Dies lässt sich durch den geringeren genetischen Pool aufgrund der innerfamiliären Eheschließung begründen (26). Zwei Allele, welche dieselbe autosomal rezessiv vererbte Variante tragen, treffen bei sexueller Vereinigung zweier Personen, die auf dieselben Vorfahr\*innen zurückgehen, mit höherer Wahrscheinlichkeit zusammen (27).

Die Frage, weshalb die Rate an innerfamiliären Eheschließungen in einigen Regionen weltweit trotz enormer gesundheitlicher Risiken derart hoch ist, lässt sich auf soziokulturelle Gründe zurückführen. Die Religion spielt wie seit Jahrtausenden in der Menschheitsgeschichte eine wichtige Rolle. Im Islam ließ der Prophet Mohammed seine Tochter an seinen Cousin Ali verheiraten. Die innerfamiliäre

Heirat kann in muslimischen Ländern unter anderem dadurch als normale Option angesehen werden (26). Der soziale Aspekt beinhaltet den Gedanken, dass die eigene Familie durch innerfamiliäre Verbindungen gestärkt würde – in gesundheitlicher sowie finanzieller Hinsicht. In Kulturen, in denen Brautpreis und Brautgabe üblich sind, wirkt der finanzielle Aspekt noch stärker in die Entscheidung mit ein. Innerfamiliäre Hochzeiten reduzieren diese Kosten drastisch (26,28,29).

Die Hypothese dieser Arbeit basiert auf dem Verdacht einer autosomal rezessiven Vererbung des auftretenden Phänotyps in beiden Familien. Unter autosomal rezessiver Vererbung versteht man, dass für die Manifestation eines Phänotyps das Auftreten einer Variante auf beiden Allelen notwendig ist - die Variante muss homozygot vorliegen. Läge dieselbe Variante heterozygot, somit nur auf einem Allel vorhanden, vor, würde ein autosomal rezessiv vererbter Phänotyp nicht in Erscheinung treten (26,27). Dieses heterozygot betroffene Individuum wäre Überträger\*in der Variante und der Erkrankung.

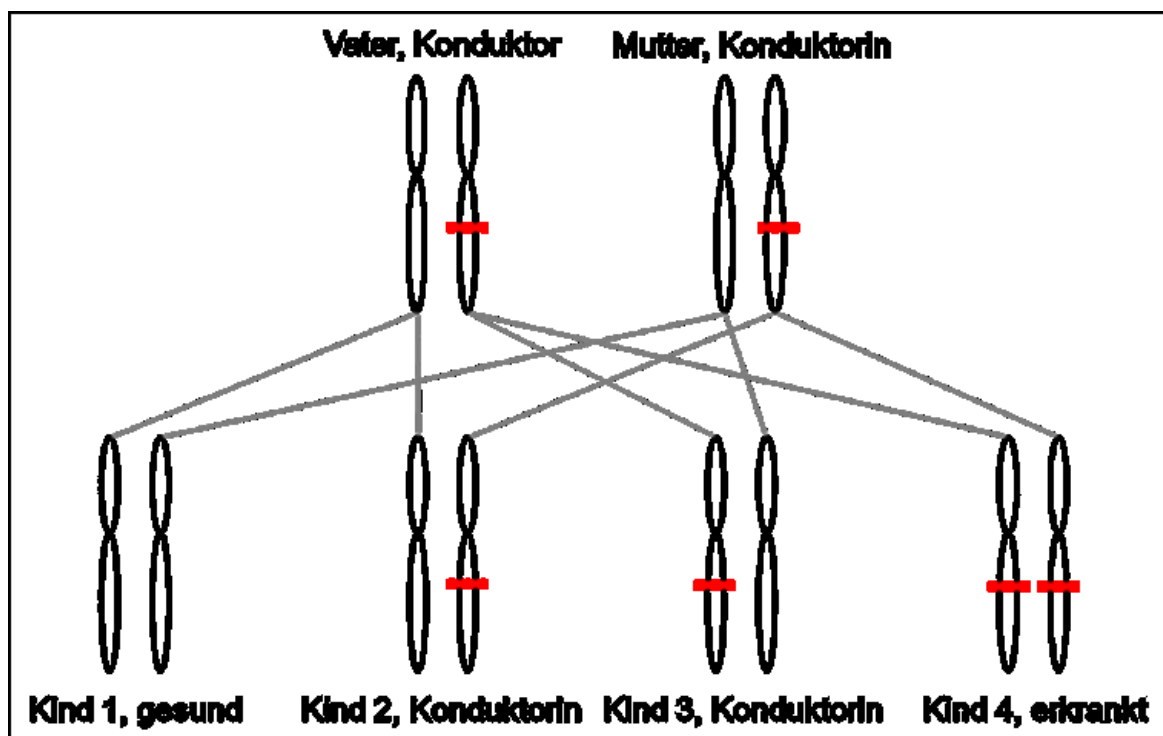


Abbildung 1: Autosomal rezessiver Erbgang (beide Elternteile tragen Variante heterozygot):  $p(\text{erkrankt})$ : 25%.  $p(\text{ÜberträgerIn})$ : 50%.  $p(\text{gesund})$ : 25% (in beiden Allelen liegt Wildtyp vor) (27).

In dieser Arbeit kann die autosomal rezessive Vererbung des Phänotyps aufgrund der Konsanguinität der Eltern der Betroffenen angenommen werden. Es müssen im Erbgut zwei betroffene Allele für die Merkmalsausprägung vorliegend sein. Dies ist

nur möglich, wenn beide Elternteile dieselbe autosomal rezessiv vererbte Variante tragen (27). Sind beide Elternteile Anlageträger\*innen, so liegt das Erkrankungsrisiko bei den Nachkommen bei 25%, 50% der Kinder sind wie die Eltern Anlageträger\*innen und bei 25% sind homozygot für das Wildtyp-Allel (siehe Abbildung 1) (27).

## **1.6 SNP-Array, CNV-Analyse und Homozygotiekartierung**

Ein *single nucleotide polymorphism* (SNP) bezeichnet eine singuläre Basenveränderung in der DNA eines Individuums im Vergleich zum Referenzgenom, welche in mindestens einem Prozent der Bevölkerung vorhanden ist (30). Es handelt sich um die häufigste Art der DNA-Veränderung, um eine Normvariante in der DNA eines Individuums. In seltenen Fällen können diese krankheitsbegründend sein, jedoch beeinflussen sie das Risiko oder den Schweregrad einiger Erkrankungen. SNPs liegen sowohl in kodierenden als auch in nicht kodierenden Regionen der DNA vor (31).

Als *copy number variation* (CNV) wird eine chromosomale Veränderung von mindestens 1000 Basen im Erbgut eines Individuums verglichen mit der Referenz bezeichnet (32). In der Norm liegen Gene in zwei Kopien vor, eine Kopie vererbt von der Mutter und eine Kopie vererbt vom Vater. Liegt nun eine CNV vor, ist das betroffene Gen nur ein Mal (Deletion) oder öfter als zwei Mal vorhanden (Duplikation). Aufgrund des größeren Ausmaßes der genetischen Veränderung wurden als Konsequenz einer CNV bisher unter anderem Phänotypen wie Schizophrenie, Psoriasis oder Morbus Crohn beschrieben (33,34,35).

Ein *SNP-Array* ist eine Form des DNA-Microarrays. Hierbei handelt es sich um eine rasch, einfach und kostengünstig durchführbare molekulargenetische Analyseverfahren (Hybridisierung), mittels welcher das Vorhandensein bestimmter SNPs in der DNA nachgewiesen werden kann (32).

Auf der Oberfläche eines Chips befindet sich eine bestimmte Anzahl an SNPs (in Form von immobilisierten Allel-spezifischen Oligonukleotiden), welche nach Auftragen der zu analysierenden DNA auf diesen (fragmentierte, Fluoreszenz-

markierte DNA-Sequenzen) beispielsweise mittels Fluoreszenz nachgewiesen werden können (32).

SNP-Arrays nehmen eine wichtige Funktion in der Auffindung von Genloci, in welchen sich krankheitsbegründende Varianten befinden, ein. Mit den dadurch erhaltenen Daten können weitere Analysemethoden durchgeführt werden. Diese umfassen zum einen die Erstellung einer Homozygotiekartierung, welche bei Annahme einer autosomal rezessiv vererbten Variante in einer konsanguinen Familie wichtig ist (32,35).

Die *Homozygotiekartierung* (Synonym: Homozygosity Mapping) ist eine Methode, die mit unterschiedlichen Softwares durchgeführt werden kann. Als Beispiel werden hier „homozygositymapper.org“ sowie die in dieser Arbeit verwendete Software „ChAS 4.2.1“ (Illumina, San Diego, Kalifornien) genannt. Durch eine Homozygotiekartierung werden die homozygoten Regionen in der DNA eines Individuums dargestellt. Ebenfalls können dieselben, in den DNAs mehrerer Individuen vorhandenen (überlappenden), homozygoten Regionen dargestellt werden. Die Homozygotiekartierung gibt in weiterer Folge Auskunft darüber in welchen Regionen des Erbguts nach krankheitsbegründenden Varianten gesucht werden muss (35,36).

Zum anderen ist es möglich mit den Daten des SNP-Arrays eine *CNV-Analyse* durchzuführen. Die CNV-Analyse ist auch mit Daten eines Whole Exome Sequencings erstellbar. Chromosomale Insertionen, Deletionen und Duplikationen werden detektiert (33,34).

### **1.7 Whole Exome Sequencing (WES)**

Die Gesamtheit aller kodierenden Bereiche (Exone) des Genoms wird als Exom bezeichnet. Im Zuge einer WES erhält man somit alle Varianten (pro Exom ungefähr 20.000 bis 50.000), die im Exom enthalten sind. Diese molekulargenetische Analysemethoden dient der Auffindung pathogener, wenige Basenpaare große Varianten verglichen mit dem Referenzgenom sowie single nucleotide variants. Nur mittels WES ohne weiterfolgende Analysen ist es nicht möglich Veränderungen in der Größenordnung ganzer Gene festzustellen. Zur Mutationsdetektion ist das im Obigen beschriebene SNP-Array als Methode der Wahl anzusehen (36)(37).

Nach Erhalt der Rohdaten einer WES in Form eines VCF-files sind primär einige Filterschritte durchzuführen. Diese umfassen das Einstellen der Qualitätskriterien sowie das Herausfiltern von Intronvarianten und synonymous coding variants aus dem Datensatz (36). Durch das Einstellen der Qualitätskriterien wird eine Variante aus dem Datensatz gefiltert, wenn sie nur in vereinzelt Reads vorliegt. Diese gefilterten Varianten sind lediglich Sequenzierartefakte. Im weiteren Verlauf sind die Filtereinstellungen je nach erwarteten Eigenschaften der Variante zu setzen. Diese umfassen Chromosom, Vererbungsmodus, Allelfrequenzen, Konsequenz der Variante sowie vorhandene Informationen bezüglich der vorhandenen Varianten aus Datenbanken (Quelle: persönliche Korrespondenz Jasmin Blatterer).

Die Aussagekraft der WES ist begrenzt. Da eine WES nur die kodierenden Bereiche des Erbguts erfasst, bleiben Varianten, die in den nicht-kodierenden liegen, größtenteils unentdeckt. Ebenfalls können nur singuläre Basenveränderungen detektiert werden (36–38).

## **1.8 Ziel dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation der kausalen Varianten, die dem vererbten Phänotyp in den Familien PD1 und PD2 zugrunde liegt.

### **Hypothesen**

Die Variante befindet sich aufgrund der Konsanguinität der Familie in einem homozygoten Bereich. Ein überlappender Homozygotie-Bereich muss bei allen Betroffenen einer Familie vorhanden sein und darf bei Nicht-Betroffenen nicht vorliegen.

Eine potenziell kausale Variante muss in der Segregationsanalyse entsprechend der phänotypischen Ausprägung innerhalb der Familie segregieren.

Eine Möglichkeit ist, dass die vererbte kausale Variante bereits beschrieben wurde und im Rahmen dieser Arbeit rasch identifiziert werden kann.

Eine weitere Möglichkeit ist die Identifikation einer bisher unbeschriebenen Variante in einem Genlocus, welcher bereits mit Polydaktylie in Zusammenhang beschrieben wurde. Eine kausale Variante kann auch in einem bisher nicht in Zusammenhang mit Polydaktylie beschriebenen Genlocus detektiert werden. In diesen Fällen erweiterte sich das Spektrum bekannter Mutationen und/oder Genloci, wodurch die künftige molekulargenetische Diagnostik isolierter, postaxialer Polydaktylie rascher ablaufen könnte.

Die Identifikation einer bisher unbekanntem Variante kann erwartet werden, da für isolierte, postaxiale Polydaktylie nur wenige kausale Varianten beschrieben sind und wenig Forschung in diesem Bereich stattfindet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Familie PD1 und PD2 sind in Pakistan lebende Familien mit Polydaktylie. In Zusammenarbeit mit Dr. Muzammil Khan (Gomal University Dera Ismail Khan, Gomal Centre of Biochemistry and Biotechnology, Pakistan) erhielten wir die in Pakistan aufgereinigten DNA-Proben der Familienangehörigen. Das Ethikvotum (Nummer 03/ERB/GU datiert mit 27.09.2018) sowie Einverständniserklärungen für die Verwendung der Daten und Fotos der Familien lagen bereits vor. Die in den Kapiteln 2.1.1 und 2.1.2 beschriebenen Informationen und Fotos stammen von Dr. Muzammil Khan und dessen Mitarbeiter\*innen.

#### 2.1.1 Familie „PD1“

In dieser Familie wird ein Phänotyp der Polydaktylie vererbt. Anhand folgender Bilder ist die Form der angeborenen Handfehlbildung charakterisierbar.



Abbildung 2: Foto der Hand des Betroffenen „PD1-1“. An der ulnaren Handseite ein rudimentärer Finger.



Abbildung 3: Foto der Hand der Betroffenen „PD1-4“. An der ulnaren Handseite ein rudimentärer Finger.

