

Aus dem Institut für medizinische Genetik und Humangenetik der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neue molekulare Ursachen der Brachydaktylie Typ E:  
Screening einer Kohorte von 67 nicht verwandten Familien

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laure Bosquillon de Jarcy

aus Eschweiler

Datum der Promotion: 22.09.2017

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract (dt.).....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract (engl.).....</b>	<b>2</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Klinik der Brachydaktylie .....	3
1.2 Brachydaktylie Typ E – genetische Ursachen .....	6
1.3 PTHLH und ZNF521 als Regulatoren der Knochenentwicklung .....	8
1.4 Copy Number Variations (CNV's).....	11
1.5 Cis-regulatorische Elemente .....	13
1.6 <i>HOX</i> Gene: Entwicklung und Fehlbildung von Extremitäten .....	16
1.7 Fragestellung .....	19
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1 Material .....	20
2.1.1 Geräte und Zubehör .....	20
2.1.2 PCR.....	21
2.1.3 Gelelektrophorese .....	21
2.1.4 PCR Aufreinigung .....	22
2.1.5 Sequenzierung nach Sanger.....	22
2.1.6 Microarray.....	22
2.1.7 qPCR.....	24
2.1.8 Sonstige Verbrauchsmaterialien .....	24
2.1.9 PC-Programme und Internet - Datenbanken.....	24
2.2 Methoden .....	25
2.2.1 Primerdesign .....	25
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
2.2.3 Sequenzierung nach Sanger.....	27
2.2.4 Mikroarray - basierte komparative genomische Hybridisierung .....	28
2.2.5 Quantitative Real Time PCR (qPCR) .....	30
2.3 Kohorte .....	32
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1 Etablierung der PCR und Sanger-Sequenzierung für <i>ZNF521</i> .....	33
3.2 Ergebnisse der Sequenzierung von <i>ZNF521</i> in der Patientenkohorte .....	34

3.2.1 Analyse der synonymen Varianten innerhalb der Patientenkohorte.....	34
3.2.2 Analyse der nicht-synonymen Punktmutationen in der BDE Kohorte .....	39
3.3 Veränderung im regulatorischen Bereich des <i>HOXD</i> Clusters .....	43
3.3.1 Ergebnisse der Array CGH .....	43
3.3.2 Segregationsanalyse via qPCR .....	45
3.3.3 Screening der restlichen Kohorte auf diese Veränderung via qPCR und Sanger Sequenzierung .....	49
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>52</b>
4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse .....	52
4.1.1 Mutationen in <i>ZNF521</i> sind eine mögliche Ursache von BDE und Kleinwuchs.....	52
4.1.2 Deletionen im regulatorischen Archipel des <i>HOXD</i> Clusters führen im Menschen zur Ausprägung einer Brachydaktylie Typ E.....	53
4.1.3 Punktmutationen im regulatorischen Archipel des <i>HOXD</i> Clusters sind eine mögliche Ursache für die Ausprägung einer BDE oder einer BDA .....	54
4.2 Schwächen der vorliegenden Arbeit.....	55
4.2.1 Eingeschränkte Aussagekraft der Segregationsanalysen.....	55
4.2.2 Geringe Fallzahl der non-synonymen Punktmutation in <i>ZNF521</i> .....	56
4.2.3 Schwierige Zuordnung der Phänotypen durch multiple Klinik.....	56
4.3 Zusammenfassung, Schlussfolgerungen und Ausblick .....	57
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>6. Weitere Verzeichnisse.....</b>	<b>69</b>
6.1 Abbildungsverzeichnis.....	69
6.2 Tabellenverzeichnis .....	70
<b>7. Anhang.....</b>	<b>71</b>
7.1 Cyclerprogramme.....	71
7.2 Primer-Sequenzen .....	72
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>74</b>
<b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....</b>	<b>76</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>77</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>78</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ACRDYS	Akrodystostose
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDA	Brachydaktylie Typ A
BDB	Brachydaktylie Typ B
BDC	Brachydaktylie Typ C
BDD	Brachydaktylie Typ D
BDE	Brachydaktylie Typ E
BDMR	Brachydaktylie mit mentaler Retardierung
bds.	beidseits
bidest	zweifach destilliert
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CACHD1	Cache domain containing 1
CDMP1	Cartilage-derived Morphogenetic Protein-1
Cen	Zentromer
CGH	Comparative genomic Hybridisation
CISTR-ACT	Chondrogenesis-associated Transcript
CNV	Copy Number Variation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cys	Cystein
D	Deutschland
d.h.	das heißt
dest	destilliert
DNA	Desoyribonucleinacid

dNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
dt.	Deutsch
E	embryonischer Entwicklungstag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
Entspr.	Entsprechend
Et al.	et alii
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FoSTeS	Fork Stalling and Template Switching
G	Guanin
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H+	Wasserstoffkern (Proton)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCL	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HDAC4	Histon Deacetylase 4
HOX	Homeobox Gene
i.d.R.	in der Regel
IHH	Indian Hedgehog
K+	Kalium-Ion
kb	Kilobase(n)
L	links
l	Liter
LacZ	Gen, codiert für das Enzym $\beta$ -Galactosidase ( <i>E. coli</i> )
LCR	Low Copy Repeat
Li	links
m	Milli
M	Molar
mg	Milligramm
min.	Minute
mind.	mindestens
Mio.	Millionen
ml	Milliliter

mmol/l	Millimol pro Liter
Mrd.	Milliarden
mRNA	Messenger RNA
ms	Millisekunde
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NAHR	Nicht-allelische homologe Rekombination
ng	Nanogramm
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung
p	pico
P	Prolin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE4D	Phosphodiesterase 4D
pH	potentium hydrogenii
PHP	Pseudohypoparathyreoidismus
PRKAR1A	Protein Kinase Type I-alpha Regulatory Subunit
PTH	Parathormon
PTH LH	Parathyroidhormone-like-hormone
PTHr	Parathormonrezeptor
Q	Glutamin
qPCR	Quantitative Real-Time-PCR
R	rechts
R	Arginin
Re	rechts
RNA	Ribonucleinacid
ROR	Receptor Tyrosine Kinase like Orphan Receptor
RT	Raumtemperatur
Runx2	Runt related Transcription Factor 2
s	Sekunde(n)
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat

SHH	Sonic Hedgehog
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sog.	sogennant(e/s/n)
SSPE	Standard Sodium Phosphate EDTA
STX16	Syntaxin 16
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TE	Puffer aus Tris und EDTA
TEA	Triethanolamin
Tel	Telomer
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
t-RNA	Transfer-RNA
TRPS	Tricho-Rhino-Phalangeal Syndrom
TS	Turner Syndrom
TSH	Thyroid-stimulating-hormone
U	Unit
u.a.	unter anderem
UBE2U	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 U
USA	United States of America
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNF521	Zinkfingerprotein 521
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## Abstract (dt.)

Brachydaktylie Typ E (BDE) beschreibt eine Fehlbildung der Extremitäten, die durch das Fehlen oder die Verkürzung von Mittelphalangen charakterisiert wird. Die genetischen Ursachen der Erkrankung sind mehrheitlich ungeklärt. *ZNF521* ist ein relevanter Transkriptionsfaktor während der Knochenentwicklung und direkter Effektor von *PTHLH*, das als bekanntes Krankheitsgen für die Entstehung der BDE beschrieben ist. Um die Rolle von *ZNF521* an der Krankheitsentstehung der BDE zu klären, wurde das Gen in 67 nicht verwandten Familien mit BDE auf Mutationen via Sanger Sequenzierung untersucht. Zusätzlich wurde in 11 Familien mit gleicher Klinik das nicht-kodierende Genom und insbesondere der regulatorische Archipel vor dem *HOXD* Cluster via Array CGH analysiert, da Mutationen in *HOXD* ebenfalls zur Ausprägung einer BDE führen. Die Validierung erfolgte via qPCR. In einer Familie wurde eine bislang unbekannte Punktmutation in *ZNF521* gefunden, die durch Prädiktionsprogramme mit einer hohen Wahrscheinlichkeit als pathogen eingestuft wird. Um sie als Pathologie zu beweisen, sollten weitere Fälle beschrieben und ein Beweis mit einem Mausmodell erbracht werden. Im regulatorischen Archipel des *HOXD* Clusters wurde in einer Familie eine bislang nicht beschriebene Deletion von vier nicht-kodierenden regulatorischen Islands gefunden. Diese Deletion zeigte sich im Laufe weiterer Forschung durch Untersuchungen an einem Mausmodell als ursächliche Mutation für die BDE. Dementsprechend sollten weitere ungeklärte Brachydaktylie Fälle auf Mutationen in diesem Bereich untersucht werden. Die Erkenntnis über die Rolle des regulatorischen Archipels bei der Entwicklung von Extremitäten im Menschen liefert Informationen für das Verständnis der Physiologie und Pathologie der Knochenentwicklung und könnte möglicherweise für die Entwicklung von Therapien hilfreich sein.



## Abstract (engl.)

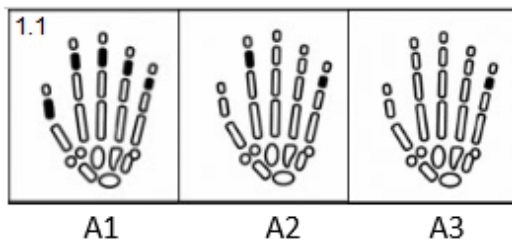
Brachydactyly type E (BDE) is a limb malformation characterized by missing or shortening of middle phalanges. Its genetic causes remain mostly unknown. *ZNF521* is an important transcription factor for bone development and direct effector of *PTHLH*, mutations of which are already known to cause BDE. In order to investigate the role of mutations in *ZNF521* in disease development, 67 unrelated families with BDE were screened via Sanger sequencing. In addition, 11 families of the same cohort were screened via Array CGH for mutations in the noncoding regions of the genome. Special emphasis was laid on the regulatory archipelago of the *HOXD* cluster, as mutations in this area are already known to cause BDE. The results were validated via qPCR. Sanger sequencing showed a so far unknown missense mutation in *ZNF521* which various prediction software programs classified as probably disease causing. A further case should be found to increase the probability of pathogenicity, whereas the final proof could be furnished by a mouse model. Furthermore, a so far unknown deletion involving four regulatory islands of the *HOXD* Cluster was found in one family. Further research brought up a mouse model proving this deletion to be disease causing. Therefore, more cases of BDE of unknown origin should be checked for mutations in the regulatory domain of the *HOXD* Cluster. The awareness about its impact on limb development in human organisms increases the comprehension of physiology and pathology of bone development and could be helpful for future therapy progress.

# 1. Einleitung

## 1.1 Klinik der Brachydaktylie

Brachydaktylie, auch „Kurzfingerigkeit“, beschreibt eine Gruppe von Fehlbildungen der Extremitäten, die durch eine disproportionale Verkürzung oder das Fehlen von Fingern und/oder Zehen charakterisiert ist. Ursache ist die fehlerhafte Entwicklung der Metacarpalia, Metatarsalia oder Phalangen<sup>1,2</sup>. Brachydaktylie ist selten und wird i.d.R. autosomal dominant vererbt. Sie kann isoliert oder als Teil von Syndromen auftreten. Beispielsweise kann sie mit Kleinwuchs und anderen Fehlbildungen der Extremitäten wie Syndaktylie, Polydaktylie und Symphalangismus einhergehen. Brachydaktylie gehört zur Gruppe der Dysostosen und man geht davon aus, dass die Störungen gewöhnlich in den ersten acht Wochen der Embryonalentwicklung entstehen und nur die genannten Knochen betreffen<sup>3,4</sup>. Abgegrenzt wird sie damit von Osteochondrodysplasien, die spätere Entwicklungsstörungen der Knochen bezeichnen und oft das gesamte Skelett betreffen<sup>3</sup>. Die Klassifikation nach Bell unterteilt die isolierte Brachydaktylie in fünf Gruppen: Brachydaktylie Typ A bis E<sup>1</sup>.

### Brachydaktylie Typ A (BDA)



**Abb. 1.1-1,5 Isolierte Brachydaktylie-Typen**  
Diese und folgende nach Mundlos<sup>1</sup>

BDA beschreibt die Verkürzung der Mittelphalangen. Je nach betroffenem Finger wird die BDA weiter in Typ A1 bis A3 unterteilt.

Bei der BDA1 sind die Mittelphalangen aller Finger verkürzt. Verursacht wird das Krankheitsbild durch

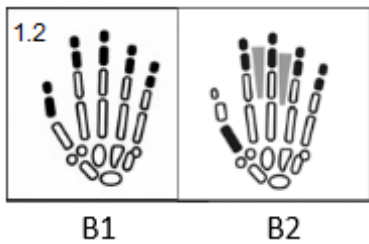
Punktmutationen im Indian Hedgehog (*IHH*)<sup>5,6</sup>.

*IHH* gehört zur Familie der Hedgehog

Signalproteine, die elementare Aufgaben für die Differenzierung von Chondrozyten übernehmen. Sind diese Signalkaskaden gestört, kommt es zu Fehlern bei der Knochen- und Gelenkausbildung<sup>1</sup>. Bei BDA2 sind die Mittelphalangen des zweiten und fünften Fingers verkürzt oder fehlen ganz. Die Ursache sind verschiedene Mutationen im Signalweg des bone morphogenetic proteins (*BMP*)<sup>7,8</sup>, das eine Rolle im Prozess der Knorpel- und Knochenentwicklung spielt<sup>9</sup>. Die BDA3 ist charakterisiert durch die Verkürzung der Mittelphalanx im kleinen Finger. Bisher ist kein Gen für die isolierte BDA3 bekannt<sup>1</sup>. Im Gegensatz zu den anderen seltenen Formen der Brachydaktylie kommt

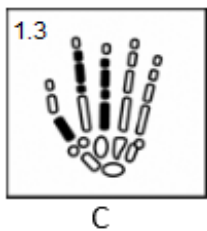
BDA3 häufig vor: mit einer Prävalenz von 2 bis 4% <sup>10</sup>.