An der ulnaren Handseite besteht ein rudimentär angelegter Finger mit Fingernagel. Röntgenbilder der betroffenen Extremitäten stehen nicht zur Verfügung, daher kann nicht ausreichend beurteilt werden, ob eine knöcherne Verbindung zwischen dem zusätzlichen Finger und der übrigen Hand besteht. Der vorliegende Phänotyp entspricht einer postaxialen Polydaktylie. Da neben der Polydaktylie keine weitere Skelettdeformität und auch keine andere körperliche oder kognitive Beeinträchtigung besteht, liegt eine isolierte, postaxiale Polydaktylie vor. Aufgrund fehlender Röntgenbilder der Hände ist eine Unterscheidung in Polydaktylie Typ A oder B nicht möglich.

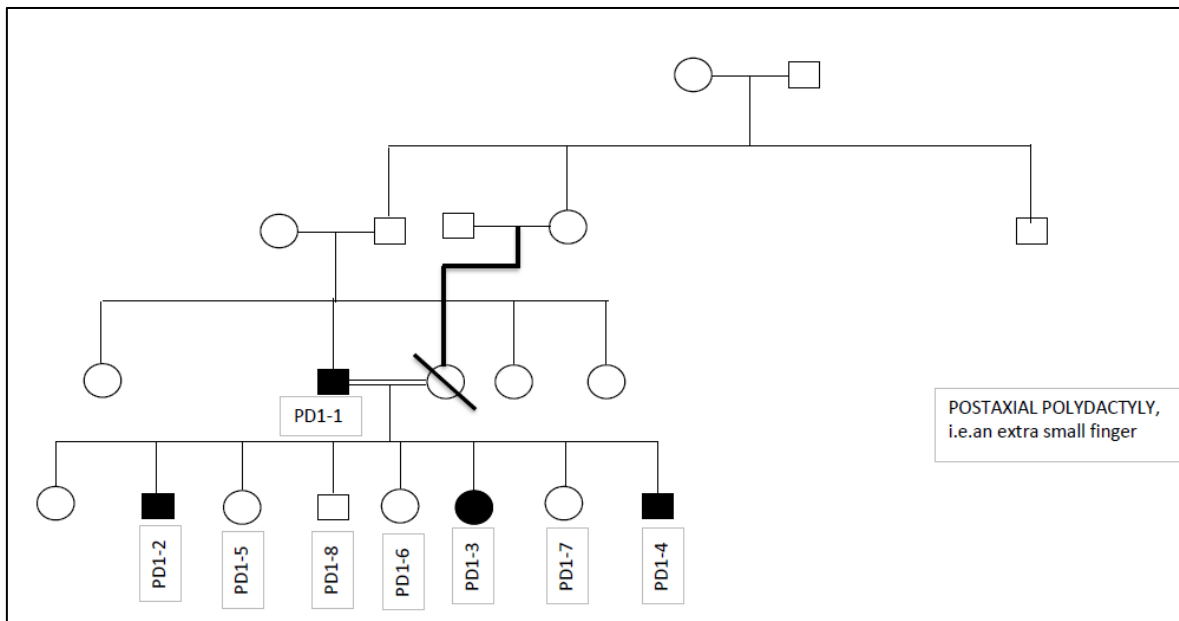


Abbildung 4: Stammbaum der Familie „PD1“. ■ = männlich, erkrankt, am Leben, □ = männlich, gesund, am Leben, ● = weiblich, erkrankt, am Leben, ○ = weiblich, gesund, am Leben. Ist das jeweilige Symbol mit einem Querstrich gekennzeichnet, ist die Person verstorben.

Wie dem Stammbaum zu entnehmen, tragen drei männliche und ein weibliches Familienmitglied Merkmale einer isolierten Polydaktylie. Für die Analysen stehen DNA-Proben von acht Individuen zu Verfügung. Diese sind im Stammbaum mit den Bezeichnungen PD1-1 bis PD1-8 bezeichnet.

Der Vater der drei Kinder mit Polydaktylie ist ebenfalls Merkmalsträger. Daher muss die Arbeitshypothese neben der Annahme einer autosomal rezessiv vererbten Variante um die Möglichkeit des Vorliegens einer autosomal dominant vererbten Variante erweitert werden.

### 2.1.2 Familie „PD2“

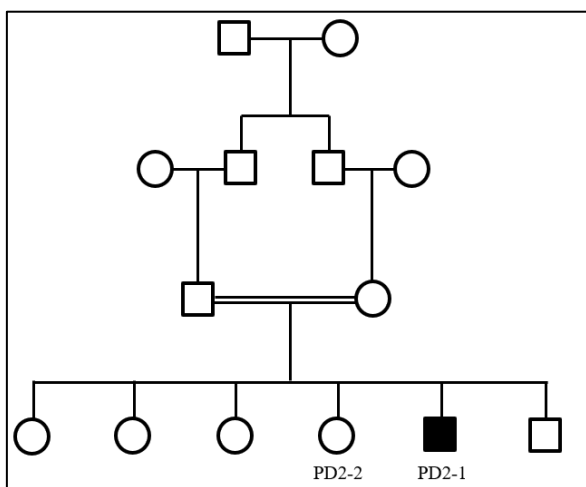


Abbildung 5: Stammbaum der Familie „PD2“.

Wie dem Stammbaum zu entnehmen, ist ein männliches Familienmitglied Merkmalsträger einer Polydaktylie. Von diesem sowie einer phänotypisch unauffälligen Schwester liegen DNA-Proben vor. Der Merkmalsträger entstammt mit Sicherheit einer konsanguinen Verbindung, weshalb von einer autosomal rezessiven Vererbung ausgegangen werden kann.

Fotos der Handfehlbildungen des Individuums PD2-1 stehen nicht zur Verfügung. Dr. Muzammil Khan übergibt das Vorliegen einer isolierte, postaxiale Polydaktylie Typ B.

Zum Zeitpunkt des Erhalts der Dokumente und DNAs der beiden Familien lag das genehmigte Ethikvotum (Nummer: 03/ERB/GU datiert mit 27.09.2018) des Institutional Ethical Review Boards des Gomal Center of Biochemistry an Biotechnology, Gomal University, D.I.Khan, Pakistan bereits vor. Für die

Durchführung der Studie wurde vorab die schriftliche Zustimmung nach einer entsprechenden Aufklärung über Blutabnahmen, klinischen sowie molekularen Untersuchungen sowie der Veröffentlichung anonymisierter Daten und Fotos, eingeholt.

Grundlage der weiteren Analysen stellten Daten einer Whole Exome Sequenzierung (WES) der Individuen PD1-4 sowie PD2-1, SNP-Array Daten der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4 sowie Mikrosatellitenmarker-Analysen aller Individuen der Familie PD1 mit den Markern D7S510 und D7S519 im Gen *GLI3*. Die WES wurde in Südkorea bei MacroGen durchgeführt. Der SNP-Array wurde mittels GSA-Chips bei Life an Brain GmbH, Bonn, Deutschland durchgeführt. Die Mikrosatellitenmarker-Analysen wurden in Gomal Center of Biochemistry an Biotechnology, Gomal University, D.I.Khan, Pakistan durchgeführt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop™**

Die bereits aufgereinigten DNA-Proben wurden direkt aus Pakistan übermittelt.

Nach Erhalt mussten die DNA-Konzentrationen bestimmt werden. Der DNA-Gehalt einer Probe dient als Grundinformation für jegliche nachfolgende Analysen.

Die Bestimmung erfolgte mittels des Geräts NanoDrop 2000c. Hierbei handelt es sich um ein Spektrophotometer, welches den DNA-Gehalt sowie auch RNA-Konzentrationen und weitere Biomoleküle aus einem Probenvolumen von 0,5 bis 2µl bestimmen kann. Das Gerät besteht aus einer oberen und einer unteren Messoberfläche. Direkt auf die untere Oberfläche wird die zu bestimmende Probe pipettiert, der Tropfen wird durch die Oberflächenspannung am Platz gehalten. Der Oberteil wird geschlossen und die Konzentration kann mittels Mausklick bestimmt werden (39).

Der Ablauf der Messung verlief für alle zu bestimmenden Proben nach demselben Schema ab.

1. A280 im Hauptmenü auswählen (es wird mit einer Absorption von 280nm gemessen)
2. Sample-Typ in der Liste auswählen
3. Einheit auswählen

### **„Blanken“ des Geräts**

1. 2µl Puffer luftblasenfrei auf die untere Messoberfläche pipettieren
2. Oberteil vorsichtig schließen
3. „Blank“ klicken
4. Oberteil öffnen und Puffer von den Messoberflächen trocknen

### **Probenvermessung**

Cave: Vorab muss die zu vermessende Probe auf Raumtemperatur gebracht, gut gelöst und luftblasenfrei sein.

1. Sample-ID im Programm eintragen
2. 2µl Probe luftblasenfrei auf die untere Messoberfläche pipettieren
3. „Measure“ klicken
4. Oberteil öffnen und Messoberflächen trocknen
5. Wert am PC ablesen

## 2.2.2 Auswertung der WES-Daten

### 2.2.2.1 Datenfilterung mittels „Variant Studio 3.0“ (Illumina) und „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®)

Die in Südorea von MacroGen durchgeführte WES der DNAs der Individuen PD1-4 sowie PD2-1 lieferte die Rohdaten für die Datenfilterung am Diagnostik- & Forschungsinstitut für Humangenetik in Graz.

#### 1. und 2. Filterung mit „Variant Studio 3.0“ (Illumina)

Die Filtereinstellungen für die ersten Datenfilterungen der WES-Daten mit dem Programm „Variant Studio 3.0“ (Illumina) resultierten aus den zur Polydaktylie sowie der Familie bekannten Informationen bezüglich Vererbungsmuster, Häufigkeit der Erkrankung in der Allgemeinbevölkerung sowie erwartete Art beziehungsweise Konsequenz der Mutation. Diese können nachfolgenden Tabellen entnommen werden.

*Tabelle 2: Filtereinstellungen zur Auswertung der WES-Daten des Individuums PD1-4 mit „Variant Studio 3.0“ (Illumina).*

	PD1-4	PD1-4
<b>General</b>	heterozygot, autosomal	homozygot, autosomal
<b>Variant</b>	-	-
<b>Gene</b>	-	-
<b>Consequence</b>	missense, frameshift, stop gained, stop lost, initiator codon, in-frame insertion, in-frame deletion, splice	missense, frameshift, stop gained, stop lost, initiator codon, in-frame insertion, in-frame deletion, splice
<b>Population frequency</b>	Exac global <0,01% Exac S.Asian Pop Freq <0,01%	Exac global <0,001% - 1% Exac S.Asian Pop Freq <0,001% - 1%
<b>Cross sample subtraction</b>	-	-
<b>Custom</b>	-	-
<b>Classification</b>	Presumed Pathogenic, Pathogenic, Unknown Significance	Presumed Pathogenic, Pathogenic, Unknown Significance

*Tabelle 3: Filtereinstellungen zur Auswertung der WES-Daten des Individuums PD2-1 mit „Variant Studio 3.0“ (Illumina).*

	PD2-1	PD2-1
<b>General</b>	heterozygot, autosomal	homozygot, autosomal
<b>Variant</b>	-	-
<b>Gene</b>	-	-

<b>Consequence</b>	missense, frameshift, stop gained, stop lost, initiator codon, in-frame insertion, in-frame deletion, splice	missense, frameshift, stop gained, stop lost, initiator codon, in-frame insertion, in-frame deletion, splice
<b>Population frequency</b>	Exac global <0,01% Exac S.Asian Pop Freq <0,01%	Exac global <0,001% - 1% Exac S.Asian Pop Freq <0,001% - 1%
<b>Cross sample subtraction</b>	-	-
<b>Custom</b>	-	-
<b>Classification</b>	Presumed Pathogenic, Pathogenic, Unknown Significance	Presumed Pathogenic, Pathogenic, Unknown Significance

### 1. und 2. Filterung mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®)

Eine im Anschluss durchgeführte Filterung der WES-Datensätze der Individuen PD1-4 sowie PD2-1 wurde in Zusammenarbeit mit Jasmin Blatterer, D&F Institut für Humangenetik, Graz, durchgeführt. Das verwendete Programm ist „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®, Bozeman, MT 59715, USA). Die Filterkriterien wurden nach denselben Kriterien wie im Obigen beschrieben gewählt.

Für die Auswertung der Daten der Individuen PD1-4 sowie PD2-1 wurden die Daten weiterer Proben desselben WES-Laufs als Qualitätskontrollen im Programm verwendet. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Auswertungen wurden die Daten der Individuen SK6 sowie MR herangezogen. Weiters wurden institutsinterne und der Software zugehörige Artefakt-Filter angewendet. Diese Artefakt-Filter beinhalten Daten von rund 700 Samples zum Qualitätsabgleich. Durch die Anwendung von Artefakt-Filtern können in der DNA tatsächlich vorhandene Varianten von Sequenzier-Artefakten unterschieden werden.

Die im Zuge der ersten beiden Filterungen detektierten Varianten wurden unter Hinzuziehen sich ergänzender Datenbanken auf Zusammenhang mit den in den Familien PD1 und PD2 vererbten Formen der Polydaktylie überprüft. Die verwendeten Datenbanken können dem Datenbankenverzeichnis entnommen werden.

### 3. Filterung mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®)

Aufgrund mangelnder Ergebnisse der ersten beiden Filterungen wurde eine dritte Datenfilterung mit einer aktuelleren Version des Programms „VarSeq 2.2.1“ in

Zusammenarbeit mit Jasmin Blatterer durchgeführt. Angewendet wurden dieselben Filterkriterien jedoch aktuellere Artefakt-Kataloge. Die Filterkriterien können nachfolgenden Tabellen entnommen werden.

Tabelle 4: Filtereinstellungen zur Auswertung der WES-Daten mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®).