### Brachydaktylie Typ B (BDB)



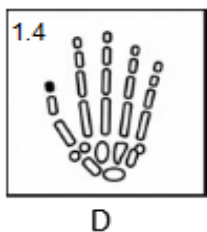
BDB bezeichnet die Hypo- oder Aplasie der Endphalangen. Es gibt auch hier eine Untergliederung in Typ B1 und B2. Bei BDB1 sind die Endphalangen verkürzt - kein Symphalangismus, keine Syndaktylie. Oft fehlen auch die Fingernägel. In einigen Fällen sind zusätzlich die Mittelphalangen verkürzt. Die Endphalanx des Daumens kann in schweren Fällen gespalten, verdoppelt oder abgeflacht sein <sup>1,2</sup>. Ursächlich sind Mutationen im Tyrosin Kinase Rezeptor *ROR2* <sup>11,12</sup>. BDB2 beinhaltet die Verkürzung der Endphalangen in Kombination mit Symphalangismus, kutaner Syndaktylie oder Fusion der Metacarpalia/Metatarsalia <sup>1</sup>. Typischerweise sind Ringfinger und kleiner Finger schwerer betroffen als der Zeige- und Mittelfinger. BDB2 wird durch Punktmutationen in *NOGGIN* verursacht <sup>13</sup>.

### Brachydaktylie Typ C (BDC)



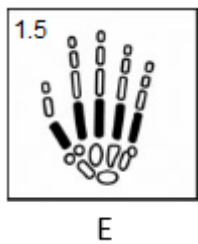
Bei BDC sind die Mittelphalangen des Zeige-, Mittel- und kleinen Fingers verkürzt. Dazu kommen eine Hypoplasie des ersten Metacarpalknochens sowie eine Hyperphalangie des Zeige- und/oder Mittelfingers. Der Ringfinger ist gewöhnlich der längste Finger. Für die dominante Form der BDC sind heterozygote Raster- oder Punktmutationen im cartilage-derived morphogenetic protein-1 (*CDMP1*), auch *GDF5* genannt, verantwortlich. Es spielt eine Schlüsselrolle während der Knochen- und Gelenkentwicklung <sup>14</sup>. Zusätzlich gibt es eine rezessive Form der BDC, die durch eine homozygote Punktmutation innerhalb der *CDMP1* Prodomäne verursacht wird <sup>15</sup>.

### Brachydaktylie Typ D (BDD)



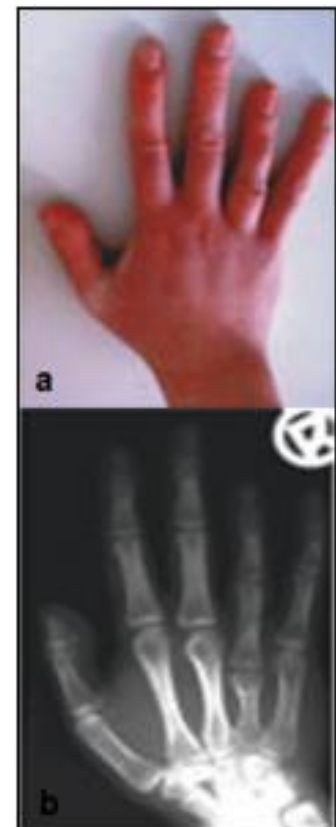
BDD bezeichnet die Verkürzung der Endphalanx des Daumens. Ähnlich wie die BDA3 kommt sie mit einer Prävalenz von 2 bis 4% häufig vor <sup>10</sup>. Außerdem können die Zehen verbreitert sein. Die Ursachen sind größtenteils unbekannt. In einem Individuum wurde eine Mutation in *HOXD13* beschrieben. HOX Gene sind im Allgemeinen für die Segmentierung des Körpers während der Embryonalentwicklung verantwortlich, u.a. auch für die Entwicklung der Extremitäten <sup>16</sup>.

## Brachydaktylie Typ E (BDE)



BDE wird durch die Verkürzung der Metacarpalia/Metatarsalia charakterisiert. Der Phänotyp resultiert aus hypoplastischen und teilweise verwachsenen metacarpalen Epiphysen, die auf Röntgenbildern zu erkennen sind. Die distalen Phalangen sind oft ebenfalls verkürzt. Diese Veränderungen sind meist asymmetrisch. Häufig liegt zusätzlich eine Überstreckbarkeit der Handgelenke vor. Außerdem haben einige Betroffene einen leichten Kleinwuchs und ein abgerundetes Gesicht <sup>2</sup>. Hertzog <sup>17</sup> schlägt eine Unterteilung der BDE in drei Untergruppen vor: BDE1 mit Verkürzung des vierten Metacarpale, BDE2 mit Verkürzung des vierten und fünften Metacarpale sowie der distalen Phalanx des Daumens und BDE3 mit anderen Kombinationen verkürzter Metacarpalknochen und ohne Beteiligung der Phalangen. Allerdings lässt sich nicht jeder Phänotyp nach diesem Schema einordnen <sup>18</sup>. Die genetischen Ursachen von BDE werden in Kapitel 1.2 genauer beschrieben.

Alle beschriebenen Formen der Brachydaktylie können zusammen mit anderen Symptomen als Teil von Syndromen auftreten. Ein Beispiel dafür ist das Hand-Fuß-Genital-Syndrom, das dominant vererbt wird und die distalen Extremitäten sowie den unteren Urogenitaltrakt betrifft. An den Extremitäten fallen ein verkürzter erster Metacarpalknochen und verkürzte distale Phalangen auf. Im Urogenitaltrakt können Hypospadie, Mikropenis oder ein doppelt angelegter Uterus auftreten <sup>1</sup>. Ursächlich sind Stopp- oder Frameshift-Mutationen im *HOXA13* Gen <sup>19</sup>. Ein anderes Beispiel ist das Feingold Syndrom, bei dem die Mittelphalangen des Zeige- und kleinen Fingers hypoplastisch sind – ähnlich wie bei BDA2. Zusätzlich zeigen die Patienten Syndaktylie der Zehen und fasziale Anomalien. Ein persistierender Ductus arteriosus sowie gastrointestinale Atresien gehören mit zum Bild des Syndroms <sup>1</sup>. Ursache hierfür sind Mutationen im Onkogen *NMYC*, das die Bildung von Transkriptionsfaktoren induziert <sup>20</sup>. Es ist im Signalweg von Sonic Hedgehog (*SHH*) integriert <sup>21</sup>, das in der Embryonalentwicklung u.a. für die Entwicklung von Gliedmaßen



**Abb. 2 Klinik der BDE**  
 a Verkürzter Digitus 4  
 b Entspr. Röntgenaufnahme mit sichtbar verkürztem Metacarpalknochen 4.  
 Nach Mundlos <sup>1</sup>

verantwortlich ist <sup>22</sup>. Die Diagnose der Brachydaktylie wird klinisch, anthropometrisch und radiologisch gestellt. Eine Therapie ist nur selten notwendig, sollte aber bedacht werden, wenn die Funktionalität der Hand gestört ist. In diesem Fall bietet sich plastische Chirurgie und/oder Physio- bzw. Ergotherapie an. Eine kausale Therapie gibt es derzeit nicht <sup>2</sup>.

## 1.2 Brachydaktylie Typ E – genetische Ursachen

In den meisten Fällen tritt die BDE nicht isoliert, sondern als Teil von syndromalen Erkrankungen auf. Im Folgenden sind die Syndrome beschrieben, deren genetische Ursachen bereits bekannt sind. Die zahlreichen Krankheitsbilder können in Syndrome mit und ohne Hormonresistenz gegen Parathormon (PTH) und/oder Schilddrüsenhormon (TSH) eingeteilt werden. Diese Aufteilung ist für die Diagnostik sinnvoll, weil die meisten Kinder zunächst endokrinologisch durch Wachstumsprobleme auffallen <sup>18</sup>.

### **Syndrome mit Hormonresistenz gegen PTH/TSH**

Pseudohypoparathyreoidismus (PHP) ist eine PTH Resistenz, die zu Hypocalcämie und Hyperphosphatämie führt <sup>23</sup>. Eine BDE kommt bei 70-78% der Patienten mit PHP vor <sup>24</sup>. Die Ursache sind heterozygote Mutationen in *GNAS*, das u.a. für die Alpha-Untereinheit des G-Proteins kodiert. Dieses verbreitete Signalprotein ist unerlässlich für zahlreiche zelluläre Antworten <sup>25</sup>. Es gibt auch bekannte Deletionen des Syntaxin 16 Gens (*STX16*). Sie führen zu einer gestörten Methylierungen von *GNAS* Exonen, die wiederum die Funktionalität des G-Proteins beeinträchtigen <sup>26,27</sup>.

Akrodysostose mit Hormonresistenz (ACRDYS1) ist eine seltene Skeletterkrankung mit schwerer BDE der Hände und Füße als Leitsymptom, außerdem Dysostose, Kleinwuchs und fasziale Anomalien wie Hypoplasie der Kiefer, Nase und Hypertelorismus <sup>28</sup>. Dazu kommt eine Resistenz gegen PTH/TSH <sup>29</sup>. Akrodysostose wird durch Mutationen der cAMP abhängigen Proteinkinase A (*PRKAR1A*) verursacht, die im Signalweg unterhalb von *GNAS* eingegliedert ist <sup>28,30</sup>.

### **Syndrome ohne Hormonresistenz gegen PTH/TSH**

Das Bluthochdruck-Brachydaktylie-Syndrom beschreibt das gemeinsame Auftreten von Hypertension im Kindesalter und BDE. In einer beschriebenen Familie waren die

Betroffenen im Durchschnitt 10cm kleiner als ihre gesunden Verwandten<sup>31</sup>. Auf Chromosom 12 (12p12.2-p12.1) wurde eine Region mit Deletion, Reinsertion und Inversion beschrieben, die den Phänotyp verursacht<sup>32</sup>. Welches Gen in dieser Region die Schlüsselrolle für die Erkrankung spielt, ist noch nicht abschließend geklärt<sup>18</sup>.

Die Brachydaktylie mit Kleinwuchs vom PTHLH Typ beschreibt BDE mit Kleinwuchs. Makrocephalie, Zahnprobleme, prominente Stirn und abgeflachte Nasenwurzel können das Bild ergänzen<sup>33</sup>. Klopocki et al. konnten zeigen, dass verschiedene Mutationen im kodierenden und regulatorischen Bereich des Parathormon-like-Hormons (*PTHLH*) für das Krankheitsbild verantwortlich sind. *PTHLH* interagiert mit anderen Genen, die eine Rolle bei der Chondrogenese spielen<sup>34</sup>. Zu den Mutationen zählen eine Deletion und vier Punktmutationen sowie zwei Duplikationen<sup>35-38</sup>. Im regulatorischen Bereich von *PTHLH* ist eine Translokation beschrieben, bei dem der Regulator *CISTR-ACT* seine Position in der Nähe von *PTHLH* verliert und so dessen Expression nicht mehr korrekt regulieren kann<sup>39</sup>.

Die Brachydaktylie mit mentaler Retardierung (BDMR) wird auch Albright hereditäre Osteodystrophie like Syndrom (AHO-like Syndrom) genannt. Der Phänotyp ist vielfältig – mit Kleinwuchs, Adipositas, Entwicklungsverzögerung, Verhaltensstörungen, Autismus, kraniofaszialen Anomalien und Skelettfehlbildungen, wie BDE<sup>40</sup>. Ursache ist eine Deletion auf Chromosom 2q37. Das verantwortliche Gen im deletierten Bereich ist das der Histon-Deacetylase 4 (*HDAC4*)<sup>41</sup>. Außer der Deletion verursachen auch Punktmutationen in *HDAC4* BDMR<sup>42</sup>. Die Histon-Deacetylase ist an der Knochen-, Muskel-, Nerven- und Herzentwicklung beteiligt<sup>43</sup>.

Bei Akrodysostose ohne hormonelle Resistenz (ACRDYS2): gleicht der Phänotyp mit Ausnahme der Resistenz gegen PTH/TSH dem der ACRDYS1 mit hormoneller Resistenz (s.o.). Weiteres Unterscheidungsmerkmal sind fasziale Dysostosen und intellektuelle Störungen, die bei ACRDYS2 häufiger auftreten als bei ACRDYS1<sup>28,44</sup>. Ursächlich sind Mutationen im Gen der Phosphodiesterase 4D (*PDE4D*)<sup>45</sup>.

Merkmale des Tricho-Rhino-Phalangeal Syndroms (TRPS) sind spärliches, langsam wachsendes Kopfhhaar, spärliche Augenbrauen, langes Philtrum und kolbige Nasenspitze. Radiologisch fallen u.a. BDE und Kleinwuchs auf. Das Syndrom wird durch

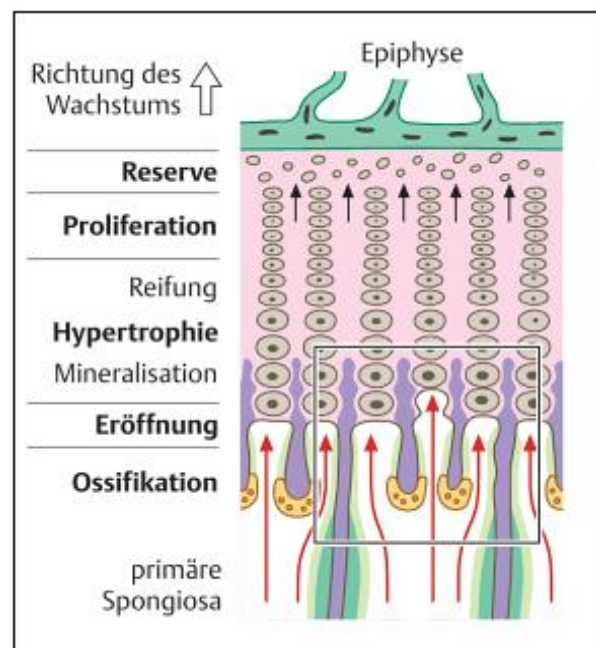
Punkt- oder Stoppmutationen im *TRPS1* Gen verursacht <sup>46</sup>.

Das Turner Syndrom (TS) ist eine chromosomale Aberration mit partieller oder vollständiger Monosomie X. Symptome sind Kleinwuchs, verspätete Pubertät, primäre Amenorrhoe, Östrogeninsuffizienz, Herzfehler und andere Fehlbildungen wie BDE <sup>47</sup>.

Ursache für die isolierte BDE sind verschiedene Mutationen in *HOXD13*, das mit Fehlbildungen der Extremitäten und des Urogenitalsystems assoziiert ist. Bisher sind zwei Punktmutationen und zwei Stoppmutationen bekannt <sup>16,48-50</sup>. Phänotypisch ist meist der dritte Metacarpalknochen verkürzt. Die Körpergröße ist normal <sup>18</sup>. Isolierte BDE ist selten und folgt einem autosomal dominanten Erbgang. Der Phänotyp hat eine variable Penetranz und kann sich selbst innerhalb der Betroffenen einer Familie unterscheiden <sup>10</sup>.

### 1.3 PTHLH und ZNF521 als Regulatoren der Knochenentwicklung

Die Knochenentwicklung läuft in folgenden Abschnitten ab: Zunächst entstehen aus embryonalem Mesenchym Chondrozyten, die eine vorläufige Knorpelstruktur bilden. Zu Beginn ihrer Lebenszeit proliferieren sie in Wachstumsrichtung und sorgen so für das Längenwachstum des späteren Knochens. Danach differenzieren sich die Chondrozyten, hypertrophieren und induzieren die Ossifikation durch Mineralisation der Knorpelmatrix. Anschließend gehen die Chondrozyten in Apoptose. Sobald die Proliferation der undifferenzierten Chondrozyten nachlässt,



**Abb. 3 Wachstumsplatte** (Schema)

Nach Lüllmann-Rauch <sup>51</sup>

überholt die Ossifikationszone die Proliferationszone und verknöchert die Wachstumsplatte. Das führt zum Wachstumsfugenschluss und lässt kein weiteres Knochenwachstum mehr zu <sup>51,52</sup>. Das Gleichgewicht der Proliferation und Ossifikation ist für ein gesundes Knochenwachstum daher entscheidend. PTHLH reguliert diesen Prozess über verschiedene Mechanismen <sup>35</sup>: Während der Knochenentwicklung wird

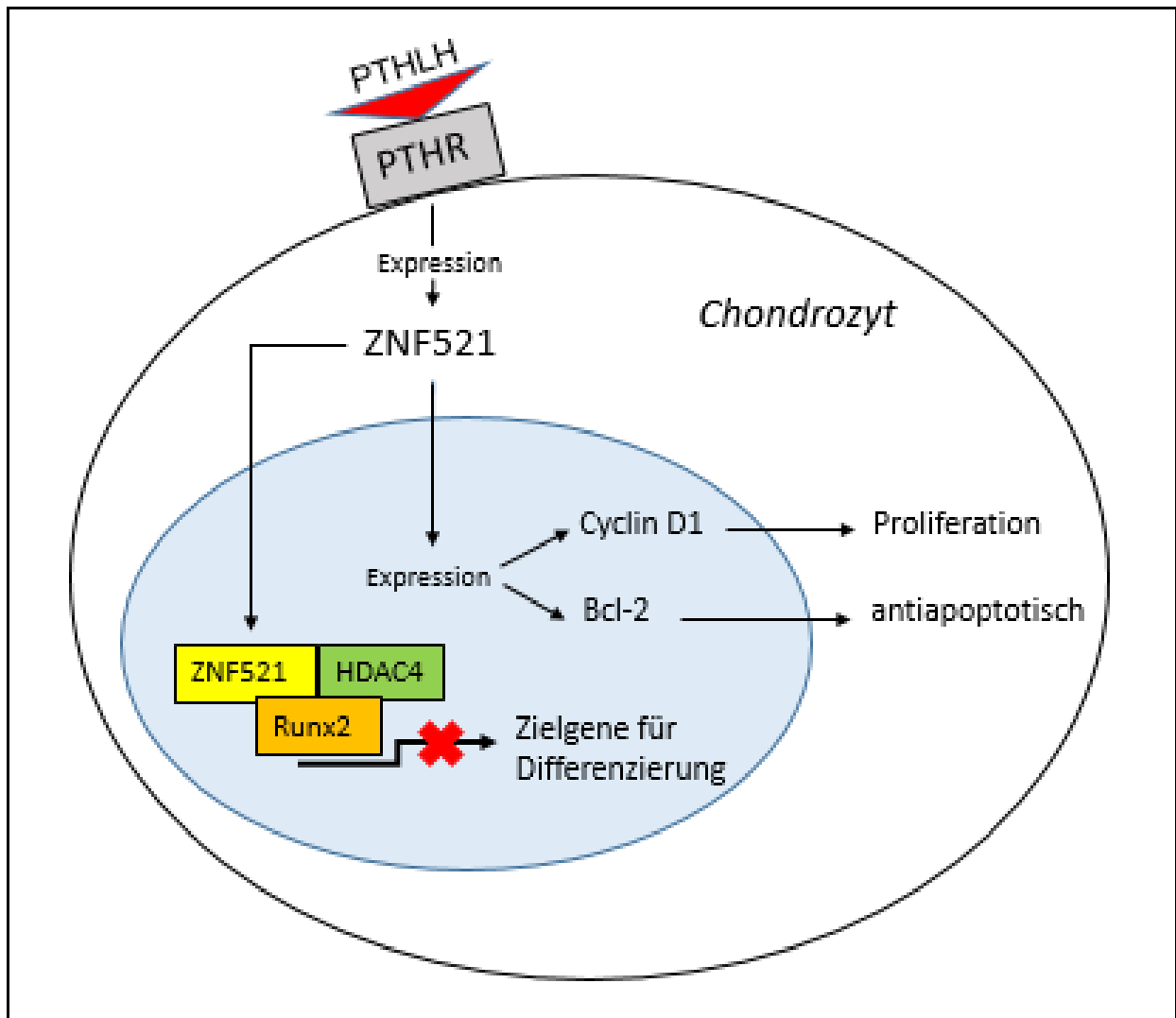
*PTH LH* an den distalen Enden der Knorpelanlage und im Perichondrium exprimiert. Es bindet an den Parathormon-Rezeptor (PTHR) der undifferenzierten Chondrozyten. Durch die folgende Signalkaskade wird ihre Proliferation über Cyclin D1 vorangetrieben, was die Ossifikation verzögert und das Längenwachstum des Knochens fördert<sup>53</sup>. Außerdem hemmt *PTH LH* *Runx2* über die Bildung eines Komplexes mit HDAC4. *Runx2* induziert die Hypertrophie von Chondrozyten, was die Verknöcherung der Wachstumsplatte beschleunigt<sup>54</sup>. Zusätzlich wird das anti-apoptotische Protein *Bcl-2* von *PTH LH* hochreguliert. Es verhindert die Apoptose der hypertrophen Chondrozyten und verzögert den letzten Schritt zur Ossifikation<sup>55</sup>. So beugt *PTH LH* insgesamt dem verfrühten Schluss der Epiphysenfugen und der Entstehung verkürzter Knochen vor<sup>56-59</sup>.

### **ZNF521 ist ein Effektor von PTH LH**

*PTH LH* induziert in undifferenzierten Chondrozyten die Expression des Zinkfinger-Proteins 521 (*ZNF521*)<sup>55</sup>. *ZNF521* ist ein Transkriptionsfaktor, der über seine 30 Zinkfinger Domänen an DNA binden kann, um Genexpression zu regulieren<sup>60,61</sup>. Correa et al. konnten zeigen, dass *PTH LH* seine Effekte ohne *ZNF521* nicht mehr induzieren kann. Phänotypisch ähneln die *ZNF521*-Knockout-Mäuse den *PTH LH*-Knockout-Mäusen. Sie zeigen eine erhöhte Expression von *Runx2* und eine verminderte Expression von *Cyclin D1* sowie von *Bcl-2*.

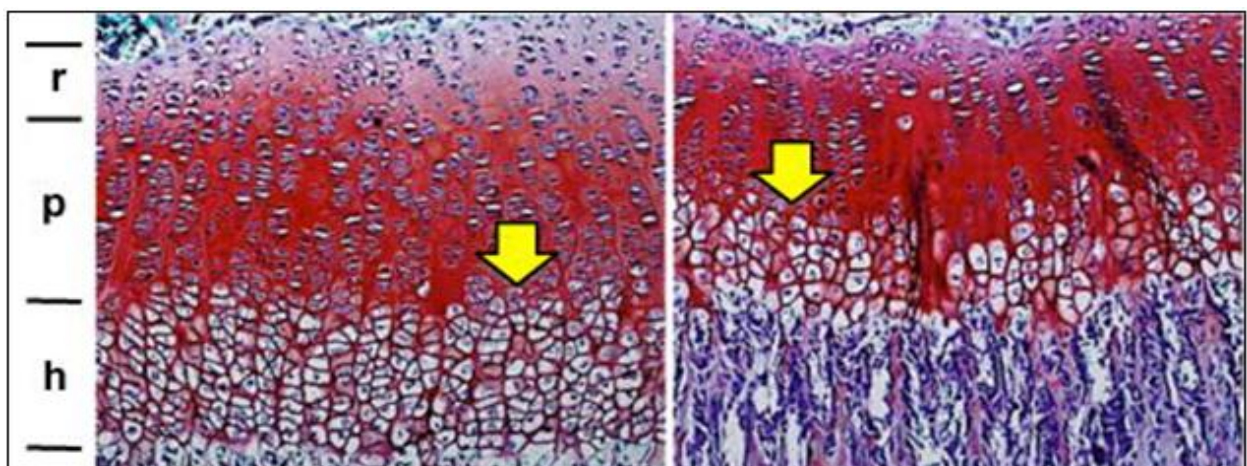
In der Wachstumsplatte fällt auf, dass der Übergang von Proliferations- in Hypertrophiezone näher an der Epiphyse liegt als bei Mäusen mit aktivem *ZNF521* (s. Abb. 5). Insgesamt sind die Knochen endochondraler Genese bei den *ZNF521*-Knockout-Mäusen verkürzt, während die Knochen aus desmaler Ossifikation (bspw. Schädelknochen) nicht betroffen sind. Diese Befunde sprechen für *ZNF521* als Effektor im Signalweg unterhalb von *PTH LH*<sup>55</sup>. Außerdem passen sie zur Klinik der BDE vom *PTH LH*-Typ im Menschen: Häufig sind im Röntgenbild der Hand kegelförmige Epiphysen zu sehen, die auf verfrüht verschlossene Wachstumsfugen hinweisen<sup>36</sup>. Durch den vorzeitigen Wachstumsstopp kommt es bei den Patienten zur Verkürzung der betroffenen Metacarpalia (Brachydaktylie) und anderer Knochen (Kleinwuchs)<sup>35</sup>.





**Abb. 4 Vereinfachter Signalweg von ZNF521**

In Anlehnung an Correa et al.<sup>55</sup>



**Abb. 5 Proximale Tibia-Wachstumsplatte, Safraninfärbung**

Mäuse in zweiter Lebenswoche, Kontrolle (li) - ZNF521 Knockout (re). r = Reservezone, p = Proliferationszone, h = Hypertrophiezone. Gelber Pfeil markiert Übergang von p zu h. Alle Zonen im Knockout verschmälert, p/h Übergang näher an Epiphyse. Hinweis auf verfrühte Differenzierung im Knockout.