	PD1-4	PD2-1
<b>Vererbung</b>	Hetero-, hemi-, homozygot	Hetero-, hemi-, homozygot
<b>Datenbanken</b>	GnomAD: <5 homozygot	GnomAD: <5 homozygot
	ClinVar: nicht likely benign oder benign	ClinVar: nicht likely benign oder benign
	HGMD: damaging	HGMD: damaging
	GoldenHelix ACMG Classifier: (likely) pathogen	GoldenHelix ACMG Classifier: (likely) pathogen
	Bekannte pathogene Varianten = likely pathogen	Bekannte pathogene Varianten = likely pathogen
<b>Varianteallelfrequenz</b>	>/= 0,1	>/= 0,1

Allgemein getätigte Einstellungen umfassten folgende Eigenschaften:

Tabelle 5: Allgemeine Filtereinstellungen zur Auswertung der WES-Daten mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®).

<b>Genotyp Qualität (phred score)</b>	>/= 20
<b>Read Tiefe</b>	>/= 20
<b>Artefakt-Filter</b>	2 interne Variantendatenbanken

Ein fine filter kam zur Anwendung. Durch diesen wird nach loss of function und missense Varianten gefiltert. Intron Varianten, splice site Varianten, synonymous Varianten sowie UTR-Varianten werden nur gezeigt, wenn sie als „likely pathogen“ vorklassifiziert sind sowie einem gene rank von >/= 0,8 entsprechen.

Der gene rank bezieht sich auf den vorab definierten Phänotyp „polydactyly“ und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Ein Wert von 0,8 würde bedeuten, dass das angezeigte Gen mit dem angegebenen Phänotyp korrelieren kann. Ein Wert von 0,2 würde aussagen, dass Gen und Phänotyp eher nicht zusammenhängen.

Die resultierenden Varianten wurden unter Hinzuziehen sich ergänzender Datenbanken auf Zusammenhang mit den vererbten Formen der Polydaktylie überprüft.

### 2.2.2.2 Homozygotiekartierung

Die Erstellung einer Homozygotiekartierung ist bei konsanguinen Familien von Nutzen, da autosomal rezessiv vererbte Varianten, wie in der Einleitung beschrieben, häufiger auftreten als in nicht konsanguinen Familien (35,36).

Grundlage der Homozygotiekartierung stellen die Daten (im Datei-Format .vcf) der WES der Individuen PD1-4 und PD2-1 sowie in Familie PD1 die Daten eines SNP-Arrays dar.

Ein Homozygotiekartierung stellt die homozygoten Bereiche der analysierten DNA (der 22 Autosomen) graphisch dar.

### **Erstellung des Homozygotiekartierung aus WES-Daten mittels homozygotymapper.org (35)**

Eine Homozygotiekartierung wurde den WES-Daten von PD1-4 und PD2-1 durchgeführt. Im Anschluss folgten eine detaillierte Auswertung und Aufschlüsselung der homozygoten Bereiche der Autosome. Diese wurden mit den in der Literatur beschriebenen Genloci für autosomal rezessiv vererbte Polydaktylie (siehe Tabelle 1) auf Übereinstimmungen abgeglichen.

Aufgrund der Übereinstimmung des homozygoten Bereichs des betroffenen Individuums PD1-4 auf Chromosom 12 im genomischen Bereich 53.343.225 – 66.232.383 (hg19), in welchem sich das Gen *GLI1* befindet, wurde in den Rohdaten der WES mittels des Programms „Variant Studio 3.0“ (Illumina) gezielt nach *GLI1* gesucht.

### **Familie PD1 - Erstellung des Homozygotiekartierung mittels „ChAS 4.2.1“ (ThermoFisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA)**

Dr. Christian Windpassinger erstellte ergänzend zur Homozygotiekartierung, welche mittels homozygotymapper.org erstellt wurde, eine Homozygotiekartierung mittels des Programms „ChAS 4.2.1“ aus den Daten des in Bonn durchgeführten SNP-Arrays.

### **2.2.2.3 Familie PD2 – Validierung eines Genabschnitts mittels Sanger Sequenzierung**

Nach den Filterungen der WES-Daten des Individuums PD2-1 mittels der Software „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®) konnten zwei Kandidatenvarianten im Gen *ZNF141* gefiltert werden.

Aufgrund mangelnder weiterer möglicher Kandidatenvarianten wurde nach einer Datenbankenrecherche eine Segregationsanalyse der in *ZNF141* liegenden missense Variante NM\_003441.4:c.292C>T mittels Sanger Sequenzierung durchgeführt.

Anzumerken ist, dass in diesem Gen bisher lediglich eine für isolierte, postaxiale Polydaktylie kausale Mutation im Jahr 2012 von Kalsoom et al. beschrieben wurde (40). Seit dieser Erstbeschreibung wurde keine weitere Variante in diesem Gen als für Polydaktylie kausal beschrieben. Da in Familie PD2 lediglich ein Individuum von Polydaktylie betroffen ist und nur die DNA-Proben zweier Familienangehörigen zur Verfügung stehen, ist die Aussagekraft dieser Segregationsanalyse jedoch eingeschränkt.

### **Ablauf der Sanger Sequenzierung** (41)

1. Primer-Design mittels Primer3plus und UCSC Human Genome Browser (HGB)
2. PCR im 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)
3. Gelelektrophorese
4. Sequenzierungsreaktion im 9800 Fast Thermal Cycler
5. Aufreinigung mit Sephadex® und Transfer in 96-Well-Platten
6. Elektrophorese im 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

### **Primer-Design mittels Primer3plus und UCSC Human Genome Browser**

1. Im HGB das Gen *ZNF141* suchen und in den DNA-Abschnitt der Mutation NM\_003441.4:c.292C>T hineinzoomen
2. Die zu amplifizierende Sequenz sollte circa 700 bp umfassen, diese kopieren und in Primer3plus einfügen
3. Bei Primer3plus Einstellungen tätigen:  
General Settings: Primer GC% max.: 70.0  
Max Tm Difference: 1  
Advanced Settings: Max Poly-X: 3
4. Im HGB Anfang und Ende der Variante suchen (genaue Basenabfolge) und diese im Primer3plus mit “[“ für Anfang (das heißt, ab diesem Bereich muss

das Produkt von den Primern umfasst sein) und mit "]" für das Ende der zu umfassenden Sequenz markieren

Cave: Bei Primer für eine PCR für eine Sequenzierung muss bei diesem Bereich vor und nach dem Exon genug Abstand gelassen werden, da die ersten 20 Basen bei dieser nicht auswertbar sind.

5. „Pick Primers“ auf Primer3plus klicken
6. Vorgeschlagene Primer auf HGB überprüfen:
  - a) „Tools“, „In-silico PCR“, bei Target „genome assembly“ wählen
  - b) forward und reverse Primer aus Primer3+ kopieren und bei In-silico PCR einfügen
  - c) „submit“

Es wird sogleich das Produkt angezeigt. Klickt man oben links auf den Genombereich, sieht man das Primer Paar samt dem umspannten Bereich im HGB. Hier muss auf Common SNPs geachtet werden. Primer dürfen nicht in einem Bereich mit Common SNPs liegen.

7. Passen die Primer, können diese mit Namen und Basenabfolge bei der Firma Microsynth AG (Balgach, Deutschland) bestellt werden

## Herstellung der Primer Gebrauchslösung

Nach Erhalt der Primer sind diese mit sterilem LiChrosolv® H<sub>2</sub>O zu lösen, um eine 100µM Konzentration zu erhalten.

Tabelle 6: Benötigte Volumina, um eine 100µM Lösung der Primer herzustellen.

	Name	Volumen für 100µM
Forward Primer	ZNF141_NM_003441.4:c.292C>T_f	564,5µl
Reverse Primer	ZNF141_NM_003441.4:c.292C>T_r	538,8µl

Nach Herstellung der 100µM konzentrierten Primer-Lösung, sind diese weiter zu verdünnen, um eine Gebrauchslösung für die PCR herzustellen. Benötigt wird eine 1:10 Konzentration:

### Pipettierschema:

10µl forward Primer

90µl LiChrosolv® H<sub>2</sub>O

---

100µl forward Primer Gebrauchslösung

10µl reverse Primer

90µl LiChrosolv® H<sub>2</sub>O

---

100µl reverse Primer Gebrauchslösung

## PCR mit Hot Star Taq Polymerase im 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems)

Für *eine* Reaktion werden folgende Volumina benötigt:

0,5µl je Primer (forward und reverse)

6µl Qiagen Hot Star Taq Master Mix

50-100ng DNA (0,5 oder 1µl)

Auffüllen mit H<sub>2</sub>O (LiChrosolv®) auf 12µl (= richtige Verdünnung des HSM)

---

Endvolumen: 12µl

Programm im TC: HS57

Für zwei Reaktionen für die Individuen PD2-1 und PD2-2 mit dem Primer-Paar ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_f und ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_r sowie einer Negativkontrolle (NTC) werden folgende Volumina benötigt:

PD2-1:

0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_f Primer  
0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_r Primer  
6µl HSM  
0,5µl DNA (c=924.8ng/µl)  
4,5µl H<sub>2</sub>O (LiChrosolv®)

---

Endvolumen: 12µl

PD2-2:

0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_f Primer  
0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_r Primer  
6µl HSM  
0,5µl DNA (c=903.1ng/µl)  
4,5µl H<sub>2</sub>O (LiChrosolv®)

---

Endvolumen: 12µl

NTC:

0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_f Primer  
0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_r Primer  
6µl HSM  
0,5µl NTC (=H<sub>2</sub>O/LiChrosolv®)  
4,5µl H<sub>2</sub>O (LiChrosolv®)

---

Endvolumen: 12µl

### Programm HS57:

94,0°C	15:00 Minuten	
94,0°C	00:30 Minuten	
57,0°C	00:30 Minuten	34 Zyklen
72,0°C	00:45 Minuten	
72,0°C	07:00 Minuten	
4,0°C	unendlich	

### **Gelelektrophorese**

1. Erstellen eines 1%-Agarose Gels:
  - a) 1g Agarose in 100ml 1% TBE-Puffer durch Schwenken und Erwärmen lösen
  - b) 10µl GelRed® in die Lösung pipettieren und schwenken
  - c) In vorbereitete Gelform gießen, schmale Kämme in die Flüssigkeit stecken und bei Raumtemperatur aushärten lassen
2. 5µl PCR-Produkt der Individuen PD2-1 und PD2-2 mit 1µl Stop Solution mischen
3. Gel samt Gelform in das Elektrophorese Gerät stellen
4. Mit 1% TBE-Puffer bis zur Markierung auffüllen
5. In den ersten Slot 5µl Invitrogen 1 kB plus DNA Ladder pipettieren
6. Jeweils gesamte Menge des DNA-Stop Solution-Produkts in die einzelnen Vertiefungen pipettieren (PD2-1, PD2-2, NTC)
7. Deckel auf das Gerät geben folgende Einstellungen tätigen:  
130 Volt für 30 Minuten
8. Elektrophorese starten
9. Nach Ablauf der Analyse das Gerät ausschalten, Deckel aufmachen und Gelform aus dem Gerät nehmen und auf ein Papiertuch platzieren
10. Zur Auswertung in das Fluoreszenzgerät stellen und das Gerät mit UV-Strahlung einschalten
11. In Bereich zoomen, Banden fotografieren und Bild ausdrucken

## Sequenzierungsreaktion im 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems)

Für *eine* Reaktion werden folgende Volumina benötigt:

- 0,5µl Big Dye™
- 0,3µl Primer (entweder forward oder reverse!)
- 0,5µl PCR-Produkt
- 1,4µl 5x Puffer (ca. 0,7x verdünnt im EV)
- 7,3µl H<sub>2</sub>O

---

Endvolumen: 10µl

Programm im TC: Big Dye

Für je zwei Reaktionen der Individuen PD2-1 und PD2-2 mit *einmal* dem Primer ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_f sowie *einmal* dem Primer ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_r werden folgende Volumina benötigt:

### PD2-1a:

- 0,5µl Big Dye™
- 0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_f Primer
- 1,4µl 5x Puffer
- 0,5µl PCR-Produkt
- 7,3µl H<sub>2</sub>O (LiChrosolv®)

---

Endvolumen: 10µl

### PD2-1b:

- 0,5µl Big Dye™
- 0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_r Primer
- 1,4µl 5x Puffer
- 0,5µl PCR-Produkt
- 7,3µl H<sub>2</sub>O (LiChrosolv®)

---

Endvolumen: 10µl

PD2-2a:

0,5µl Big Dye™  
0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_f Primer  
1,4µl 5x Puffer  
0,5µl PCR-Produkt  
7,3µl H2O (LiChrosolv®)

---

Endvolumen: 10µl

PD2-2b:

0,5µl Big Dye™  
0,5µl ZNF141\_NM\_003441.4:c.292C>T\_r Primer  
1,4µl 5x Puffer  
0,5µl PCR-Produkt  
7,3µl H2O (LiChrosolv®)

---

Endvolumen: 10µl

Programm Big Dye:

96,0°C	00:30 Minuten	
50,0°C	00:15 Minuten	25 Zyklen
60,0°C	04:00 Minuten	
4,0°C	unendlich	

---

**Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion mit Sephadex® und Transfer in 96-Well-Platten**

Für die Herstellung der Sephadex® Gebrauchslösung:

1. In ein 50ml Flask mit sterilem Löffel bis unter die 5ml Markierung Sephadex® G50 Superfine füllen
2. Mit LiChrosolv® H2O auf 50ml auffüllen und mischen
3. Die Konsistenz sollte dickflüssig sein und nicht wässrig! Bei Bedarf LiChrosolv® oder Sephadex® G50 Superfine nachmischen

### Zur Erstellung der Säulchen für die Aufreinigung des Sequenzierungsprodukts:

Säulchen erstellen, indem die Sephadex® Gebrauchslösung in die bereits verwendeten durchsichtigen 8er-Strips pipettiert wird:

1. Strips mit der Sephadex® Gebrauchslösung zu circa 2/3, jedoch nicht weniger als 1/2 oder mehr als 2/3, befüllen. Diese Säulchen auf saubere 8er Strips setzen
2. Bei 750 rcf die Säulchen ein paar Sekunden zentrifugieren und das untenstehende Wasser ausschütten
3. Säulchen erneut auf die Tubes setzen und 2 Minuten bei 750 rcf abzentrifugieren
4. Untenstehende 8er Strips verwerfen
5. Gelsäulchen auf neue, sterile 8er Strips platzieren (da PCR-Produkt mit DNA auf die Säulchen pipettiert wird und abzentrifugiert = aufgereinigt wird → Eluat wird für Analyse gebraucht)
6. PCR-Produkt nach der Sequenzierungsreaktion 1:1 mit H<sub>2</sub>O (LiChrosolv®) verdünnen und mittig auf die Säulchen pipettieren

**Cave:** Die Pipettenspitze muss dabei nicht die Wand berühren und das Gel-Säulchen darf nicht durchstoßen oder berührt werden

7. 2 Minuten bei 750 rcf zentrifugieren
8. Gelsäulchen ausklopfen und auswaschen
9. Untenstehendes Produkt (Eluat) in eine 96-Well PCR Platte (710880) luftblasenfrei überführen
10. Platte abzentrifugieren
11. Platte in den 3130xl Genetic Analyzer stellen und Anweisungen am Gerät befolgen
12. Sample Sheet am Gerät erstellen und Run starten

### **Elektrophorese im 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (42)**

Die Auswertung der aufgereinigten Sequenzierungsreaktionen basiert auf dem Prinzip einer Elektrophorese. In diesem Gerät erfolgt eine fluoreszenzbasierte Kapillar-Elektrophorese, im Zuge welcher die DNA-Fragmente mit einem Laser angestrahlt werden. Das dadurch emittierte Fluoreszenzlicht wird gesammelt, nach Wellenlängen aufgetrennt und weiters auf ein ladungsgekoppeltes Element gelenkt,

wodurch eine computergesteuerte Auswertung und Aufbereitung der Daten möglich ist. Die resultierenden Daten können mittels diverser Softwares als Elektropherogramme dargestellt und ausgewertet werden (42).