Nach Correa et al.<sup>55</sup>

## 1.4 Copy Number Variations (CNV's)

Hereditäre Erkrankungen entstehen durch verschiedene Veränderungen des Genoms. Das können Abweichungen einzelner Nukleotide sein (Punkt-, Frameshift- oder Stoppmutationen), die über eine modifizierte Aminosäuresequenz zur Bildung dysfunktionaler Proteine führen. Doch auch strukturelle Veränderungen der Chromosomen wie Deletionen oder Duplikationen, die mit einer Veränderung der Anzahl von Genkopien einhergehen, können pathogene Effekte haben. Diese Variationen werden Copy number variations (CNV's) genannt<sup>62</sup>. Der krankheitsverursachende Effekt beruht dabei auf einer abweichenden Dosis korrekt funktionierender Proteine im Organismus. CNV's haben jedoch nicht immer pathologische Konsequenzen. Sie tragen bspw. zur phänotypischen Varianz bei und haben im Laufe der Evolution Selektionsvorteile mit sich gebracht. Insgesamt machen CNV's ca. 12% des menschlichen Genoms aus<sup>63,64</sup>. Für ihre Entstehung sind verschiedene Mechanismen bekannt:

### 1. Nicht-allelische homologe Rekombination (NAHR)

Bei der NAHR kommt es zur Rekombination von Regionen, die zwischen zwei oder mehreren Low Copy Repeats (LCR's) lokalisiert sind. LCR's sind nicht-allelische Regionen des Genoms, die untereinander eine Sequenzübereinstimmung von 95-97% aufweisen und ca. 5% des menschlichen Genoms ausmachen. Durch diese Homologien kann es beim Crossing Over zu einer Verbindung der LCR's untereinander mit Austausch genetischen Materials kommen. Je nach Ausrichtung der LCR's können dabei Duplikationen, Deletionen oder Inversionen entstehen. Anfänglich entsteht dadurch eine rein örtliche Verschiebung der Genkopien. Ereignen sie sich jedoch während der Meiose, führt die Trennung der Chromatiden zur Entstehung von Gameten, die statt einer Genkopie beispielsweise keine oder zwei Kopien des rekombinierten Gens tragen. So weist ein Nachkomme nicht mehr nur eine örtliche Strukturänderung auf, sondern auch eine veränderte Kopienanzahl der betroffenen Gene und regulatorischen Elemente<sup>65</sup>.

### 2. Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)

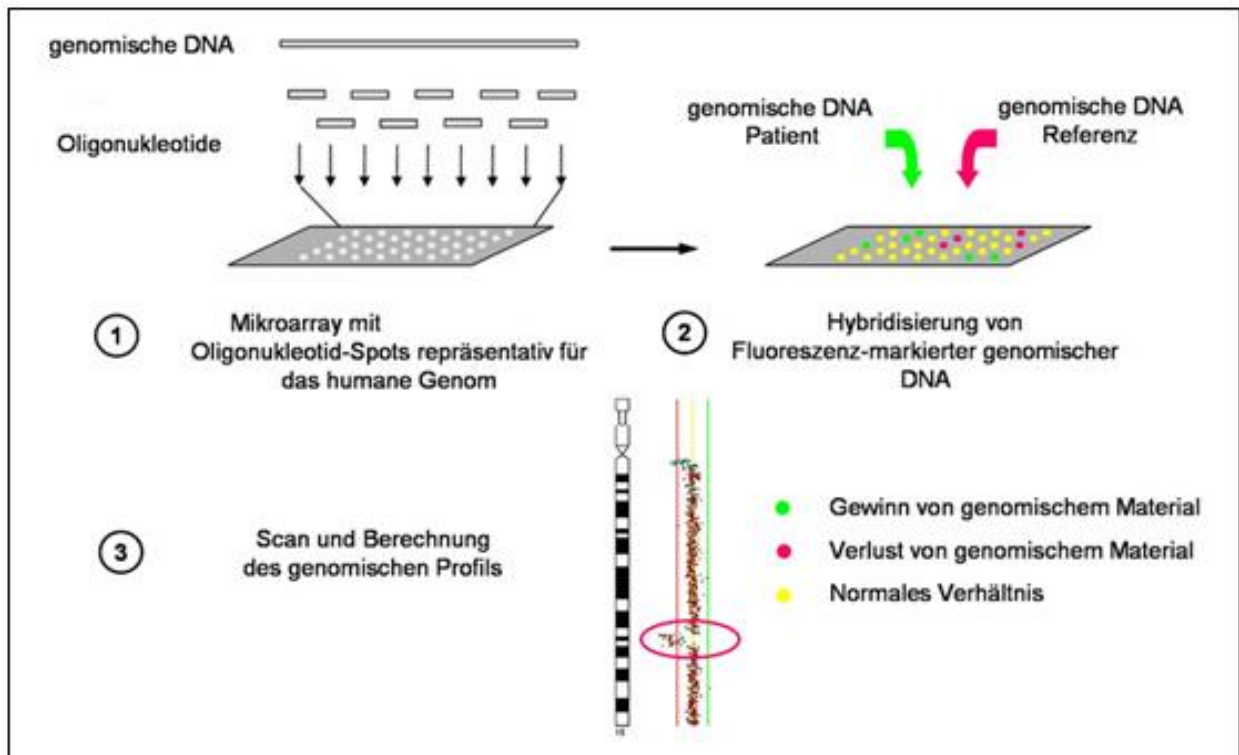
Die NHEJ stellt einen wichtigen Reparaturmechanismus bei DNA-Doppelstrangbrüchen dar. Die Bruchstelle wird von einem Proteinkomplex erkannt, modifiziert und wieder ligiert. Bei der Reparatur kann es zum Einbau zusätzlicher Nukleotide kommen<sup>66</sup>.

### 3. Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS)

Bei diesem Replikationsfehler wechselt die DNA-Polymerase den Matrizenstrang bzw. die Replikationsgabel und amplifiziert dort laufend weiter. Dieser Wechsel wird v.a. durch kleine sich ähnelnde Sequenzen des Genoms begünstigt, sog. Mikrohomologien. Der entstehende DNA-Strang weist dadurch strukturelle Veränderungen, bzw. CNV's auf, da z.B. der Bereich zwischen den neu ligierten mikrohomologen Sequenzen deletiert sein kann <sup>66</sup>.

### **Array-basierte komparative genomische Hybridisierung (Array CGH)**

Der Nachweis von CNV's erfolgt über die Mikroarray-basierte komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH). Diese Methode wurde 1997 eingeführt und ermöglicht die Untersuchung des gesamten Genoms auf Zugewinne oder Verluste genetischen Materials, d.h. auf Deletionen und Duplikationen <sup>67</sup>. Dabei werden Patienten- und Referenz-DNA mit einem jeweils andersfarbigen fluoreszierenden Farbstoff markiert und zerteilt. Anschließend werden beide DNA's zusammen auf einen Oligonukleotid-Array gegeben, der das gesamte Genom bruchstückhaft repräsentiert. Die DNA's binden an homologe Abschnitte der Oligonukleotide. Bei gleicher Menge von gebundener Patienten- und Referenz-DNA liest der Laserscanner auf dem Array einen Mischton beider Farbstoffe ab. Gibt es einen Überschuss an Patienten-DNA (Duplikation) oder an Referenz-DNA (Deletion im Patienten), fällt das Farbsignal der DNA mit der größeren Materialmenge stärker ins Gewicht. Ein Mengenunterschied kann so detektiert werden (s. Abb.6) <sup>68</sup>.



**Abb.6 Schematische Darstellung einer Array CGH**

Nach: [http://genetik.charite.de/diagnostik/array\\_cgh/](http://genetik.charite.de/diagnostik/array_cgh/) (09.11.2014)

Die 1M Array-CHG (1 Million Oligonukleotide) ermöglicht die Untersuchung von CNV's bis zu einer Auflösung von 5 bis 10kb<sup>69</sup>. Dabei werden sowohl kodierende Regionen des Genoms als auch nicht-kodierende Regionen berücksichtigt. Auch CNV's in nicht-kodierenden Bereichen des Genoms können Ursache für die Entwicklung hereditärer Erkrankungen sein, da dort die sog. cis-regulatorischen-Elemente liegen, die eine erhebliche Rolle für die Genregulation spielen<sup>70</sup>.

## 1.5 Cis-regulatorische Elemente

Entgegen der langjährigen Meinung, dass die Ursache genetischer Erkrankungen wie Brachydaktylie ausschließlich in den kodierenden 1,5% des Genoms zu suchen sei, gelang 2012 durch viele Studien der Nachweis zahlreicher cis-regulatorischer Elemente in den nicht-kodierenden Bereichen des Genoms<sup>71</sup>. Die darin gelegenen regulatorischen Elemente nehmen Einfluss auf die Expression proteinkodierender Gene und können daher entscheidend zur Krankheitsentstehung beitragen. Sie lassen sich je nach regulatorischer Funktion in regulatorische RNAs, Insulator-Elemente, Enhancer und

Silencer einteilen <sup>70</sup>. Diese Erkenntnis wurde durch das 2004 gegründete Projekt „Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)“ gewonnen, bei dem eine systematische Analyse des nicht-kodierenden Teils der DNA durchgeführt wurde. Dadurch wurde die gängige Meinung, dass es sich beim nicht-kodierenden Teil des Genoms um unwirksame „junk DNA“ handle, widerlegt. Diese Bereiche sind bei der pathogenetischen Aufklärung hereditärer Erkrankungen nun ebenso Gegenstand der Forschung wie die Genanalyse<sup>72</sup>.

Die Expression von Genen wird dementsprechend von verschiedenen Faktoren reguliert. Zum einen gibt es Transkriptionsfaktoren oder regulatorische RNAs (trans). Zum anderen gibt es Regulatoren auf DNA-Ebene (cis): Promotoren, Enhancer oder Silencer, die in den nicht-kodierenden Bereichen des Genoms lokalisiert sind. Sie werden als cis-regulatorische Elemente bezeichnet und bestehen aus Sequenzen, die entweder innerhalb von Genen (in Introns) oder in langen Gen-armen Regionen eingebettet sind, den sogenannten „Genwüsten“ <sup>73,74</sup>. Gene, die wichtig für die embryonale Entwicklung sind, unterliegen einer komplexen zeitlichen und räumlichen Genregulation. Deshalb liegen sie häufig umgeben von solchen Genwüsten, wo viele cis-regulatorischen Elemente diese komplexe Expression steuern können. Die Entfernung zwischen einem Gen und seinem Enhancer kann dabei mehrere 100 kb betragen <sup>75</sup>. Man geht davon aus, dass cis-regulatorische Sequenzen wie Enhancer durch ein sog. „Looping“ der DNA im Zellkern in physischen Kontakt mit dem Promotor ihrer Zielgene kommen (Abb. 8 A) <sup>76</sup>. Dieses DNA-Looping wird durch Transkriptionsfaktoren vermittelt und kann damit zur gewebespezifischen Aktivierung oder Unterdrückung eines Promotors führen (Abb. 8 B). Im Zellkern lässt sich diese Interaktion experimentell mittels *Fluoreszenz in situ Hybridisierung* (FISH) und einer PCR basierten Methode namens Chromosome Conformation Capture (3C) messen <sup>77</sup>. Beim Looping der DNA muss sichergestellt werden, dass der Enhancer nur an seinem Zielgen, und nicht an anderen Genen binden kann. Das wird durch Insulator-Elemente, sog. Boundaries, gewährleistet. Diese nicht-kodierenden Sequenzen verhindern, dass ein Enhancer mit Genen jenseits seiner Boundary interagieren kann. So stellen sie die spezifische Genregulation sicher <sup>75</sup>.

Wie erkennt man cis-regulatorischen Elemente?

Die Untersuchung der evolutionären Konservierung auserlesener Sequenzen ist eine der ältesten Methoden, cis-regulatorische Elemente zu identifizieren. Diese Untersuchung erfolgt vergleichend zwischen verschiedenen Spezies. In verschiedenen Studien konnte

gezeigt werden, dass Elemente, die zwischen Fisch und Mensch konserviert sind, in Reporter Assays zu 60% eine Enhancer-Aktivität zeigen <sup>74</sup>. Trotz einzelner Berichte über nicht evolutionär konservierte Enhancer bleibt die Konservierung einer Sequenz ein wichtiger Prognosefaktor. Ergänzend ist in den letzten Jahren eine ganze Zusammenstellung an epigenetischen Markierungen, sog. Histonmodifikationen, veröffentlicht worden, die zur Identifizierung nicht-kodierender Promotoren, Enhancer-, Silencer- oder Insulator-Elemente herangezogen werden kann. Die Möglichkeit, ein regulatorisches Element eindeutig zu testen, besteht momentan ausschließlich für Enhancer Elemente. Dabei gilt derzeit der *in vivo* Reporter-Assay in der transgenen Maus als Goldstandard <sup>78</sup>. Methodisch wird eine mögliche Enhancer Sequenz mit einem Minimalpromotor in ein LacZ-Reporterkonstrukt kloniert und anschließend durch Zygoteninjektion ins Mausgenom eingebracht. Eine positive Enhancer Sequenz führt so typischerweise zu einer gewebespezifischen LacZ-Färbung im Mausembryo, bspw. im Herzen. Für Silencer- oder Insulator-Elemente gibt es derzeit keinen etablierten Test <sup>79</sup>.



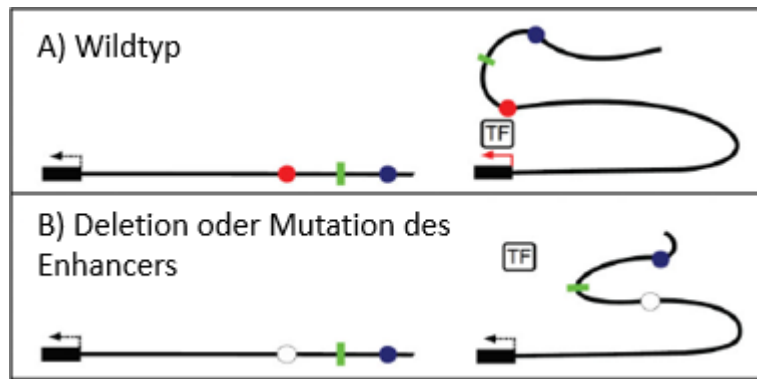
**Abb. 7 Reporter Gen Analyse**

Maus Embryo E 11.5 (li): Expression des Reportergens in den distalen Extremitäten

E 14.5 (re): Die Expression des Zielgens kann in den distalen Phalangen verortet werden.

Nach Klopocki und Mundlos <sup>74</sup>

Cis-regulatorische Elemente sind genau wie kodierende Bereiche der DNA anfällig für Mutationen. In Abhängigkeit ihrer Lokalisation können sie das Muster der Genexpression stören, (s. Abb. 8) <sup>80</sup>.



**Abb. 8 Mutationen in cis-regulatorischen Elementen verändern die Expression ihrer Zielgene**

Nach Spielmann und Mundlos<sup>80</sup>

**A)** Enhancer A (rot) interagiert über Schlaufenbildung der DNA mit seinem Zielgen und induziert durch Bindung eines Transkriptionsfaktors die Genexpression. Enhancer B (blau) wird durch eine Boundary (grün) an der unspez. Interaktion mit dem Zielgen von Enhancer A gehindert. **B)** Wenn der Enhancer (weiß) deletiert ist oder seine Funktion durch Mutationen eingeschränkt ist, kann er nicht mehr an sein Zielgen binden. Die Genexpression kann nicht induziert werden – das Gen bleibt inaktiv.

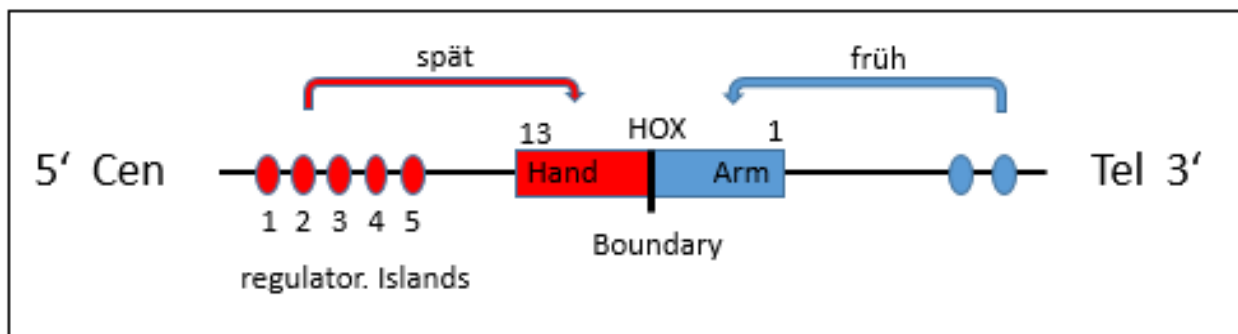
Mutationen in cis-regulatorischen Elementen können die Genexpression zeitlich und räumlich verändern, beispielsweise durch eine zu frühe oder zu späte Expression des Gens oder durch ektopische Expression in Arealen, in denen das Gen normalerweise nicht exprimiert wird. Eine gestörte Genexpression kann Ursache genetischer Erkrankungen sein<sup>81</sup>. Auch für Fehlbildungen der Extremitäten sind Mutationen in nicht-kodierenden Bereichen des Genoms bekannt<sup>74</sup>. Sie werden im folgenden Abschnitt näher besprochen.

## 1.6 HOX Gene: Entwicklung und Fehlbildung von Extremitäten

*HOX* Gene sind in der Entwicklung verantwortlich für die segmentierte Strukturierung des Körpers. Säugetiere haben vier *HOX* Cluster: *HOX A*, *B*, *C* und *D*. Sie beherbergen zusammen 39 Gene, die innerhalb des Clusters zeitlich und räumlich von 3' nach 5' exprimiert werden und in ihrer Anordnung mit Expressionsort und -zeit im Organismus übereinstimmen. Dieses Phänomen bezeichnet man als Kolinearität<sup>82,83</sup>. Gene, die am 3' Ende des Clusters liegen, werden zuerst und anterior exprimiert (Kopf), während Gene am 5' Ende zuletzt und posterior (Schwanz) exprimiert werden<sup>84</sup>.

Die Entwicklung von Extremitäten unterliegt vor allem der Regulierung durch das *HOXD* Cluster auf dem langen Arm von Chromosom 2. Es enthält 13 Gene, *HOXD1-13*. In einer ersten Phase werden die Gene am 3' Ende transkribiert, beginnend mit *HOXD1*. Diese proximalen Gene kodieren für die Entwicklung des Ober- und Unterarms. Später werden in einer zweiten Phase *HOXD10* bis *HOXD13* exprimiert. Sie steuern weiter distal die

Entwicklung vom Unterarm (*HOXD11*) bis zu den Fingern (*HOXD13*)<sup>85</sup>. Dieses komplexe Expressionsmuster wird von *cis*-regulatorischen Elementen gesteuert, die beidseits des Clusters in benachbarten Genwüsten liegen<sup>86</sup>. Die Elemente 3' vom Cluster regeln die Transkription der proximalen Gene für die Entwicklung des Arms. Elemente 5' des Clusters regulieren die distalen Gene für die Entwicklung der Hand und Finger<sup>87</sup>. Ein Insulator-Element in der Mitte des Clusters ermöglicht die getrennte Ansteuerung der 3' und 5' Gene<sup>88</sup>. Im Hinblick auf Fehlbildungen der Hand, wie Brachydaktylie, ist die Entwicklung der Finger über die distalen *HOXD* Gene, insbesondere *HOXD13*, interessant. Ihre Expression wird von insgesamt fünf Enhancern reguliert, die 5' vom Cluster in der Genwüste verstreut liegen. Man bezeichnet sie deshalb auch als „regulatory islands“. Zusammen bilden sie vor dem Cluster einen „regulatorischen Archipel“.

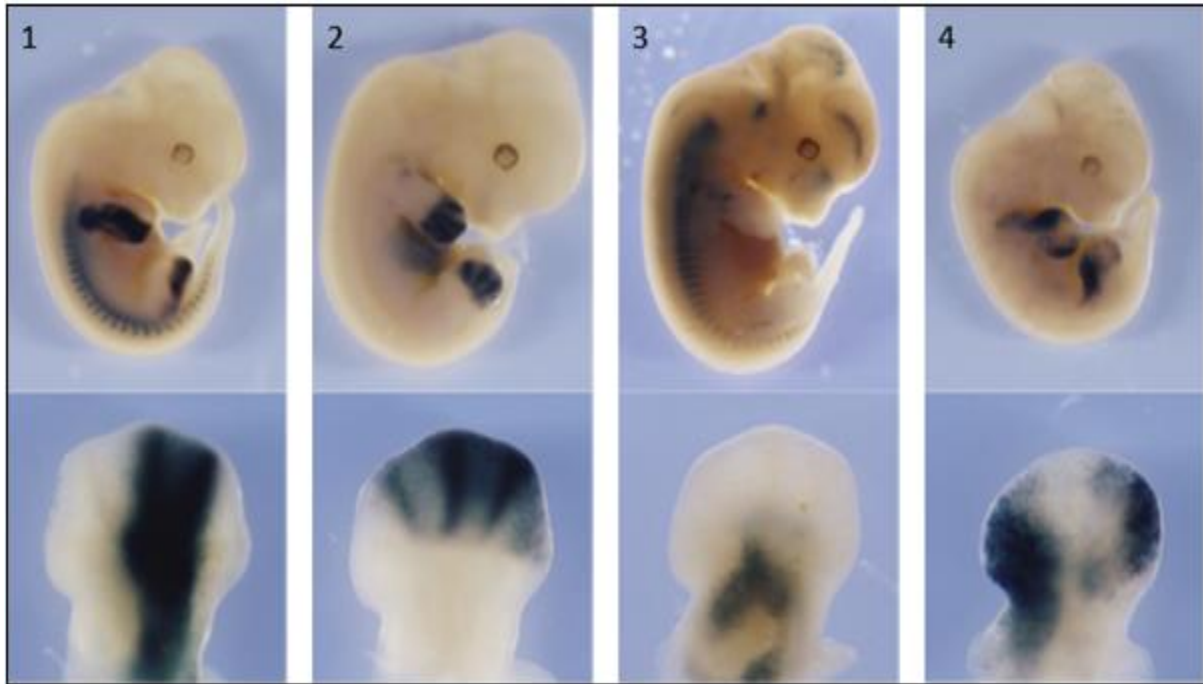


**Abb. 9 *HOXD* Lokus (Schema)**

3' *HOXD* Gene (blau) werden in einer ersten Phase exprimiert, 5' *HOXD* Gene (rot) später in einer zweiten Phase. Die zugehörigen Regulatoren liegen beidseits des Clusters in benachbarten Genwüsten. Eine Boundary trennt die beiden Expressionsprozesse in der Mitte des Clusters.  
In Anlehnung an Spielmann und Mundlos<sup>80</sup>

Jede Insel innerhalb des Archipels exprimiert die 5' *HOXD* Gene in einem bestimmten Bereich der Hand. Dementsprechend ist die ungestörte Funktion von jedem einzelnen *cis*-regulatorischen Element des *HOXD* Clusters entscheidend für eine gesunde Entwicklung<sup>83</sup>. Fällt die Interaktion einer oder mehrerer Inseln aus – bspw. durch Deletion – entstehen durch die gestörte Genregulation Fehlbildungen der Hand. Da jede Insel die Entwicklung in einem eigenen Bereich steuert, unterscheidet sich der Phänotyp je nach Lokalisation und Größe der Deletion. Je mehr regulatorische Inseln fehlen, desto ausgeprägter ist die Fehlbildung<sup>83</sup>.





**Abb. 10 Reporter Gen Analyse der regulatorischen Inseln 1 – 4**

Jede Insel induziert die Expression der *Hoxd* Gene in einem spezifischen Bereich der Hand.  
Nach Montavon et al. <sup>83</sup>

Auch im Menschen können Fehlbildungen der Extremitäten auf Mutationen in *HOXD* Genen oder in ihren regulatorischen Elementen zurückgeführt werden <sup>74</sup>. Punktmutationen im N- oder C-Terminus der Homeodomäne von *HOXD13*, Stoppmutationen und Deletionen in diesem Locus führen zu Synpolydaktylie <sup>89,90</sup>. Auch Brachydaktylie wird durch Stoppmutationen und Deletionen in *HOXD13* verursacht <sup>48</sup>. Gibt es Mikrodeletionen im regulatorischen Archipel des *HOXD* Clusters, zeigen betroffene Patienten durch die gestörte Genexpression einen ähnlichen Phänotyp wie bei Deletion der zugehörigen *HOXD* Gene: Das Bild reicht von Brachydaktylie, Syndaktylie über Kamptodaktylie bis zu monodaktiler Ektrodaktylie <sup>91</sup>.

Neben seiner Funktion für die Entwicklung von Extremitäten spielt das *HOXD* Cluster auch eine Rolle für die Entwicklung der Nieren. *HOXD18 – 13* sind daran beteiligt. Eine gestörte Expression dieser Gene kann zu Fehlbildungen der Nieren und des Urogenitaltraktes führen. Beispielsweise werden Deletionen von *HOXD8* und *HOXD9* mit der Entwicklung polyzystischer Nieren assoziiert <sup>92</sup>.

## 1.7 Fragestellung

1. Brachydaktylie kann durch Mutationen im kodierenden Bereich des Genoms verursacht werden. Ein Beispiel dafür sind Mutationen in *PTHLH*, die mit Brachydaktylie und Kleinwuchs einhergehen. *ZNF521* ist ein Effektor von *PTHLH*. Mäuse mit *ZNF521* Knockout zeigen ähnliche Fehlbildungen der Hände wie *PTHLH* Knockout Mäuse. Deswegen stellt sich die Frage, ob auch Mutationen in *ZNF521* Ursache von Brachydaktylie sein können. Um das zu klären, soll eine Kohorte von BDE Patienten via Sanger Sequenzierung auf Mutationen in *ZNF521* untersucht werden.
2. Mutationen und CNV's im nicht-kodierenden Bereich des Genoms können Fehlbildungen der Extremitäten verursachen. Cis-regulatorische Elemente können von solchen Mutationen betroffen sein und die Genexpression ihrer Zielgene nicht mehr korrekt regulieren. Ein gut erforschter Locus ist der regulatorische Archipel des *HOXD* Clusters. Mutationen in *HOXD13* sind bereits bekannte Ursachen von Brachydaktylie Typ E. Mutationen der zugehörigen regulatorischen Elemente führen im Mausmodell ebenfalls zu Brachydaktylie und anderen Fehlbildungen der Hände und Finger. Es ist deshalb zu klären, ob weitere Mutationen im nicht-kodierenden Bereich des Genoms - insbesondere im regulatorischen Archipel des *HOXD* Clusters – im Menschen mit Brachydaktylie in Verbindung gebracht werden können. Um dem nachzugehen, werden BDE Familien via komparativer genomischer Hybridisierung (Array CGH) auf Deletionen oder Duplikationen im gesamten Genom untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Zubehör