Nach dem Transfer der aufgereinigten und verdünnten Proben in die 96-Well-Platte wurde diese im 3130xl Genetic Analyzer platziert. In Zusammenarbeit mit dem Diagnostik-Team des D&F Institut für Humangenetik Graz wurde die Analyse am Gerät gestartet. Am Gerät laufen alle Schritte der Kapillarelektrophorese vom Einfügen und Beladen des Gels bis hin zur Auswertung und Herausgabe der Daten automatisch ab.

#### **2.2.2.4 Abgleich der Kandidatenvariante mittels „IGV Version 272“**

Um zu überprüfen, ob die Kandidatenvariante homozygot oder heterozygot in der sequenzierten DNA vorliegt, wurden die Rohdaten der WES mittels des online Programms „IGV Version 272“ (Integrative Genome Viewer des Broad Institute and the Regents of the University of California) ausgewertet.

Die Daten wurden als „bam-file“ in das Programm eingespielt und die Region, in der die Variante liegt, aufgesucht.

*Tabelle 7: Einstellungen in "IGV Version 272"*

<b>Variante</b>	ZNF141_NM_003441.4:c.292C>T
<b>Genomstelle</b>	GRCh37/hg19 auf Chromosom 4 bei 366,517

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Familie PD1

#### 3.1.1 Resultate der Mikrosatellitenmarker-Analysen in *Gli3*

Tabelle 8: Die für die vorab meiner Arbeit durchgeführten Mikrosatellitenmarker-Analysen verwendeten Marker.

Marker	Position	Dye	ASR	Panel
D7S510	89,190MB	NED	79-95	11
D7S519	46,116MB	FAM	257-285	12

Tabelle 9: Resultate der in Familie PD1 durchgeführten Mikrosatellitenmarker-Analysen aller vorhandenen DNAs.

Individuum	D7S510	D7S519
PD1-1 (aff. father)	87/87	268/270
PD1-2 (aff)	87/87	268/270
PD1-3 (aff)	87/87	268/270
PD1-4 (aff)	87/87	<b>268/268</b>
PD1-5	87/87	268/270
PD1-6	87/87	268/270
PD1-7	87/87	268/270
PD1-8	87/87	268/270

Die beiden verwendeten Marker weisen innerhalb der Familie keine dem Phänotyp entsprechende Segregation auf.

Der Marker D7S510 liegt bei allen Individuen homozygot vor, während der Marker D7S519 lediglich bei Familienmitglied PD1-4 homozygot vorliegt.

Läge eine dem Phänotyp entsprechende Segregation vor, müssten die Marker in allen betroffenen Familienmitgliedern homozygot und in den nicht betroffenen Familienangehörigen maximal heterozygot vorkommen.

Das Gen *Gli3* kann als Genlokus weitestgehend ausgeschlossen werden.

### 3.1.2 Resultate der DNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop®

Tabelle 10: DNA-Konzentrationen der Familie PD1 gemessen mittels NanoDrop®.

Individuum	DNA-Konzentration in ng/μl
PD1-1	95.6
PD1-2	185.6
PD1-3	112.5
PD1-4	135.0
PD1-5	220.6
PD1-6	89.2
PD1-7	65.4
PD1-8	13.7

Die vermessenen DNA-Konzentrationen sind von großer Bedeutung bei jeglichen nachfolgenden Analysen. Diese umfassen SNP-Arrays, WES, Mikrosatellitenmarker-Analysen, PCRs und Sanger Sequenzierungen.

### 3.1.3 Resultate der WES-Datenauswertung

#### 3.1.3.1 Datenfilterung mittels „Variant Studio 3.0“ (Illumina) und „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®)

Nach Ausführung der Annotation sind 34.297 Varianten in der DNA des Individuums PD1-4 vorhanden. Diese wurden anhand der im Teil der Methoden ausführlich beschriebenen Filterschritte mit der Software „Variant Studio 3.0“ gefiltert.

#### Resultate der 1. Filterung mit „Variant Studio 3.0“ (Illumina)

Tabelle 11: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
<b>General</b> Genotype: Heterozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	18.597
<b>Consequence</b> Show only variants that are: Missense Frameshift Stop gained Stop lost Splice	5.754
<b>Population Frequency</b> Thousand Genomes: Global Frequency < 0,01% ExAC: Global Frequency < 0,01%	251
<b>Classification</b> Filter by classification: Presumed pathogenic Pathogenic Unknown significance	<b>0</b>

Tabelle 12: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
<b>General</b> Genotype: Homozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	15.113
<b>Consequence</b> Show only variants that are:	

Missense Frameshift Stop gained Stop lost Splice	4.955
Population Frequency Thousand Genomes: Global Frequency < 0,001% ExAC: Global Frequency < 0,001%	104
Classification Filter by classification: Presumed pathogenic Pathogenic Unknown significance	0

Tabelle 13: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“ mit geänderter Population Frequency.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
General Genotype: Homozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	15.113
Consequence Show only variants that are: Missense Frameshift Stop gained Stop lost Splice	4.955
Population Frequency Thousand Genomes: Global Frequency < 0,5% ExAC: Global Frequency < 0,5%	140
Classification Filter by classification: Presumed pathogenic Pathogenic Unknown significance	0

Tabelle 14: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“ mit geänderter Population Frequency.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
General Genotype: Homozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	15.113

Consequence Show only variants that are: Missense Frameshift Stop gained Stop lost Splice	4.955
Population Frequency Thousand Genomes: Global Frequency < 1% ExAC: Global Frequency < 1%	149
Classification Filter by classification: Presumed pathogenic Pathogenic Unknown significance	0

Wie den Tabellen zu entnehmen, konnten durch die ersten Filterungen keine Kandidatenvarianten identifiziert werden. Als mögliche Ursache sind die zu strenge Wahl der Filterkriterien oder Wahl des Programms anzunehmen.

### Resultate der Filterung „Variant Studio 3.0“ (Illumina) nach dem Phänotyp „polydactyly“

Tabella 15: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
General Genotype: Heterozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	18.597
Gene Disease: „polydactyly“	26

Sieben der 26 gefilterten Varianten sind missense Varianten. Alle dieser sieben Varianten weisen eine hohe Allelfrequenz auf und wurden von den Vorhersageprogrammen „SIFT“ und „PolyPhen“ als benigne klassifiziert.

Bei einer Variante im Gen *WDR60* handelt es sich um eine intronische Deletion (NM\_018051.4:c.1358-831delT), welche eine Allelfrequenz von 0 aufweist. Diese Variante konnte als potentiell kausale Mutation ausgeschlossen werden, da diese in einem T-Stretch liegt, wonach es sich bei dieser Variante lediglich um ein Sequenzierungs-Artefakt handeln kann.

Die übrigen Varianten weisen eine für einen Phänotyp wie Polydaktylie zu hohe Allelfrequenz auf und konnten ebenfalls als potenziell kausale Variante ausgeschlossen werden.

Tabelle 16: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD1-4 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
General Genotype: Homozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	15.113
Gene Disease: „polydactyly“	17

Sechs der 17 Varianten sind missense Varianten und liegen in den Genen *WDR35*, *WDR60*, *WDR34*, *KIAA0586* (n=2) sowie *FBLN1*. Jede dieser Varianten weist eine hohe Allelfrequenz vor und wurde von den Programmen „SIFT“ und „PolyPhen“ als benigne klassifiziert. Somit konnten diese nicht als Kandidatenvarianten angenommen werden.

Es konnten keine Kandidatenvarianten im Zuge der Filterschritte mit „Variant Studio 3.0“ in den Rohdaten der WES des Individuums PD1-4 erfasst werden, weshalb ein weiteres Programm einer anderen Firma für die Filterung der WES-Daten verwendet wurde.

### Resultate der 1. und 2. Filterung mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®)

Die darauffolgend durchgeführten ersten Filterungen mit dem Programm „VarSeq 2.2.1“ in Zusammenarbeit mit Jasmin Blatterer, D&F Institut für Humangenetik Graz, ergaben 81 variants of interest, von welchen sechs durch die Software als „likely pathogenic“ klassifiziert wurden. Elf Varianten konnten durch die Filterung nach dem Phänotyp „polydactyly“ gefiltert werden. Nach sorgfältig durchgeführter Literatur- und Datenbankenrecherche konnte keine dieser Varianten als potenziell kausale Mutation angenommen werden.

### **Resultate der 3. Filterung mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®)**

Die dritte Filterung (durchgeführt unter Einstellung derselben Filterkriterien, jedoch nach zahlreichen Updates des Programms sowie verknüpfter Datenbanken) mit dem Programm „VarSeq 2.2.1“ ergab erneut keine potenziell kausalen Varianten.

### 3.1.4 Homozygotiekartierung mittels homozygotymapper.org und „ChAS 4.2.1“ (Illumina)

#### 3.1.4.1 Resultate der Erstellung der Homozygotiekartierung auf homozygotymapper.org

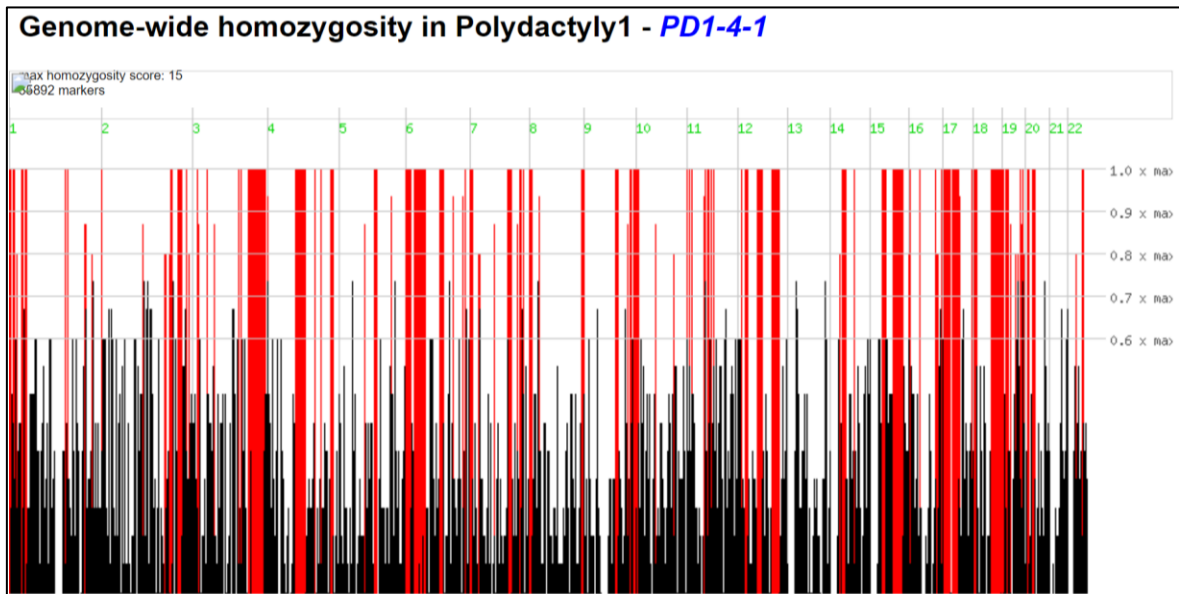


Abbildung 6: Homozygosity Mapping des Individuums PD1-4. Erstellt mittels homozygotymapper.org. In Rot dargestellt alle homozygoten Bereiche auf den Chromosomen 1 bis 22, in Schwarz dargestellt alle heterozygoten Bereiche.

Durch die Erstellung der Homozygotiekartierung mittels WES-Daten des betroffenen Individuums PD1-4 kann die Konsanguinität innerhalb der Familie bestätigt werden. Je breiter die homozygoten Bereiche, umso wahrscheinlicher kann eine kausale Variante in diesen lokalisiert sein und vererbt werden.

#### 3.1.4.2 Resultate der Erstellung der Homozygotiekartierung mit „ChAS 4.2.1“ (ThermoFisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Die Rohdaten der mittels GSA-Chips durchgeführten SNP-Arrays wurden zur Erstellung einer Homozygotiekartierung herangezogen.