Gerät	Zusatzinformationen	Hersteller
Aufreiniger Sequenzierprodukte	Biomek® NX Automation Workstation	Beckman Coulter, Brea, USA
Geldokumentationssystem	G:BOX SYNGENE  UVT-28 ME	VWR international, Radnor, USA  Herolab GmbH, Berlin, D
Hybridisierungsöfen		Agilent, Santa Clara, USA
Microarray Scanner + Zubehör	Agilent Microarray Scanner	Agilent, Santa Clara, USA
qPCR Maschine	ViiA 7 RT PCR System	Applied Biosystems Foster City, USA
Schüttelwasserbad	OLS200	GRANT, Cambridgeshire, GB
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Sequenzierer	3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems Foster City, USA
Spektralphotometer	Nanophotometer™	Thermo Scientific Wilmington, USA Implen, München
Thermal Cyclers	Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems Foster City, USA
Vacuum Sauger	2016 VACUGENE	LKB Bromma, Uppsala, Schweden
Vortexer	Vibrofix VF1 Eletronic	IKA®, Staufen, D
Wasseraufbereitungsanlage	ULTRA Pure Water System Milli – Qplus, QPAKS 1	Millipore, Billerica, USA
Zentrifugen	Heraeus Biofuge fresco  Megafuge 2.0  Centrifuge 5810R	Thermo Scientific, Waltham, USA  Thermo Scientific, Waltham, USA  Eppendorf, Hamburg, D

Mini Star silverline	VWR international, Radnor, USA
Galaxy mini	VWR international, Radnor, USA
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D

### 2.1.2 PCR

#### Material

#### Hersteller

5x FIRE®Pol Master Mix	Solis BioDyne, Tartu, Estland
5x HF Puffer	Thermo Scientific Waltham, USA
Betaine 5M Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dNTP Set (jeweils 100mM)	Invitrogen™, Carlsbad, USA
Flat 96 / 48 Well PCR Plate	VWR international, Radnor, USA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific Waltham, USA

### 2.1.3 Gelelektrophorese

#### Material

#### Zusammensetzung

#### Hersteller

1% Ethydiumbromid-Lösung in H <sub>2</sub> O (10mg/ml)		Merck, Darmstadt, D
50x TAE Puffer:	242g	Tris-hydrochlorid
	+ 57,1 ml	Essigsäure
	+ 100ml	EDTA pH 8,0
	ad 1l mit	Aqua dest.
Agarose NEEO Ultra-Qualität		Roth, Karlsruhe, D
Gelextraktionskit		NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up
Gelladepuffer		40% Saccharose Merck, Darmstadt, D

	10mM EDTA	SIGMA, St. Louis, USA
	0,25% Bromthymolblau	Merck, Darmstadt, D
Größenmarker	1Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen™, Carlsbad, USA

### 2.1.4 PCR Aufreinigung

Material	Zusatzinformationen	Hersteller
Magnet Platte	96S Super Magnet Plate	ALPAQUA®, Beverly, USA
Magnetische Beads	AgenCourt® AMPure® XP	Beckman Coulter, Brea, USA

### 2.1.5 Sequenzierung nach Sanger

Material	Zusatzinformationen	Hersteller
Beads für Aufreinigung	AgenCourt CleanSeq®	Beckman Coulter, Brea, USA
Big Dye	BigDye® v3.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Polymerase	TERMIPol® DNA Polymerase	Solis BioDyne, Tartu, Estland
Sequenzierplatten	Thermo-fast 96 Detection Plate	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sequenzierpuffer	BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 2.1.6 Microarray

Reagenzien	Hersteller
20% SDS	Fluka, St. Gallen, CH
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Na-EDTA	SIGMA, St. Louis, USA
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Tris-HCL	ICN, Irvine, USA

<b>Stammlösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
1x TE pH 8,0:	1ml Tris-HCl 1M, pH 8,0
	+ 200µl 0,5M Na-EDTA
	ad 100ml mit Aqua dest.
20x SSPE:	175,3g NaCl
	+ 27,6g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	ad 800ml mit H <sub>2</sub> O
	+ 10ml NaOH
	ad 1l mit H <sub>2</sub> O

<b>Waschpuffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Waschpuffer 1 (WP1) (0,5x SSPE / 0,025% SDS)	194,75ml H <sub>2</sub> O, 5ml 20x SSPE (pH 7,4), 250µl 20% SDS, ad 200ml mit H <sub>2</sub> O
Waschpuffer 2 (WP2) (0,1x SSPE / 0,025% SDS)	99,375ml H <sub>2</sub> O, 500µl 20x SSPE (pH 7,4), 125µl 20% SDS, ad 100ml mit H <sub>2</sub> O
Waschpuffer 3 (WP3) (0,1x SSPE)	500µl 20x SSPE (pH 7,4), ad 100ml mit H <sub>2</sub> O

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
1M Oligonukleotid-Array	Agilent, Santa Clara, USA
Centrifugal Filter Units	Millipore, Billerica, USA
COT1 Human DNA	Agilent, Santa Clara, USA
Gaskets	Agilent, Santa Clara, USA
Genomic DNA Enzymatic	Agilent, Santa Clara, USA
Hyb-Kammern	Agilent, Santa Clara, USA
Hybridisation Kit	Agilent, Santa Clara, USA
Küvette	Roth, Karlsruhe, D
Labeling Kit	Agilent, Santa Clara, USA
Microcon-Säulen	Millipore, Billerica, USA
Reagiergefäße 200µl	Simport, Beloeil, Kanada
Spitzbodenröhrchen 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Safe Seal 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, D

### 2.1.7 qPCR

Material	Hersteller
384 Well qPCR Platte	Kisker Biotech, Steinfurt, D
SYBR® Green	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 2.1.8 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Material	Zusatzinformationen	Hersteller
Aqua dest		J.T.Baker, Center Valley, USA
Aqua bidest		Millipore, Billerica USA
EDTA	Ultra PURE™ 0,5M EDTA pH 8,0	GIBCO™, Carlsbad, USA
Ethanol, pro analysis		J.T.Baker, Center Valley, USA
Plattenfolien		Thermo Scientific, Waltham, USA
Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg, D
RNase/DNase freies Wasser		GIBCO™, Carlsbad, USA

### 2.1.9 PC-Programme und Internet - Datenbanken

Programme	Verwendung	Hersteller
1000 Genomes	Polymorphismussuche	<a href="http://www.1000genomes.org">http://www.1000genomes.org</a>
Agilent CytoGenomics Edition 2.7.8.0	Auswertung Array CGH	Agilent, Santa Clara, USA
Agilent Feature Extraction v11.5.1.1	Auswertung Array CGH	Agilent, Santa Clara, USA
Cnv2primer	Primerdesign	<a href="http://watson.charite.de/~sandraa/html/cnv2primer.html">http://watson.charite.de/~sandraa/html/cnv2primer.html</a>
Database of Genomic Variants	Sequenzsuche	<a href="http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home">http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home</a>
DECIPHER	Sequenzsuche	<a href="https://decipher.sanger.ac.uk/">https://decipher.sanger.ac.uk/</a>

Datenbanken	Verwendung	Internetadresse
EditSeq v. 5.0.0	Sequenzbearbeitung/ -auswertung	DNA Star Inc., Madison, USA
ENSEMBL Genomdatenbank	Sequenzsuche	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
ExAC Browser	Polymorphismussuche	<a href="http://exac.broadinstitute.org/">http://exac.broadinstitute.org/</a>
Exome Variant Server	Polymorphismussuche	<a href="http://evs.gs.washington.edu/EVS/">http://evs.gs.washington.edu/EVS/</a>
Mutation Taster	Prädiktion von Mutationen	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
PolyPhen-2	Prädiktion von Mutationen	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
Primer 3 Input v.0.4.0	Primerdesign	<a href="http://primer3.ut.ee/">http://primer3.ut.ee/</a>
SeqMan II v. 5.0.0	Sequenzbearbeitung/ -auswertung	DNA Star Inc., Madison, USA
SeqPilot v3.5.2.	Sequenzbearbeitung/ -auswertung	JSI medical systems GmbH
SMART	Protein Prädiktion	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>
UCSC Genomdatenbank	Sequenzsuche	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Primerdesign

Das Primerdesign ist der erste Schritt zur erfolgreichen Amplifizierung eines gewünschten DNA-Fragments. Die ausgewählten Primer sollten nicht mit sich selbst hybridisieren, keine intramolekulare Schleifenbildung (hairpin Struktur) zeigen und möglichst nur einmal im Genom binden. Außerdem sollten die Primerpaare einen ähnlichen GC-Gehalt und eine annähernd gleiche Schmelztemperatur haben. Fast alle verwendeten Primer wurden unter der Verwendung der „Primer 3 Input“ Software ausgewählt (Primergröße: 18 bis 22 bp, Schmelztemperatur: 58°C bis 62°C) und mit dem Programm „Ensembl Genome Browser-Blast“ auf das Bindungsverhalten im Genom untersucht. Die Primer wurden von der Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, D) synthetisiert. Die gelieferten Primer wurden mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 100pmol/µl gelöst (Primer-Stammlösung). Ausgehend von den Primer-Stammlösungen wurden Verdünnungen mit einer



Endkonzentration von 10pm/μl hergestellt, mit denen die PCR- und Sequenzierungsreaktionen durchgeführt wurden <sup>93</sup>.

### 2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient zur sequenzspezifischen Amplifizierung von DNA-Molekülen. Das Prinzip der PCR beruht auf einer enzymatischen Amplifikation eines DNA-Abschnitts, der von zwei gegenläufigen Primern begrenzt wird <sup>94</sup>. Um eine größere Spezifität in der Amplifizierung zu erhalten, wird die Annealingtemperatur nahe der Primerschmelztemperatur gewählt. Eine Herabsetzung der Annealingtemperatur führt zu einer geringeren Spezifität der Primer und kann in unspezifischen Nebenprodukten resultieren. Für die Amplifikation der zu untersuchenden DNA-Abschnitte werden kommerziell erhältliche DNA-Polymerasen verwendet. Für kleine PCR Produkte bis 500bp wird die FIRE®Pol Polymerase genutzt. Für die Amplifikation sehr langer DNA-Abschnitte (> 3000kb) wird die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Die verschiedenen Polymerasen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften voneinander: Die Phusion Polymerase weist eine höhere Amplifizierungsrate als die FIREPol® Polymerase auf (1kb in 15-30s), kann GC-reiche Regionen, unter der Verwendung eines speziellen GC-Puffers, sehr gut vervielfältigen und produziert glatte DNA-Doppelstrangenden. Außerdem weist sie sehr geringe Fehlerquoten auf.

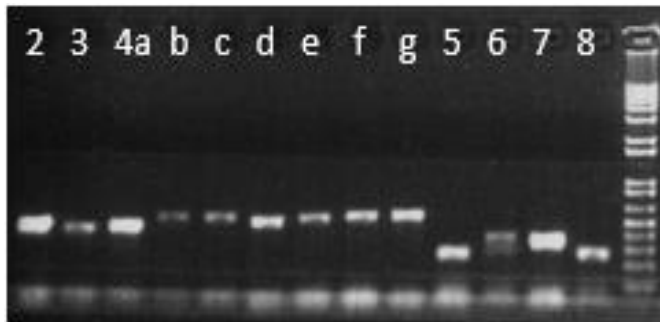
Die FIRE®Pol Polymerase wird für die Amplifikation von *ZNF521* genutzt (Tabelle 1, Cyclerprogramm s. Anhang).

**Tabelle 1      Standard PCR Reaktion**

Menge	Reaktionskomponenten
1 μl	DNA (30 – 60 ng / μl)
1 μl	Forward Primer
1 μl	Reverse Primer
3 μl	FIREPol® Master Mix
4 μl	Betaine
4 μl	H2O

Um die Amplifikationsprodukte nach der PCR nachzuweisen, wird eine Gelelektrophorese mit 1%igem Agarosegel durchgeführt, das mit Ethidiumbromid (0,6μg/ml) versetzt ist. 5μl des PCR-Produkts werden mit 5μl Gelladepuffer vermischt.

Als Referenz dient ein Größenmarker der Firma Invitrogen. Die Agarosegele laufen bei einer Spannung von 120V ca. 25-30 min.



**Abb. 11 Gelelektrophorese der *ZNF521* Amplifikate**  
*ZNF521* hat 8 Exons, Exon 2 bis 8 sind kodierend. Exon 4 ist aufgrund seiner Größe in 7 Teile aufgespalten (Exon 4a - g). Rechts die 1kb Plus DNA Leiter.

Die Aufreinigung der PCR Produkte erfolgt durch die Zugabe von magnetischen Beads zum PCR Produkt (Tabelle 2). Die Beads binden die DNA und lagern sich bei Kontakt zu einer Magnetplatte an den Well-Rändern der PCR Platte an. Durch zweimaliges Waschen mit Ethanol (70%) werden bis auf die DNA-Beads-Komplexe alle

übrigen Bestandteile im Well (Nukleotide, Polymerasereste etc.) entfernt. Nach 10 Minuten Wartezeit zur Evaporation des restlichen Ethanols wird Wasser zugegeben, das die Beads von der DNA trennt. Werden die Wells erneut einem magnetischen Feld ausgesetzt, lagern sich nur die Beads an die Wand des Wells an. Die gereinigte, in Wasser gelöste DNA kann dann für anschließende Experimente entnommen werden <sup>93</sup>.

**Tabelle 2 PCR Aufreinigungsansatz**

Menge	Reaktionskomponenten
5 µl	DNA
9 µl	Magentische Beads
2 x 100 µl	Ethanol 70%
40 µl	H <sub>2</sub> O

### 2.2.3 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von *ZNF521* erfolgt nach der Didesoxy-Methode (Kettenabbruch-Methode) nach Sanger <sup>95</sup>. Für die Sequenzierung wird BigDye® v3.1, der zugehörige Sequenzierungspuffer und die TERMI®Pol Polymerase verwendet. Diese Polymerase hat eine erhöhte Effizienz für den Einbau unkonventioneller Nukleotide wie ddNTP's. Die aufgereinigte DNA wird bidirektional sequenziert (Tabelle 3, Cycloerprogramme, s. Anhang).