Es konnten sieben überlappende homozygote Regionen im Erbgut der Familienmitglieder detektiert werden. Die Regionen müssen innerhalb der drei betroffenen Familienmitglieder überlappend sein, um als potenzielle Kandidatenvarianten tragende Regionen in Frage zu kommen. Würde eine Region

in nur einem oder zwei Individuen homozygot vorhanden sein, muss diese ausgeschlossen werden.

Folgenden Abbildungen und Tabellen können die überlappenden, homozygoten Bereiche entnommen werden.

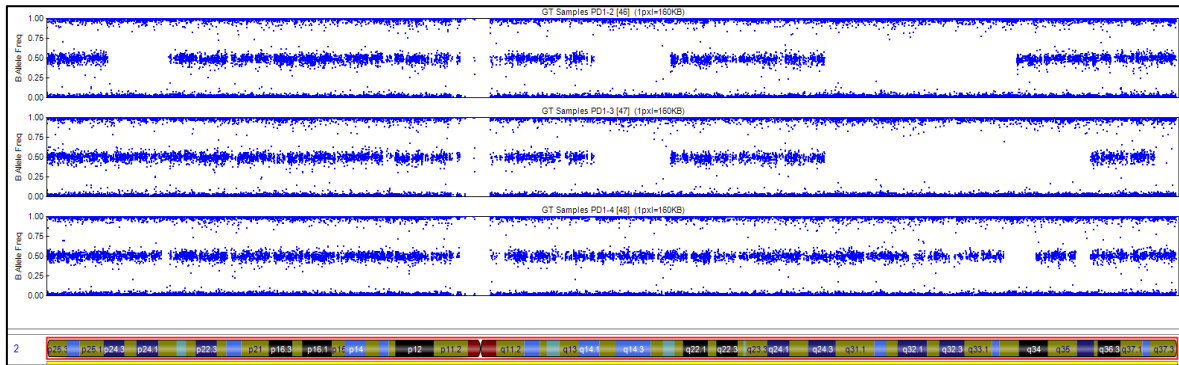


Abbildung 7: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 2: 205.843.303–208.715.314.

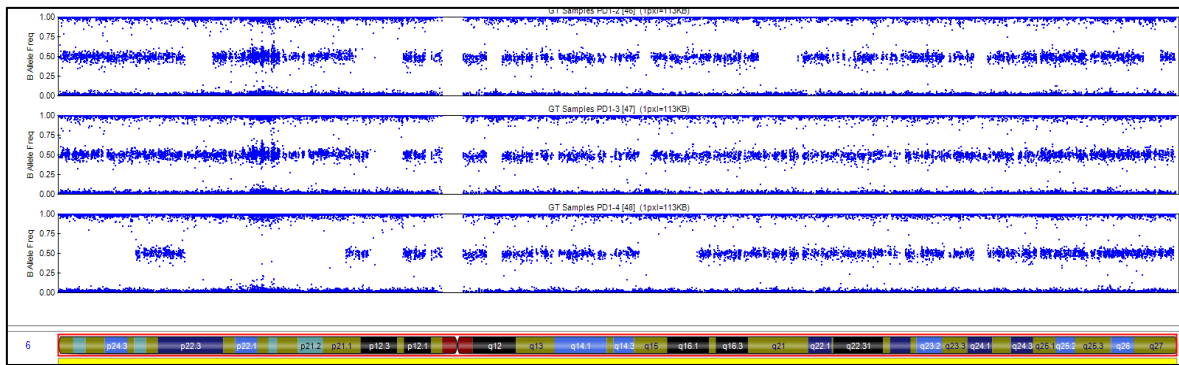


Abbildung 8: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 6: 47.318.885–52.817.144.

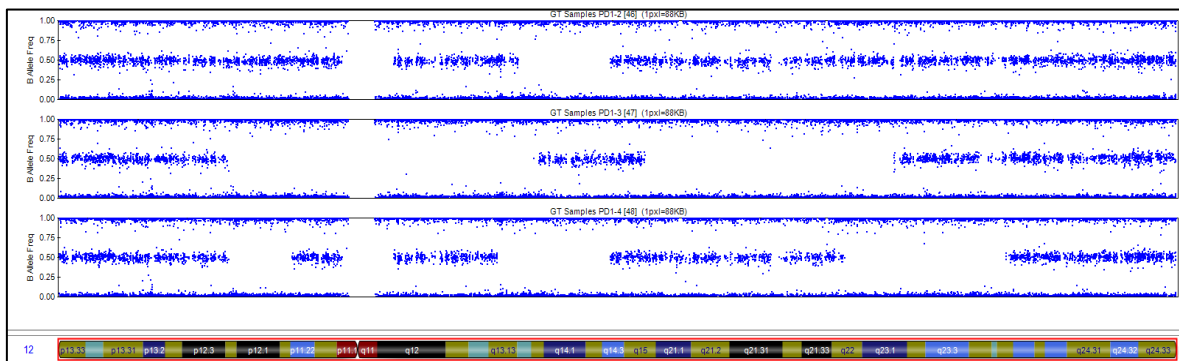


Abbildung 9: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 12: 54.955.324–57.616.013.

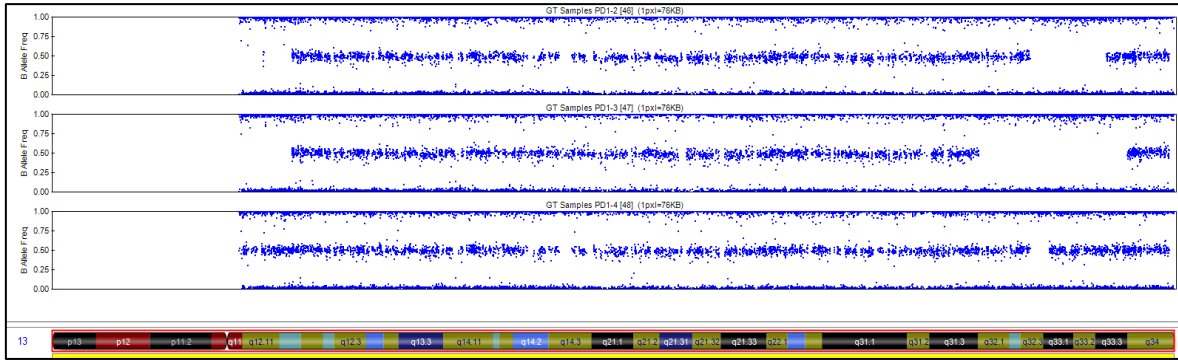


Abbildung 10: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 13: 100.188.067-102.357.497.

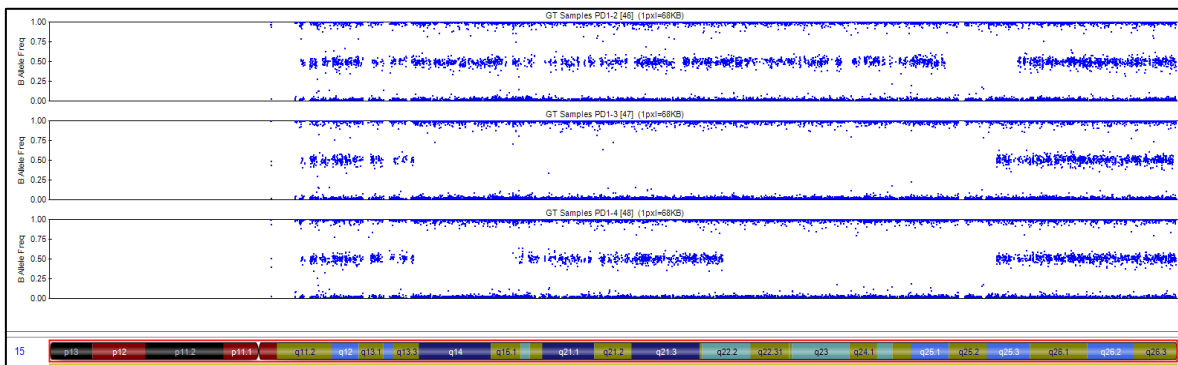


Abbildung 11: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 15: 50.354.592–54.308.996 sowie 69.302061–76.002654.

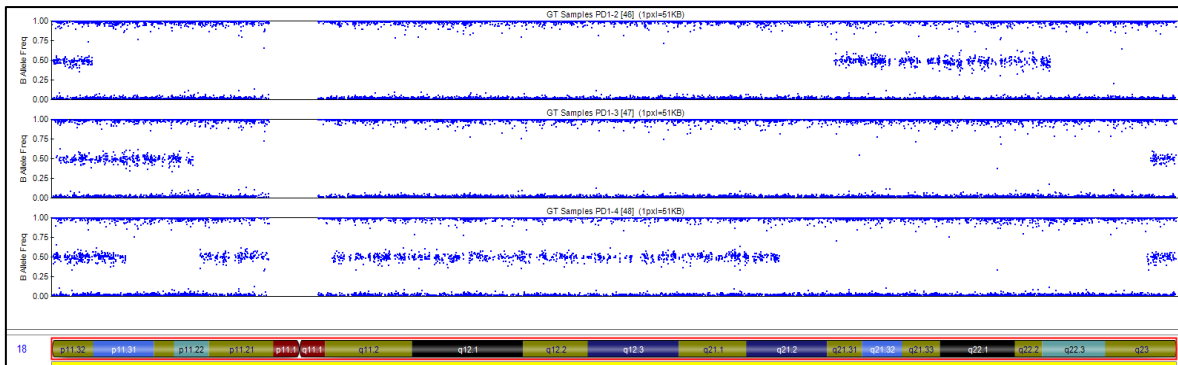


Abbildung 12: Auswertung der SNP-Arrays der Individuen PD1-2, PD1-3 und PD1-4. Erstellt mit der Software „ChAS 4.2.1“. Dargestellt die homozygoten Bereiche auf Chromosom 18: 50.354.592 – 54.308.996 sowie 69.302061 – 76.002654.

Tabelle 17: Auswertung der Whole Exome Sequencing Daten des Individuums PD1-4 mittels homozygotismapper.org sowie „ChAS 4.2.1“. Bekannte Genloci aus: Hum Genet. 2019 June ; 138(6): 593–600. doi:10.1007/s00439-019-02000-0.

	homozygotismapper.org	SNP-Array „ChAS 4.2.1“	Bekannte Genloci (ar ns PAP)		homozygotismapper.org	SNP-Array „ChAS 4.2.1“	Bekannte Genloci (ar ns PAP)
<b>Chr.1</b>	13.656 – 1.580.738 1.666.251 – 5.926.507 34.285.381 – 37.325.477 44.680.719 – 46.073.489	○		<b>Chr.12</b>	19.427.737 – 28.336.713 53.343.225 – 66.232.383 93.229.176 – 102.124.269 106.706.035 – 112.306.512	54.955.324 – 57.616.013	<i>GLI1</i> 12q13.3
<b>Chr.2</b>	168.931.467 – 170.053.505 183.998.366 – 187.692.908 204.732.714 – 214.012.405	205.843.303– 208.715.314		<b>Chr.13</b>	○	100.188.067 - 102.357.497	<i>PAPA5</i> 13q13.3-q21
<b>Chr.3</b>	148.858.987 – 154.834.379 156.864.398 – 190.995.847	○		<b>Chr.14</b>	24.901.433 – 29.261.307 32.031.245 – 37.344.229 38.277.999 – 42.997.963	○	
<b>Chr.4</b>	60.303 – 331.666 77.662.309 – 88.537.438 88.537.492 – 103.822.404 168.004.426 – 178.354.347	○	<i>ZNF141</i> 4p16.3	<b>Chr.15</b>	32.895.546 – 42.434.254 60.734.697 – 72.955.038 72.957.911 – 79.058.179 79.058.378 – 82.808.358 84.911.245 – 85.787.910	81.208.771– 86.111.747	
<b>Chr.5</b>	96.139.250 – 107.521.946	○	<i>KIAA0825</i> 5q15	<b>Chr.16</b>	○	○	
<b>Chr.6</b>	407.629 – 12.122.773 18.399.837 – 32.548.534 32.548.581 – 36.452.603 36.569.717 – 42.094.585 47.547.070 – 53.160.383 88.315.741 – 99.374.760	47.318.885 – 52.817.144		<b>Chr.17</b>	3.787.726 – 17.931.884 18.397.546 – 21.194.769 26.694.483 – 33.768.937 33.769.034 – 34.499.690 34.624.839 – 36.286.909 36.646.726 – 43.611.627	○	
<b>Chr.7</b>	286.402 – 5.965.258 105.621.512 – 111.846.771 134.891.961 – 138.265.310	○	<i>IQCE</i> 7p22.3	<b>Chr.18</b>	3.729.175 – 10.455.077 50.450.240 – 76.873.288	50.354.592 – 54.308.996 69.302061– 76.002654	
<b>Chr.8</b>	195.254 – 6.296.550	○	<i>FAM92A</i> 8q22.1	<b>Chr.19</b>	○	○	
<b>Chr.9</b>	84.607.758 – 90.321.583 136.083.638 – 140.637.804	○		<b>Chr.20</b>	17.639.857 – 24.939.590	○	
<b>Chr.10</b>	○	○		<b>Chr.21</b>	○	○	
<b>Chr.11</b>	○	○		<b>Chr.22</b>	○	○	

Wie der Tabelle zu entnehmen, wurden die homozygoten Bereiche in den DNAs des betroffenen Individuums PD1-4 (in der Spalte „homozygotismapper.org“) sowie die homozygoten Bereiche, welche nach Erstellung der Homozygotiekartierung basierend auf den Daten der SNP-Arrays hervorgingen, mit den in der Literatur beschriebenen Polydaktylie-Genloci abgeglichen. Auf Chromosom 12 konnte eine Übereinstimmung gefunden werden. Es folgte eine Filterung nach Varianten im Gen *GLI1* im Datensatz der WES mittels „VarSeq 2.2.1“ (Illumina). Es ergaben sich drei Varianten in diesem Gen, welche der folgenden Tabelle entnommen werden können.

Tabelle 18: Daten zu den Varianten in *GLI1*.

Variante	Gen	Allelfre- quenz (%)	Konsequenz	dbSNP
NM_005269.2:c.576G>A	<i>GLI1</i>	35,30	synonymous variant	rs2228225
NM_005269.2:c.3298G>C	<i>GLI1</i>	58,63	missense variant	rs2228226
NM_005269.2:c.2798G>A	<i>GLI1</i>	36,40	missense variant	rs2228224

Aufgrund der hohen Allelfrequenzen können diese drei Varianten den Phänotyp in Familie PD1 nicht begründen.

Nach der Auswertung des Homozygotiekartierung sowie dem anschließenden Abgleich mit den zum derzeitigen Stand beschriebenen autosomal rezessiv vererbten kausalen Varianten können diese als die Polydaktylie in Familie PD1 verursachend ausgeschlossen werden.

## 3.2 Familie PD2

### 3.2.1 Resultate der DNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop®

*Tabelle 19: DNA-Konzentrationen der Familie PD2 gemessen mittels NanoDrop®.*

Individuum	DNA-Konzentration in ng/μl
PD2-1	924.8
PD2-2	903.1

Die vermessenen DNA-Konzentrationen sind von großer Bedeutung bei jeglichen nachfolgenden Analysen. Diese umfassen SNP-Arrays, WES, Mikrosatellitenmarker-Analysen, PCRs und Sanger Sequenzierungen.

## 3.2.2 Resultate der WES-Datenauswertung

### 3.2.2.1 Datenfilterung mittels „Variant Studio 3.0“ (Illumina) und „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®)

#### Resultate der Filterung mit „Variant Studio 3.0“ (Illumina)

Nach den im Teil der Methoden ausführlich beschriebenen Filterschritten mit der Software „Variant Studio 3.0“ konnten keine Kandidatenvarianten detektiert werden, weshalb ein weiteres Programm einer anderen Firma für die Filterung der WES-Daten verwendet wurde.

Tabelle 20: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
General Genotype: Homozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	13.118
Consequence Show only variants that are: Missense Frameshift Stop gained Stop lost Splice	4.255
Population Frequency Thousand Genomes: Global Frequency < 0,5% ExAC: Global Frequency < 0,5%	93
Classification Filter by classification: Presumed pathogenic Pathogenic Unknown significance	0

Tabelle 21: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“ mit geänderter Population Frequency.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
General Genotype: Homozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	13.118

Consequence Show only variants that are: Missense Frameshift Stop gained Stop lost Splice	4.255
Population Frequency Thousand Genomes: Global Frequency < 1% ExAC: Global Frequency < 1%	98
Classification Filter by classification: Presumed pathogenic Pathogenic Unknown significance	0

Tabelle 22: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
General Genotype: Heterozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	23.374
Consequence Show only variants that are: Missense Frameshift Stop gained Stop lost Splice	7.428
Population Frequency Thousand Genomes: Global Frequency < 0,01% ExAC: Global Frequency < 0,01%	248
Classification Filter by classification: Presumed pathogenic Pathogenic Unknown significance	0

## Resultate der Filterung „Variant Studio 3.0“ (Illumina) nach dem Phänotyp „polydactyly“

Tabelle 23: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
General	
Genotype: Heterozygot	
Variant Type: SNVs	
Insertions	
Deletions	
Chromosome: Autosomal	23.374
Gene	
Disease: „polydactyly“	25

Unter den nach dem Phänotyp „polydactyly“ resultierenden 25 Varianten sind lediglich sechs missense Varianten, von welchen vier in *ZNF141*, eine in *WDR35* und eine in *KIAA0586* lokalisiert ist. *ZNF141* wurde 2012 bereits in einer Publikation in Zusammenhang mit postaxialer Polydaktylie beschrieben (40). Varianten in *KIAA0586* begründen das Joubert-Syndrom, bei welchem in seltenen Fällen postaxiale Polydaktylie im Phänotyp vorliegen kann (43). Weiters wurden 2019 bereits compound heterozygote Varianten von (44) beschrieben, welche präaxiale Polydaktylie begründen. Da in diesem Individuum PD2-1 nur eine Variante in *KIAA0586* detektiert wurde, postaxiale Polydaktylie vorliegt und im Programm „SIFT“ keine pathogenen Veränderungen aufgrund dieser Variante vorhergesagt werden, kann diese Variante (NM\_001244189.1:c.4703T>C) nicht als Kandidatenvariante angenommen werden. Das Gen *WDR35* wurde bisher mit Syndromen wie dem Short Rib-Polydactyly Syndrom oder der Kranioektodermalen Dysplasie (Sensenbrenner Syndrom) in Verbindung gebracht (45). Da bei den Personen mit Polydaktylie in Familie PD2 jedoch nicht-syndromale postaxiale Polydaktylie vorliegt und im Programm „SIFT“ keine pathogenen Veränderungen aufgrund dieser Variante vorhergesagt werden, kann diese Variante (NM\_001006657.1:c.2632G>A) ebenfalls nicht als Kandidatenvariante angenommen werden. Zwei Varianten (NM\_003441.2:c.163T>A und NM\_003441.2:c.292C>T) in *ZNF141* werden im Programm „SIFT“ als „deleterious“ vorhergesagt, wobei die Variante NM\_003441.2:c.292C>T im Programm „PolyPhen“ ebenfalls als „probably damaging“ klassifiziert wird.

Tabelle 24: Filtereinstellungen und Resultate des Individuums PD2-1 durchgeführt mit dem Programm „Variant Studio 3.0“.

Filtereinstellungen	Anzahl an Varianten
General Genotype: Homozygot Variant Type: SNVs Insertions Deletions Chromosome: Autosomal	23.374
Gene Disease: „polydactyly“	<b>28</b>

Zehn von 28 detektierten Varianten sind missense Varianten. Eine von den Programmen „SIFT“ und „PolyPhen“ als „deleterious“ bzw. „probably damaging“ klassifizierte Variante (NM\_153223.3:c.1804C>G) liegt in *CEP120*. Dieses Gen wurde in Zusammenhang mit Polydaktylie jedoch nur mit Syndromen beschreiben und kann somit nicht als Kandidatenvariante angenommen werden. Alle weiteren Varianten weisen eine hohe Allelfrequenz auf und wurden von den Programmen „SIFT“ und „PolyPhen“ als benigne klassifiziert. Diese werden daher nicht als Kandidatenvarianten angenommen.

### Resultate der Filterung mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®)

Die darauffolgende Auswertung der WES-Rohdaten in Zusammenarbeit mit Jasmin Blatterer mit der Software „VarSeq 2.2.1“ ergab 72 Kandidatenvarianten, wobei 11 dieser von der Software als „likely pathogenic“ eingestuft wurden. Jede dieser Kandidatenvarianten liegt heterozygot vor, weshalb diese nicht als potenziell kausale Varianten angenommen werden könnten, würde die ursprüngliche Arbeitshypothese allein geltend sein. Diese Arbeitshypothese wurde im Verlauf der Arbeit um die Möglichkeit einer autosomal dominant vererbten Variante als kausale Variante erweitert. Nach vertiefender Literaturrecherche betreffend die 11 „likely pathogenic“ Varianten mussten diese als kausale Mutationen ausgeschlossen werden, da keine Verbindungen zu Extremitäten-Fehlbildungen der Hand hergestellt werden konnte.

Auch die weiteren 61 Kandidatenvarianten konnten nicht mit dem Phänotyp der non-syndromalen, postaxialen Polydaktylie in Verbindung gebracht werden.

## Resultate der Filterung mit „VarSeq 2.2.1“ (Golden Helix®) nach dem Phänotyp „polydactyly“

Eine erneute Filterung im Programm „VarSeq 2.2.1“ mit dem Begriff „polydactyly“ ergab 19 Varianten, die in Zusammenhang mit diesem Schlagwort bereits beschrieben sind. Diese Varianten liegen im Gen *ZNF141* auf Chromosom 4. Unter Hinzuziehen einiger Datenbanken (siehe Datenbankenverzeichnis) sowie einem Artefakt-Katalog im Programm „VarSeq 2.2.1“ wurden die Varianten auf einen Zusammenhang mit dem vererbten Phänotyp überprüft. 17 von 19 Varianten konnten als Artefakte ausgeschlossen werden. Zwei Varianten hingegen sind nicht im Artefakt-Katalog gespeichert:

*Tabelle 25: Nach dem Schlagwort „polydactyly“ gefilterte Varianten des Individuums PD2- 1 in Gen ZNF141.*

Variante	Konsequenz	Allelfrequenz	SIFT	PolyPhen
NM_003441.4:c.292C>T	missense Variante	unbekannt	Damaging	Possibly damaging
NM_003441.4:c.131-23_131-22delTT	Intronvariante Deletion	unbekannt	-	-

Recherchiert im Human Genome Browser liegt die Variante NM\_003441.4:c.131-23\_131-22delTT liegt im tief-intronischen Bereich der DNA. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Variante kausal für die Polydaktylie des Individuums PD2-1 ist, ist gering. Daher wurde diese Variante nicht näher überprüft.

Aufgrund der im Methodenteil unter Abschnitt 2.2.2.3 beschriebenen Zusammenhänge wurde eine Sanger Sequenzierung der Variante NM\_003441.4:c.292C>T in *ZNF141* durchgeführt.

### 3.2.3 Homozygosity Mapping mittels homozygositymapper.org und „ChAS 4.2.1“ (Illumina)

#### 3.2.3.1 Resultate der Erstellung des Homozygosity Mappings auf homozygositymapper.org

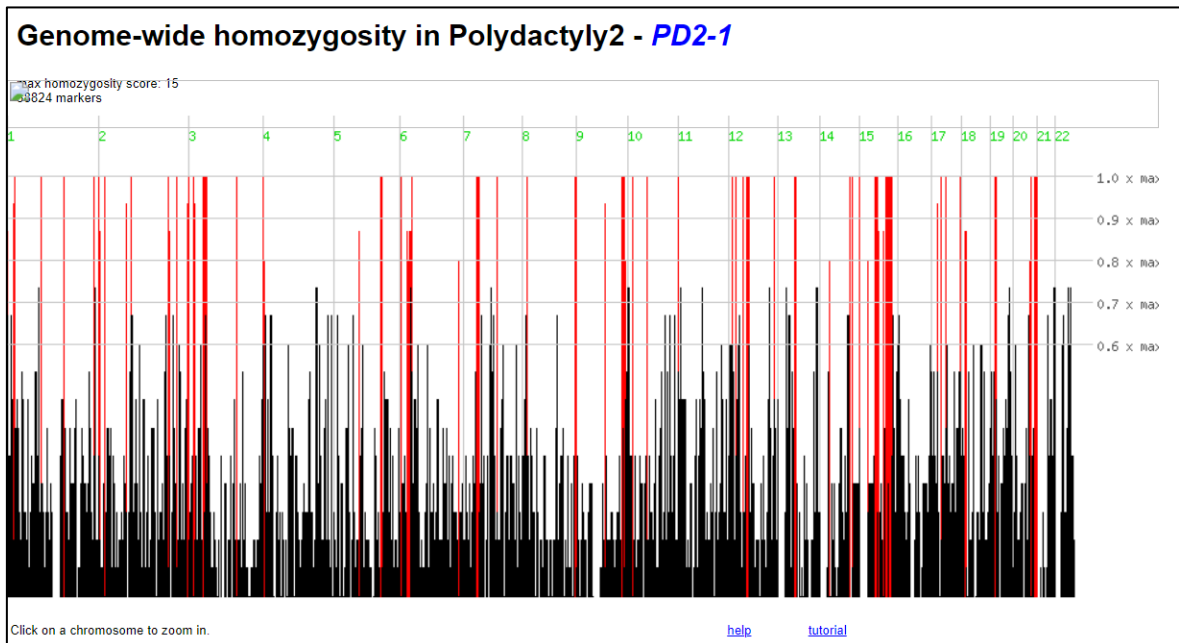


Abbildung 13: Homozygosity Mapping des Individuums PD2-1 auf homozygositymapper.org. In Rot dargestellt alle homozygoten Bereiche auf den Chromosomen 1 bis 22, in Schwarz dargestellt alle heterozygoten Bereiche.

Durch die Erstellung der Homozygotiekartierung mittels WES-Daten des betroffenen Individuums PD2-1 kann die Konsanguinität innerhalb der Familie bestätigt werden. Je breiter die homozygoten Bereiche, umso wahrscheinlicher kann eine kausale Variante in diesen lokalisiert sein und vererbt werden.

Tabelle 26: Auswertung der Whole Exome Sequencing Daten des Individuums PD2-1 mittels homozygotymapper.org. Bekannte Genloci aus: Hum Genet. 2019 June; 138(6): 593–600. doi:10.1007/s00439-019-02000-0.

	homozygotymapper.org	Bekannte Genloci (ar ns PAP)		homozygotymapper.org	Bekannte Genloci (ar ns PAP)
<b>Chr.1</b>	○		<b>Chr.12</b>	50.745.791 – 52.080.965 54.739.273 – 56.492.739	<i>GLI1</i> 12q13.3
<b>Chr.2</b>	○		<b>Chr.13</b>	45.589.721 – 48.547.467 49.866.869 – 51.417.535	<i>PAPA5</i> 13q13.3-q21
<b>Chr.3</b>	36.893.703 – 42.251.577 128.755.953 – 130.313.219		<b>Chr.14</b>	○	
<b>Chr.4</b>	○	<i>ZNF141</i> 4p16.3	<b>Chr.15</b>	71.276.480 -- 86.807.884	
<b>Chr.5</b>	○	<i>KIAA0825</i> 5q15	<b>Chr.16</b>	○	
<b>Chr.6</b>	26.509.330 – 28.264.717 18.237.661 – 24.489.691		<b>Chr.17</b>	○	
<b>Chr.7</b>	38.398.565 – 43.483.981	<i>IQCE</i> 7p22.3	<b>Chr.18</b>	○	
<b>Chr.8</b>	○	<i>FAM92A</i> 8q22.1	<b>Chr.19</b>	○	
<b>Chr.9</b>	○		<b>Chr.20</b>	58.440.840 – 60.966.318	
<b>Chr.10</b>	○		<b>Chr.21</b>	○	
<b>Chr.11</b>	○		<b>Chr.22</b>	○	

Wie der Tabelle zu entnehmen, liegen in der DNA des Individuums PD2-1 keine homozygoten Regionen vor, in welchen bereits mit Polydaktylie in Zusammenhang gebrachte Gene liegen. Basierend auf der Homozygotiekartierung konnten keine weiteren Schritte in Richtung Auffindung der kausalen Mutation in Familie PD2 gesetzt werden. Nicht auszuschließen ist, dass die kausale Variante in kleineren homozygoten Bereichen, welche in dieser Tabelle nicht dargestellt sind, lokalisiert ist. Die Variante kann auch in einem derzeit noch nicht beschriebenen Krankheitsgen lokalisiert sein.