**Tabelle 3     Ansatz für Sequenzier-Reaktion**

Menge	Reaktionskomponenten
0,3 µl	Big Dye® v3.1
0,1 µl	TERMI®Pol Polymerase
1,6 µl	Terminator Buffer
4,5 µl	H <sub>2</sub> O

Nach der Sequenzierung wird der Reaktionsansatz einer Fällung mit magnetischen Beads unterzogen. Diese Aufreinigung findet mit der „Automation Workstation“ statt, unter Verwendung des Programms: CleanSEQ NO Transfer. Die Proben werden mit 7µl magnetischen Beads und 41,59µl Ethanol (85%) versetzt und anschließend einem Magnetfeld ausgesetzt, ähnlich wie bei der PCR Aufreinigung (s.o.). Dann werden die Proben zweimal für 30 s mit Ethanol (85%) gewaschen, für 10min getrocknet und mit 40µl 0,1mM EDTA eluiert, um die DNA von den Beads zu lösen. Die Plattenanalyse wird am Kapillarautomat 3730 DNA Analyzer durchgeführt. Für die Auswertung der Sequenzen wird das Computer-Programm SeqPilot und für die Bruchpunktanalyse SeqMan II und Edit Seq verwendet <sup>93</sup>.

### 2.2.4 Mikroarray - basierte komparative genomische Hybridisierung

Die Mikroarray-CGH Methode (Array CGH) wurde 1997 von Solinas-Toldo et al. eingeführt und erlaubt die Analyse des gesamten Genoms <sup>67</sup>. Das beinhaltet auch die Untersuchung der nicht-kodierenden Bereiche. Mit dieser Methode können Verluste (Deletionen) oder auch Zugewinne (Duplikationen) genetischen Materials detektiert werden. Patienten- und Referenz-DNA werden mit je einem unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoff markiert. Im Anschluss erfolgt eine Kohybridisierung der beiden DNAs auf einem Array, wobei es sich um einen Objektträger handelt, der entweder kurze Fragmentabschnitte (Oligonukleotide) des gesamten Genoms oder nur eines bestimmten genomischen Abschnitts repräsentiert. Eine genomische Aberration in der Patienten-DNA führt zu einer Verschiebung der Hybridisierungsverhältnisse zwischen Patienten- und Referenz-DNA, sodass unterschiedlich starke Fluoreszenzsignale detektierbar sind.

Mit jeweils 1,5 µg der Patienten- und Referenz-DNAs erfolgt eine Markierungsreaktion mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (Random Primer Labeling) unter Verwendung des Labeling Kits. Ein Mix aus DNA, Random-Primer-Lösung und Puffer wird für 10min bei 95°C erhitzt (Hitzeverdau und Denaturierung der DNA), anschließend für 10min auf 4°C

herunter gekühlt, wobei die Zugabe der restlichen Komponenten erfolgt (Tabelle 4). Anschließend wird der gesamte Reaktionsansatz für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

**Tabelle 4 Random-Primer-Labeling Kit**

Menge	Reaktionskomponenten
19 µl	Restriktionsverdau (Patienten- oder Referenz-DNA)
5 µl	Random Primers (10x)
10 µl	Puffer (5x)
5 µl	dNTP-Mix (10x)
3 µl	gelabelte dUTP's mit Cy3 oder Cy5
1 µl	Klenow Fragment 40U / µl

ad 50 µl mit H<sub>2</sub>O (bidest)

Die Aufreinigung der markierten DNA zur Abtrennung nicht eingebauter fluoreszenzmarkierter Nukleotide erfolgt über Microcon-Säulen. 430µl 1x TE (pH 8,0) wird zu der jeweiligen Probe gegeben und im Anschluss der gesamte Ansatz (480µl) auf den Filter der Säule überführt. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 14046 rcf wird der Überstand verworfen, der Filter umgedreht und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine Zentrifugation bei 1021 rcf für 2min erfolgt, um die aufgereinigten Proben zu erhalten. Für die Messung der Einbaurrate der Fluoreszenzmarker werden 1,5µl der Proben abgenommen und mittels Spektralphotometer bestimmt. Patienten- und Referenz-DNA werden zusammengeführt, ihr Gesamtvolumen bestimmt und entsprechend gelöst (Tabelle 5).

**Tabelle 5 Lösen der Proben (110 µl Ansatz)**

Menge	Reaktionskomponenten
x µl	gepoolte DNA
5 µl	Cot1-Human-DNA
55 µl	Hybridisierungspuffer (2x)
11 µl	Blocking Agent (10x)

ad 110 µl mit H<sub>2</sub>O (bidest)

Nach vorsichtigem Mischen der einzelnen Reaktionskomponenten (schnipsen, zentrifugieren), erfolgt die Denaturierung bei 95°C für 3min und eine Vorhybridisierung bei 37°C für 30min. Die Cot1-DNA dient dabei der Absättigung hochrepetitiver DNA-Sequenzen, die im Bereich des Heterochromatins liegen. Ein Blocking Agent sättigt die Glasoberfläche der Arrays, verhindert unspezifische Bindungen der DNA und vermindert so Hintergrundsignale. Für die Hybridisierung wird ein Glasobjektträger (gasket slide) mit den Gummirändern nach oben in eine Hybridisierungskammer gelegt und anschließend mit der jeweiligen Probe geladen (1M Oligonukleotid Array: 490µl / Hybridisierungsfläche). Letzlich wird der Array mit der Hybridisierungsfläche nach unten luftblasenfrei aufgelegt. Die Hybridisierungskammer wird nach Angaben des Herstellers zusammengebaut und für 40h bei 65°C und 20rpm im Hybridisierungssofen inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgen das Waschen der Slides und die Detektion der Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Laserscanners. Die Kammern mit den Slides werden dem Hybridisierungssofen entnommen und die Objektträger aus der Apparatur entfernt. Danach wird das gasket slide im ersten Waschpuffer (WP1) von Array getrennt. Es folgt ein weiterer Waschschrift im WP1 bei Raumtemperatur für 5min (schüttelnd im Dunkeln). Anschließend werden die Objektträger für 2min in einem 37°C warmen Wasserbad im WP2 geschüttelt (im Dunkeln). Es folgt ein letzter Waschschrift im WP3, wobei der Objektträger dreimal kurz eingetaucht wird. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 140 rcf wird der Objektträger im Laserscanner bei 3µm nach dem Programm Agilent G3\_CGH gescannt. Die Auswertung der Signale erfolgt mit der Agilent Feature Extraction und der Agilent CytoGenomics Software (Agilent, Santa Clara, USA). Einstellungen der Analyse-Software: aberration algorithm: ADM-2; threshold: 6.0; window size: 0.2 Mb; filter: 5 probes,  $\log_2\text{ratio}=0.29$  <sup>93</sup>.

### **2.2.5 Quantitative Real Time PCR (qPCR)**

Fällt ein Patient durch genomische Aberrationen im Array auf, wird der Befund mit der quantitativen Real Time-PCR (qRT-PCR/qPCR) validiert. Angehörige werden meist mit untersucht. Die qRT-PCR ermöglicht neben der Amplifikation auch die Quantifizierung der DNA <sup>96</sup>. Die Quantifizierung wird durch kationische Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht, die in doppelsträngige DNA-Moleküle interkalieren können, wie z.B. SYBR®Green. Während der PCR-Zyklen wird die Fluoreszenz gemessen, die exponentiell mit der Amplifikatmenge zunimmt. Der in dieser Arbeit verwendete SYBR-Green-Mix enthält eine Hot-

start-Polymerase, die erst aktiv wird, wenn das Reaktionsgemisch die Denaturierungstemperatur erreicht hat. Die Elongation setzt erst ein, wenn die Primer spezifisch an die DNA gebunden haben – so entstehen weniger Artefakte.

Zur Bestimmung der Amplifikatmenge werden Primerpaare verwendet, die innerhalb und außerhalb der genomischen Aberration liegen und eine Fragmentgröße von 80-120bp amplifizieren (Primersequenzen s. Anhang). Die Konzentration der DNA wird mittels Spektralphotometer bestimmt und auf 2ng/µl eingestellt. Der Reaktionsansatz hat ein Endvolumen von 12µl und enthält DNA, Forward und Reverse Primer sowie den SYBR®Green Mastermix (Tabelle 6).

**Tabelle 6**      **Reaktionsansatz qPCR**

Menge	Reaktionskomponenten
5 µl	DNA (2ng / µl)
1 µl	Primerpaar - Mix (forward und reverse, 2,5 pmol)
6 µl	SYBR® Green

Pro Primerpaar wird jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Kalibration dient weibliche Referenz-DNA (Cyclerprogramm s. Anhang). Die Auswertung der Kopie-Anzahl erfolgte mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Werte für die relative Quantifizierung (RQ-Werte) werden mit der ViiA 7 RUO Software (Applied Biosystems) erstellt. Die Normalisierung und Quantifizierung der erhaltenen RQ-Werte aller Primerpaare erfolgt relativ zur Amplifikatmenge des autosomalen Referenzgens Albumin (ALB, 4q11), das mit zwei Kopien im Genom existent sein muss – der Organismus ist ansonsten nicht lebensfähig (sog. housekeeping gene). Zur Unterscheidung des Geschlechts und als interne Kontrolle wird ein Primerpaar für den Faktor VIII (Xq28) verwendet. Ein log<sub>10</sub> RQ-Wert von 0,0 ist ein Indikator für die Existenz von zwei Kopien eines Allels (Normalbefund). Ein RQ-Wert von ca. 0,2 zeigt eine zusätzliche Kopie an (3 Kopien, Duplikation), während eine fehlende Kopie mit einem RQ Wert von ca. -0,2 auffällt (Deletion) <sup>93</sup>.

### 2.3 Kohorte

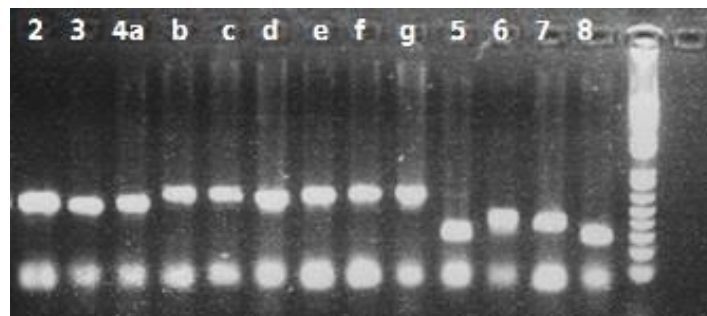
67 nicht verwandte Familien mit BDE wurden auf Mutationen in *ZNF521* via Sanger Sequenzierung untersucht. Dabei wurden sowohl Familien mit isolierter BDE als auch Familien mit BDE als Teil eines Syndroms eingeschlossen.

Um auch Veränderungen im nicht-kodierenden Bereich des Genoms zu erfassen, wurde bei 11 Familien aus der Kohorte eine Array CHG durchgeführt – Voraussetzung war, auch das genetische Material beider Elternteile untersuchen zu können. Potenziell pathologische Befunde wurden via qPCR validiert und ein Großteil der Kohorte (53 nicht verwandte Familien mit BDE) anschließend auf gefundene Aberrationen gescreent. 14 Familien wurden dabei aufgrund fehlenden Materials nicht mit einbezogen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung der PCR und Sanger-Sequenzierung für *ZNF521*

Zunächst wurden die entworfenen Primer zur Amplifikation von *ZNF521* (s. Anhang) mit hauseigener Kontroll-DNA getestet, um eine effiziente Analyse der Patientenproben sicherzustellen. Die DNA Sequenz von *ZNF521* entstammt dem *ENSEMBL Genome Browser* (Transcript ZNF521-001 ENST00000361524). Das Gen besteht aus acht Exons, wobei Exon 1 nicht kodierend ist, sodass die Amplifikation von Exon 2 bis 8 erfolgte<sup>97</sup>. Exon 4 konnte bei einer Länge von 4001 bp nicht in einem Segment von konventionellen DNA-Polymerasen repliziert werden. So wurde Exon 4 in sieben Abschnitte, Exon 4a bis 4g, unterteilt. Für die Testung der designten Primer mit Kontroll-DNA wurde jeweils ein Master Mix mit und ohne Betaine getestet. In der folgenden Gelelektrophorese konnte beim Master Mix mit Betaine für jedes Exon ein spezifisches Amplifikat erzielt werden, während beim Master Mix ohne Betaine keine Amplifikate nachzuweisen waren. So konnten anschließend die Patienten-DNAs mit den designten Primern und einem Mastermix mit Betaine repliziert werden.



**Abb. 12 *ZNF521* Amplifikate**  
nach Testung der Primer mit Kontroll-DNA und Betaine  
Master Mix

Bei der anschließenden Sanger Sequenzierung der Kontroll-Amplifikate konnte für Exon 1 bis 7 eine saubere Forward und Reverse Sequenz ermittelt werden. Bei Exon 8 konnte aufgrund hochrepetitiver Sequenzen keine Forward Sequenz ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte daher über die Reverse Sequenz.