### 3.2.4 Familie PD2 - Resultate der Sanger Sequenzierung

#### Primer-Design mittels Primer3plus und UCSC Human Genome Browser

Das Primer-Paar soll die Variante NM\_003441.4:c.292C>T umfassen.

Tabelle 27: Die mittels Primer3plus designten Primer, welche Variante NM\_003441.4:c.292C>T umfassen.

	Forward Primer	Reverse Primer
Name	ZNF141_NM_003441.4:c.292C>T_f	ZNF141_NM_003441.4:c.292C>T_r
Basenabfolge	TCACAGAAAGGTGTCTTTGTTAGT	AACTTCTGAAATGATTTGCCACA

Das Produkt, welches das Primer-Paar umspannt, umfasst 504bp:

```
TCACAGAAAGGTGTCTTTGTTAGTatatgtttgctacatgtatatgtctgtgaagaagttagcctgt
gggattttgttatgccatcttactaatgtatgtttgaataattcataagatttgtaaagtatttatatgaatctactaagtgg
gataatttgtaatttttattcttcagctatgtgttctcattcacccaagaccattggccagtgccagggcatagaagatt
cattccacaaacttatactgagaagatatgagaaatgtggacatgataattacaattaagaaaaggctgtaaag
ttgaaatgagtgaagttgcagaaaggaggtataatgaattaatgaatgctgtcaactaccagagcaaaaatact
tcagtgtaaagcaagtgtaaagttgtagtaaatttcaaattcaaacaacgtaagacaagacatactggagag
aaacactttaagaaTGTGGCAAATCATTTCAGAAGTT
```

Mittels der WES-Daten wurde überprüft, dass in den Primern keine Mutationen und keine häufige SNPs liegen. Es wird nur das gewünschte Produkt umfasst.

#### Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR

Die zur Qualitätsüberprüfung der PCR durchgeführte Gelelektrophorese zeigte neben dem 1kB Marker zur Qualitätssicherung deutliche Banden im erwarteten Größenbereich. Die PCR-Produkte konnten für die weiteren Analysen verwendet werden.

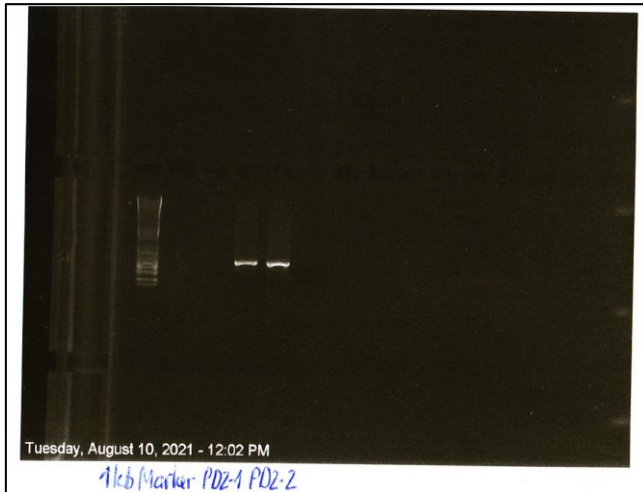


Abbildung 14: Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR der DNA der Individuen PD2-1 und PD2-2.

## Auswertung der Sanger Sequenzierung der Familie PD2 mittels der Software „SnapGene Viewer“ (Dotmatics)

Die Ergebnisse der Sanger Sequenzierung der Individuen PD2-1 und PD2-2 haben eine gute Qualität und konnten gut ausgewertet werden. Die Daten wurden mit dem Programm „SnapGene Viewer“ dargestellt und interpretiert.

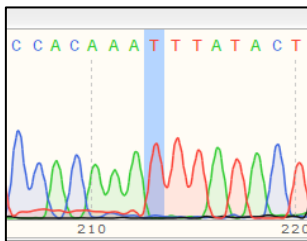


Abbildung 15: Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung des Individuums PD2-1. Sequenz mit forward-Primer. Blau hinterlegt die homozygot vorhandene missense Variante NM\_003441.4:c.292C>T.

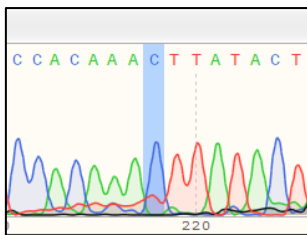


Abbildung 16: Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung des Individuums PD2-2. Sequenz mit forward-Primer. Blau hinterlegt die Base der missense Variante NM\_003441.4:c.292C>T. Der Wildtyp liegt vor.

Mit der Sanger Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass die missense Variante NM\_003441.4:c.292C>T in der DNA des Individuums PD2-1 homozygot vorliegt. Dieses Individuum ist von Polydaktylie betroffen. Das phänotypisch gesunde Individuum PD2-2 trägt die Variante nicht, der Wildtyp liegt vor. Durch die Sanger Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass diese Variante dem in Familie PD2 auftretenden Phänotyp entsprechend segregiert. Zu beachten ist, dass lediglich DNAs von zwei Individuen der Familie vorliegen und die Aussagekraft der Analyse eingeschränkt ist.

Die sequenzierte Variante liegt in *ZNF141*. Die Allelfrequenz ist unbekannt. Das Gen liegt am kurzen Arm des Chromosoms 4 auf Position hg19 chr4:331,596-367,691, umfasst 4 Exons und kodiert für 474 Aminosäuren. Die Variante ist eine missense Variante, welche am Beginn des vierten Exons auf Position hg19 chr4:366,517 liegt. Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Variante in keiner Datenbank

erfasst. Kalsoom et al. beschrieben in *ZNF141* 2012 bereits eine autosomal rezessiv vererbte missense Variante, welche als kausal für isolierte Polydaktylie angenommen wurde (11). Seit der Erstbeschreibung dieses Zusammenhangs mit Polydaktylie wurde keine weitere für Polydaktylie kausale Variante mehr in *ZNF141* publiziert.

Das reife Zink Finger Protein 141 wird im Zellkern exprimiert. Diesem wird die Funktion als ein Repressor in der Transkriptionsregulation zugeschrieben.

Das Gen *ZNF141* ist erst ab der Gattung der Primaten hoch konserviert. Eine hohe Konservierung in der Spezies weist darauf hin, dass das Gen im Laufe der Evolution nicht oder nur geringgradig verändert wurde, da es wohl eine wichtige physiologische Rolle einnimmt.

In Vorhersageprogrammen für missense Varianten wie dem Mutation Taster ([mutationtaster.org](http://mutationtaster.org)) wird als Konsequenz der Variante NM\_003441.4:c.292C>T eine Änderung der in diesem genomischen Bereich kodierten Aminosäure von Leucin nach Phenylalanin (NP\_003432.1:p.Leu98Phe ) beschrieben. In den Vorhersageprogrammen SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) und Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) wird die durch die detektierte Variante vorhergesagte Konsequenz als „damaging“ klassifiziert.

### 3.2.5 Resultate des Abgleichs der Kandidatenvariante mittels „IGV Version 272“

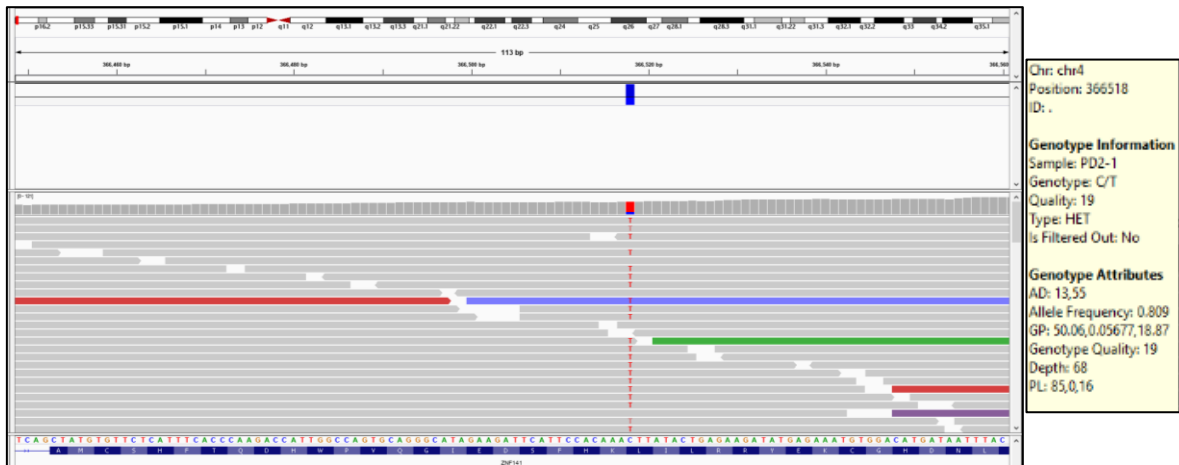


Abbildung 17: Kandidatenvariante (rote Ts) dargestellt in "IGV Version 272". Rechts: Daten zur Kandidatenvariante.

Die missense-Variante NM\_003441.4:c.292C>T liegt am Beginn des Exon 1 im Gen *ZNF141* an Stelle 366.518 (UCSC: GRCh37/hg19).

Die Variante wurde in der WES 68 mal erfasst, wobei 55 mal ein T und 13 mal ein C vorliegt. Die VAF liegt bei 80%. Da in der Auswertung weitere homozygote Varianten ebenfalls eine VAF von nur 80% aufweisen und die Qualität der sequenzierten DNA nicht einwandfrei ist, bestätigt dies, dass die Variante homozygot vorliegt. Die Qualität der reads liegt im Bereich von 19 bis 37, wobei ein Wert über 30 gute Qualität angibt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Familie PD1

Die Hypothese, dass ein autosomal rezessiver Vererbungsmodus vorliegt, musste um die Möglichkeit eines autosomal dominant vererbten Vererbungsmodus erweitert werden, da der Vater der drei Merkmalsträger\*innen isolierte, postaxiale Polydaktylie hat. Für das Vorliegen einer autosomal dominanten Variante spricht, dass der Vater PD1-1 der drei Kinder (PD1-2, PD1-3, PD1-4) mit Polydaktylie den Phänotyp ebenfalls aufweist. Gegen einen autosomal rezessiven Erbgang spricht, dass Merkmalsträger\*innen in zwei Generationen vorliegen. Die Konsanguinität in der Familie im Falle eines autosomal dominanten Erbgangs hätte keine Relevanz hinsichtlich der Mutationsauffindung. Eine autosomal rezessiv vererbte Variante kann somit nur vorliegen, wenn auch der Vater der Betroffenen einer konsanguinen Verbindung entstammt. Daher wurden die WES-Daten nach autosomal rezessiven sowie autosomal dominanten Varianten gefiltert. Eine compound heterozygote Variante könnte ebenso kausal für den vererbten Phänotyp sein (46). Zwei heterozygote Varianten müssen gemeinsam im selben Gen vererbt werden, um den Phänotyp in Erscheinung treten zu lassen. Nach einer compound heterozygoten Variante darf gesucht werden, wenn die Konsanguinität in der Familie als Ursache des Phänotyps ausgeschlossen wurde. Bei compound heterozygoten Varianten hat eine vorliegende Konsanguinität keine Relevanz.

Neben dem unklaren Vererbungsmodus des Merkmals, gibt es methodische Gründe, weshalb keine Kandidatenvariante gefunden wurde. Die Rohdaten dieser Arbeit wurden mittels Whole Exome Sequenzierung generiert. Eine WES detektiert alle Varianten, die in den kodierenden Bereichen und den umliegenden intronischen Bereichen des Erbguts liegen. Daher ist es möglich, dass die gesuchte kausale Variante nicht miterfasst wurde. Liegt diese im nicht-kodierenden, intronischen Bereich der DNA, kann diese basierend auf den WES-Daten nicht detektiert werden. Eine Whole Genome Sequenzierung (WGS) würde auch im Intron lokalisierte Varianten detektieren. Im Zuge der Whole Genome Sequenzierung wird das gesamte Genom eines Individuums bestehend aus kodierenden sowie auch nicht-kodierenden Bereichen sequenziert. Als Ergebnis liegt jede vorhandene Variante im Vergleich zum Referenzgenom vor.

Des Weiteren werden bei einer WGS Kopienzahlvarianten (copy number variations = CNVs) erfasst, wohingegen bei einer WES nur eingeschränkte Aussagen bezüglich CNVs getroffen werden können. Bei der gesuchten Variante kann es sich auch um eine CNV handeln. Daher ist es möglich, dass die gesuchte Variante bei der WES nicht detektiert werden konnte (34)(38).

Im Verlauf der Arbeit ergaben Resultate der WES zwei missense Varianten (NM\_005269.2:c.576G>A, NM\_005269.2:c.3298G>C) und eine synonyme Variante (NM\_005269.2:c.576G>A) im Gen *Gli1*. Aufgrund der hohen Allelfrequenzen (36,40, 58,63, 35,30) mussten diese als Kandidatenvarianten verworfen werden.

Zu strenges Setzen der Filtereinstellungen stellt eine weitere mögliche Ursache dar, weshalb keine Kandidatenvariante in den WES-Daten detektiert werden konnte. Je nach angenommenem Vererbungsmodus der Variante wird nach unterschiedlich hohen Allelfrequenzen gefiltert. Bei Annahme einer autosomal dominant vererbten Variante wurden Allelfrequenzen von 0,01% gewählt. Bei Annahme einer autosomal rezessiv vererbten Variante wurden Allelfrequenzen von 0,001% bis 1% gewählt. Betrachtet man die Häufigkeit von Polydaktylie, dürfte die gesuchte Variante nicht häufiger in der Bevölkerung auftreten, als in die Daten gefiltert wurden. Dennoch könnte die Variante häufiger als angenommen auftreten.

Die Analysen ergaben keine Kandidatenvariante in einem bekannten Gen. Auch konnten keine bisher noch nicht beschriebenen Varianten gefiltert werden. Zur Determination der kausalen Variante in Familie PD1 sind weitere Analysen notwendig.

### **Geplante, weiterführende Methoden**

Die weiterführenden Analysemethoden umfassen einen hochauflösenden SNP-Array sowie eine WGS. Die DNAs der Individuen PD1-1, PD1-5, PD1-6, PD1-7 sowie PD1-8 werden herangezogen. Die generierten Daten dienen als Grundlage einer CNV-Analyse sowie einer Homozygotiekartierung. Die Daten der WGS werden ebenfalls zur Erstellung einer CNV-Analyse verwendet.

Das Ziel des SNP-Arrays ist der Nachweis homozygoter Regionen mittels Homozygotiekartierung, um eine mögliche Konsanguinität der Großeltern der Betroffenen beurteilen zu können. Ein autosomal rezessiver Erbgang für die kausale

Variante darf angenommen werden, wenn auch der Vater einer konsanguinen Verbindung entstammt. Eine autosomal dominante Vererbung darf nicht ausgeschlossen werden. Kann dies widerlegt werden, ist die Annahme eines autosomal rezessiven Erbgangs als weitgehend ausgeschlossen anzusehen. Bei drei phänotypisch auffälligen Kindern und einem phänotypisch auffälligen Vater gilt trotz vorliegender Konsanguinität der Eltern der auffälligen Kinder die Annahme eines autosomal dominanten Erbgangs (26–28).

Die Aussagekraft einer WES ist eingeschränkt. Um tief-intronische Varianten oder größere strukturelle Veränderungen detektieren zu können, muss eine Whole Genome Sequenzierung durchgeführt werden. Mit diesen Rohdaten muss eine CNV-Analyse durchgeführt werden. Ziel der CNV-Analyse ist der Nachweis von Veränderungen, welche mehr als 1000 Basenpaare groß sind. Dies ermöglicht die Eingrenzung der Region, in welcher die kausale Variante liegen muss (34,38).

## 4.2 Familie PD2

Resultate der Whole Exome Sequenzierung mit nachfolgenden Filterschritten ergaben die Kandidatenvariante NM\_003441.4:c.292C>T im Gen *ZNF141*. Das Gen liegt am kurzen Arm des Chromosoms 4 auf Position hg19 chr4:331,596-367,691, umfasst 4 Exons und kodiert für 474 Aminosäuren. Die Variante ist eine missense Variante, welche am Beginn des vierten Exons auf Position hg19 chr4:366,517 liegt. Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Variante in keiner Datenbank erfasst (herangezogene Datenbanken dem Verzeichnis entnehmen). Kalsoom et al. beschrieben in *ZNF141* 2012 bereits eine autosomal rezessiv vererbte missense Variante, welche als kausal für isolierte Polydaktylie angenommen wurde (11). Seit der Erstbeschreibung dieses Zusammenhangs mit Polydaktylie wurde keine weitere für Polydaktylie kausale Variante in *ZNF141* publiziert.

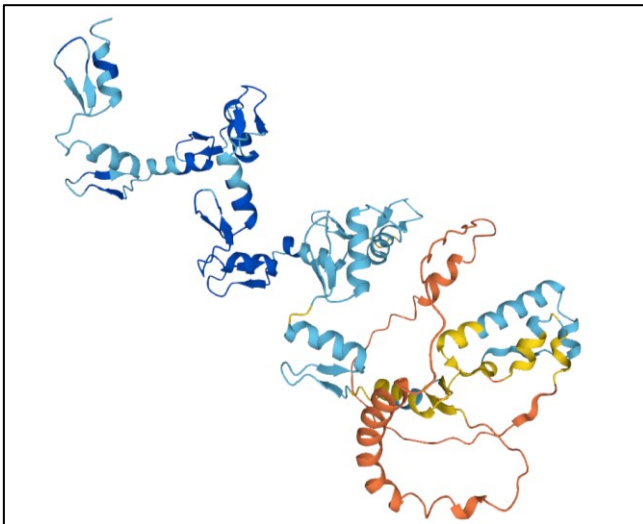


Abbildung 18: 3D Model des Proteins des Gens *ZNF141*. (Quelle: *ZNF141 - Zinc finger protein 141 - Homo sapiens (Human) - ZNF141 gene & protein (uniprot.org)*).

Das reife Zink Finger Protein 141 wird im Zellkern exprimiert. Diesem wird die Funktion als ein Repressor in der Transkriptionsregulation zugeschrieben.



Familienmitgliedern nachgewiesen werden konnte. Bestätigt sich der Vererbungsmodus der Variante nach Durchführung der erweiterten Segregationsanalyse, erhärtet sich die Vermutung, dass das Gen *ZNF141* in der Entwicklung der Extremitäten eine wichtige Rolle spielt.

Zudem könnte sich die Datenlage bezüglich des Gens verbessern, da es eine weitere kausale Variante in *ZNF141* neben der 2012 von Kalsoom et al. beschriebenen darstellen würde (11).

Ergebnisse dieser Studie verbessern die wissenschaftliche Datenlage zur isolierten, postaxialen Polydaktylie. Durch weitere Studien würde die genetische Beratungssituation von Familien mit Polydaktylie, wie Familie PD2 es ist, verbessert.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Raszewski JA, Singht P. Embryology, Hand [Internet]. Stat Pearls Publishing. 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538240/>
2. Bommas-Ebert U, Teuber P, Voß R. Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie. 2. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2006. 554 p.
3. Tickle C, Towers M. Sonic hedgehog signaling in limb development. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5(FEB):1–19.
4. Malik S. Polydactyly: Phenotypes, genetics and classification. *Clin Genet.* 2014;85(3):203–12.
5. Comer GC, Potter M, Ladd AL. Polydactyly of the Hand. *J Am Acad Orthop Surg.* 2018;26(3):75–82.
6. Baldaszi E. Jahrbuch der Gesundheitsstatistik. Wien: Statistik Austria; 2014. 305 p.
7. Ortiz-Cruz G, Luna-Muñoz L, Arteaga-Vázquez J, Mutchinick OM. Isolated postaxial polydactyly: Epidemiologic characteristics from a multicenter birth defects study. *Am J Med Genet Part A.* 2019;179(8):1432–41.
8. Malik S, Ullah S, Afzal M, Lal K, Haque S. Clinical and descriptive genetic study of polydactyly: A Pakistani experience of 313 cases. *Clin Genet.* 2014;85(5):482–6.
9. Abzug JM, Scott H. K, Zlotolow DA. *The Pediatric Upper Extremity.* 1st ed. Abzug JM, Scott H. K, Zlotolow DA, editors. Springer-Verlag; 2015. 1866 p.
10. Temtamy, McKusick. Review - The Genetics of Hand Malformations : Updated. *Cong Anom.* 1985;25:73–92.
11. Kalsoom U e., Klopocki E, Wasif N, Tariq M, Khan S, Hecht J, et al. Whole exome sequencing identified a novel zinc-finger gene ZNF141 associated with autosomal recessive postaxial polydactyly type A. *J Med Genet.* 2013;50(1):47–53.
12. Radhakrishna U, Bornholdt D, Scott HS, Patel UC, Rossier C, Engel H, et al. The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; no phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet.* 1999;65(3):645–55.

13. Palencia-Campos A, Ullah A, Nevado J, Yildirim R, Unal E, Ciorraga M, et al. GLI1 inactivation is associated with developmental phenotypes overlapping with Ellis-van Creveld syndrome. *Hum Mol Genet.* 2017;26(23):4556–71.
14. Kondoh S, Sugawara H, Harada N, Matsumoto N, Ohashi H, Sato M, et al. A novel gene is disrupted at a 14q13 breakpoint of t(2;14) in a patient with mirror-image polydactyly of hands and feet. *J Hum Genet.* 2002;47(3):136–9.
15. Umair M, Shah K, Alhaddad B, Haack TB, Graf E, Strom TM, et al. Exome sequencing revealed a splice site variant in the IQCE gene underlying post-axial polydactyly type A restricted to lower limb. *Eur J Hum Genet [Internet].* 2017;25(8):960–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2017.83>
16. Klopocki E, Kähler C, Foulds N, Shah H, Joseph B, Vogel H, et al. Deletions in PITX1 cause a spectrum of lower-limb malformations including mirror-image polydactyly. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(6):705–8.
17. Schrauwen I, Giese AP, Aziz A, Lafont DT, Chakchouk I, Santos-Cortez RLPKL. FAM92A Underlies Nonsyndromic Postaxial Polydactyly in Humans and an Abnormal Limb and Digit Skeletal Phenotype in Mice. *J Bone Min Res.* 2019;176(3):375–86.
18. Ullah I, Kakar N, Schrauwen I, Hussai S, Chakchouk I, Liaqat K, et al. Variants in KIAA0825 underlie autosomal recessive postaxial polydactyly. *Hum Genet.* 2019;138 (6)(3):593–600.
19. van der Zwaag PA, Dijkhuizen T, Gerssen-Schoorl KBJ, Colijn AW, Broens PMA, Flapper BCT, et al. An interstitial duplication of chromosome 13q31.3q32.1 further delineates the critical region for postaxial polydactyly type A2. *Eur J Med Genet [Internet].* 2010;53(1):45–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2009.11.003>
20. Zhao H, Tian Y, Breedveld G, Huang S, Zou Y, Chai JYJ, et al. Postaxial polydactyly type A/B (PAP-A/B) is linked to chromosome 19p13.1-13.2 in a chinese kindred. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(3):162–6.
21. Galjaard RJH, Smits APT, Tuerlings JHAM, Bais AG, Bertoli Avella AM, Breedveld G, et al. A new locus for postaxial polydactyly type A/B on chromosome 7q21-q34. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(5):409–15.
22. Hülsemann W. Strategien in der Behandlung von angeborenen Handfehlbildungen. *Handchirurgie Mikrochirurgie Plast Chir.* 2016;48(1):2–9.

23. Mundlos S, Horn D. Limb Malformations - An Atlas of Genetic Disorders of Limb Development. Softcover. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014; 2014.
24. Hospital BC. Polydactyly | Diagnosis & Treatment [Internet]. <https://www.childrenshospital.org/>. 2021. Available from: <https://www.childrenshospital.org/conditions-and-treatments/conditions/p/polydactyly/diagnosis-and-treatment>
25. Oniya O, Neves K, Ahmed B, Konje JC. A review of the reproductive consequences of consanguinity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019 Jan;232:87–96.
26. Bittles A. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clin Genet.* 2001;14(60):89–98.
27. AUTOSOMAL RECESSIVE INHERITANCE. Vol. Fact Sheet, Health Center for Genetics Education. 2020. p. 1–6.
28. Bittles A. The Role and Significance of Consanguinity as a Demographic Variable. *Popul Dev Rev.* 1994;20:561–84.
29. Hussain R. Community perceptions of reasons for preference for consanguineous marriages in Pakistan. *J Biosoc Sci.* 1999 Oct;31(4):449–61.
30. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [Internet]. 2001;409(6822):860–921. Available from: <https://doi.org/10.1038/35057062>
31. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001;409(6822):928–33.
32. LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: A decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(13):4181–93.
33. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 2010;464(7289):704–12.
34. Mills RE, Walter K, Steqart C, Handsaker RE, Chen K. Mapping copy number variation by population scale genome sequencing. *Nature* [Internet]. 2011;176(10):59–65. Available from: file:///C:/Users/Carla

- Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf
35. Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nürnberg P. HomozygosityMapper - An interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(SUPPL. 2):593–9.
  36. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2012;20(5):490–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2011.258>
  37. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* [Internet]. 2011 Sep 1;48(9):580 LP – 589. Available from: <http://jmg.bmj.com/content/48/9/580.abstract>
  38. Coonrod EM, Durtschi JD, Margraf RL, Voelkerding K V. Developing genome and exome sequencing for candidate gene identification in inherited disorders: An integrated technical and bioinformatics approach. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(3):415–33.
  39. Desjardins P, Hansen JB, Allen M. Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *J Vis Exp.* 2010;(33):1–4.
  40. Kalsoom U-, Klopocki E, Wasif N, Tariq M, Khan S, Hecht J, et al. Whole exome sequencing identified a novel zinc-finger gene (ZNF141) associated with autosomal recessive postaxial polydactyly type A. *J Med Genet* [Internet]. 2013 Jan 1;50(1):47 LP – 53. Available from: <http://jmg.bmj.com/content/50/1/47.abstract>
  41. Sanger F, S. N, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463–7.
  42. Life Technologies Corporation. Applied Biosystems® 3130 / 3130 xl Genetic Analyzers. 2012.
  43. Bachmann-Gagescu R, Phelps IG, Dempsey JC, Sharma VA, Ishak GE, Boyle EA, et al. KIAA0586 is Mutated in Joubert Syndrome. *Hum Mutat* [Internet]. 2015;36(9):831–5. Available from: <https://doi.org/10.1002/humu.22821>
  44. Wang T, Xuan Z, Dou Y, Liu Y, Fu Y, Ren J, et al. Identification of novel mutations in preaxial polydactyly patients through whole-exome sequencing.

- Mol Genet Genomic Med. 2019;7(6):1–7.
45. Bacino CA, Dhar SU, Brunetti-Pierri N, Lee B, Bonnen PE. WDR35 mutation in siblings with Sensenbrenner syndrome: A ciliopathy with variable phenotype. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2012;158A(11):2917–24. Available from: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35608>
  46. Miller DB, Piccolo SR. Compound Heterozygous Variants in Pediatric Cancers: A Systematic Review. *Front Genet*. 2020;11(May):1–11.
  47. Karolchik D, Hinricks AS, Furey TS, Roskin KM, Sugnet CW, Haussler D, et al. The UCSC table browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(DATABASE ISS.):493–6.