## 3.2 Ergebnisse der Sequenzierung von *ZNF521* in der Patientenkohorte

Innerhalb der Kohorte von 67 Familien mit BDE konnten bei sechs Familien insgesamt drei synonyme Punktmutationen und eine Punktmutation mit Aminosäureaustausch in *ZNF521* nachgewiesen werden.

### 3.2.1 Analyse der synonymen Varianten innerhalb der Patientenkohorte

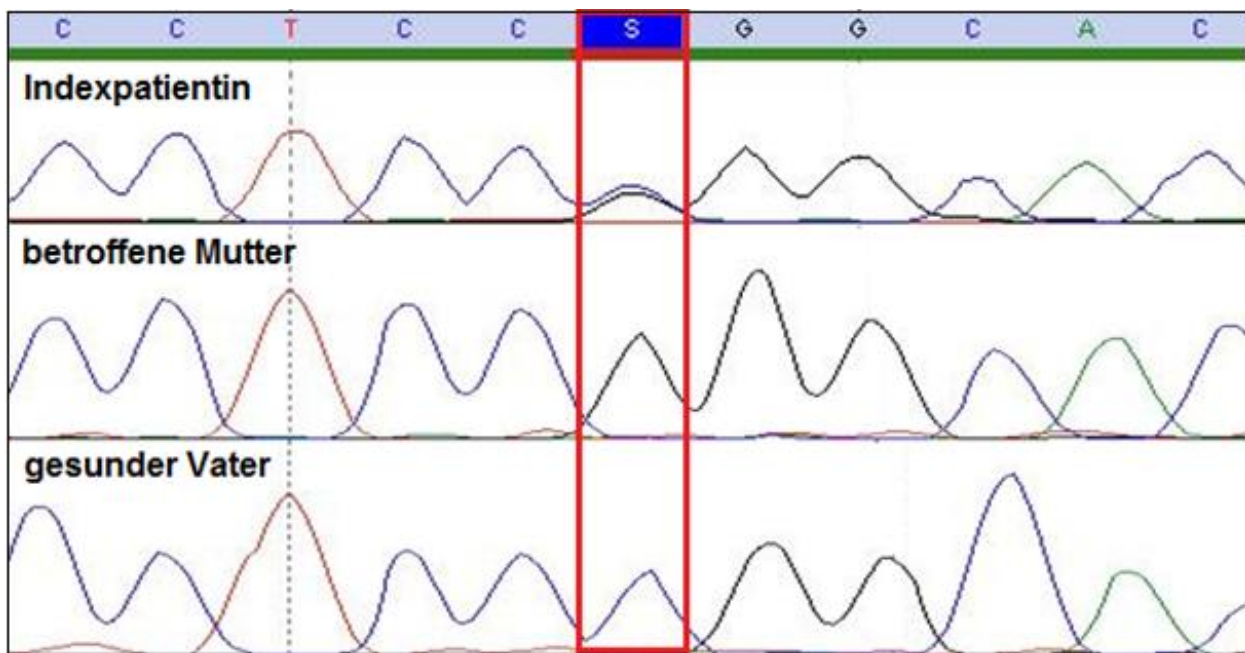
#### Hilfsmittel zur Beurteilung der Varianten

Zur Analyse der ausgemachten Veränderungen wurden verschiedene Programme und Datenbanken herangezogen: Mit *Mutation Taster* kann eine erste Wertung bezüglich der Pathogenität einer Mutation erfolgen. Das Programm berücksichtigt für die Auswertung verschiedene Faktoren. Dazu gehören bspw. Einfluss der Sequenzalteration auf die Aminosäuresequenz des Proteins oder die Splice-Sites des Gentranskripts, evolutionäre Konservierung der betroffenen Region sowie Veränderungen, die die Menge an produzierter mRNA beeinträchtigen<sup>98</sup>. *Polyphen-2* ist eine weitere Datenbank zur Prädiktion der Pathogenität einer Mutation. Es beschränkt sich dabei auf die Auswertung von Mutationen mit Aminosäureaustausch. Dabei wird bspw. analysiert, inwiefern sich die Struktur und Funktionalität des Proteins nach Sequenzalteration vom Wildtyp-Protein unterscheidet. Das Ergebnis wird nach steigender Wahrscheinlichkeit der Pathogenität in drei Kategorien ausgegeben; „benign“ , „possibly damaging“ oder „probably damaging“<sup>99</sup>. Mit *Exome variant Server* und *ExAC Browser* kann unter anderem die Häufigkeit einer genetischen Veränderung innerhalb der gesunden Bevölkerung ermittelt werden. Dabei werden heterozygote und homozygote Varianten differenziert angegeben<sup>100,101</sup>.

#### Synonyme Veränderungen in der Kohorte

Bei der ersten Veränderung handelt es sich um eine heterozygote, synonyme Punktmutation (chr18:22804549G>C, P → P) in Exon 4. *Mutation Taster* prognostiziert einen pathogenen Effekt durch Abwandlung der Splice-Sites von *ZNF521* - Transkripten. Um die Häufigkeit dieser Punktmutation innerhalb der gesunden Bevölkerung zu ermitteln, wurde im *ExAC Browser* nach der Veränderung gesucht. Dort wird sie als Polymorphismus (SNP ID: rs34380309) mit einer Häufigkeit von ca. 2% in der Bevölkerung angegeben. In 42 Fällen liegt die Veränderung homozygot bei Gesunden vor. Innerhalb der untersuchten Kohorte von 67 Familien mit BDE kommt die

Veränderung bei drei nicht-verwandten Familien vor. Das entspricht einer Häufigkeit von ca. 4,5%. Alle drei Indexpatienten mit dieser Veränderung zeigen klinisch eine BDE. Zwei von ihnen (Patient A, Patient B) haben zusätzlich einen Kleinwuchs. Patient C dagegen eine isolierte BDE. Bei Patient A (Kleinwuchs und BDE) konnte eine Segregationsanalyse durchgeführt werden (s. Abb. 13). Die milder betroffene, kleinwüchsige Mutter trägt die gleiche Veränderung, allerdings homozygot G/G. Eine BDE ist nicht bekannt. Der Vater ist gesund und trägt die Veränderung nicht.



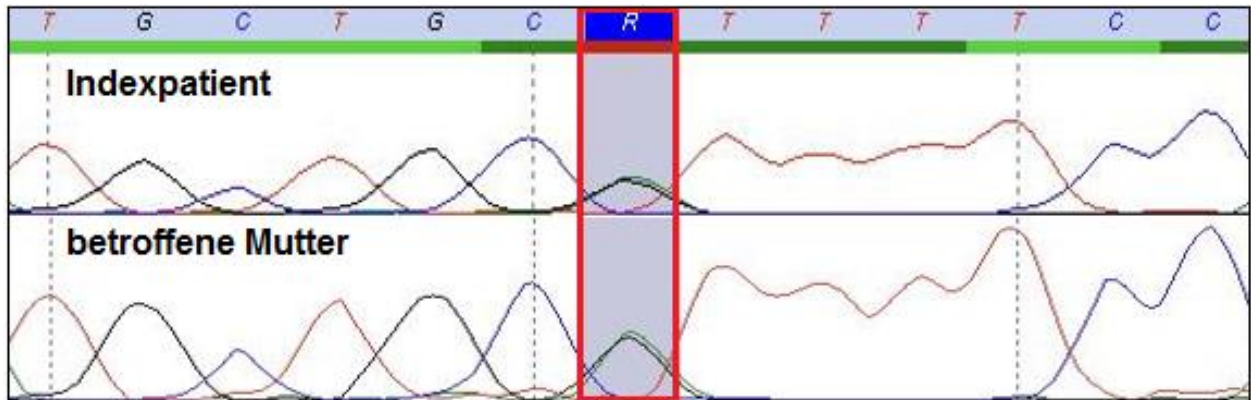
**Abb. 13 Ausschnitt aus der SeqPilot Sequenzanalyse (erste synonyme Variante)**

Die Indexpatientin ist heterozygot für die Veränderung C>G. Die betroffene Mutter ist homozygot G/G., der gesunde Vater homozygot C/C.

Bei Patient B und C konnte aufgrund fehlenden Elternmaterials keine Segregationsanalyse durchgeführt werden.

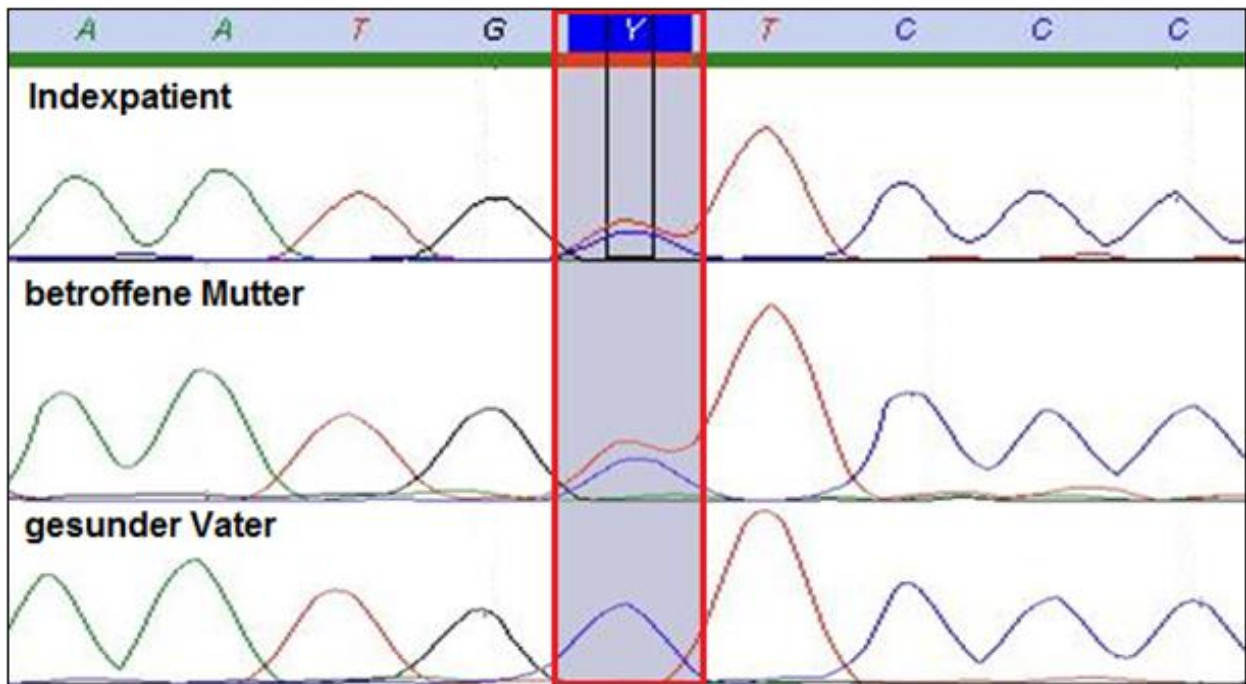
Bei der zweiten Veränderung handelt es sich ebenfalls um eine heterozygote, synonyme Punktmutation (chr18:22807336C>T, A → A) in Exon 4, die *Mutation Taster* durch eine mögliche Abwandlung der Splice-Sites als pathogen einstuft. *ExAC Browser* gibt die Veränderung als Polymorphismus (SNP ID: rs182212217) mit einer Häufigkeit von ca. 0,07% in der Bevölkerung an. Weiterhin ist ein Fall bekannt, in dem die Veränderung beim Gesunden homozygot vorliegt. Innerhalb der hier untersuchten Kohorte von 67 Familien kommt die Veränderung in einer Familie vor, was einer Häufigkeit von 1,4% entspricht. Klinisch zeigt sich in der Familie eine BDE mit Kleinwuchs. Die

Segregationsanalyse konnte zeigen, dass die Veränderung sowohl beim Indexpatienten als auch bei seiner betroffenen Mutter vorliegt (s. Abb. 14). Beide haben eine BDE und Kleinwuchs. Der Kindsvater konnte nicht untersucht werden.



**Abb. 14 Ausschnitt aus der SeqPilot Sequenzanalyse (zweite synonyme Variante)**  
Indexpatient und betroffene Mutter tragen die Veränderung G>A heterozygot.

Die dritte Veränderung ist, wie die zuvor beschriebenen, eine heterozygote, synonyme Punktmutation (chr18:22807066G>A, Cys→Cys) in Exon 4. *Mutation Taster* zeigt einen möglichen krankheitsverursachenden Effekt an: Veränderungen der Splice-Sites könnten demnach die Proteinstruktur modifizieren sowie die Ausbildung und Funktionalität der Zinkfinger-Domänen einschränken. Im *ExAC Browser* wird die Veränderung als Polymorphismus (SNP ID: rs114476837) mit einer Häufigkeit von ca. 0,03% in der Bevölkerung angegeben. Es ist ein Fall bekannt, in dem die Veränderung beim Gesunden homozygot vorliegt. Innerhalb der untersuchten Kohorte kommt die Veränderung bei einer Familie vor, was einer Häufigkeit von 1,4% entspricht. Der Indexpatient mit dieser Veränderung hat eine BDE mit Kleinwuchs. Bei seiner Mutter liegt die gleiche Veränderung vor. Sie ist ebenfalls kleinwüchsig, hat aber keine BDE. Der gesunde Vater trägt die synonyme Punktmutation nicht (s. Abb. 15).



**Abb. 15 Ausschnitt aus SeqPilot Sequenzanalyse (dritte synonyme Variante)**

Indexpatient und betroffene Mutter sind heterozygot für die Veränderung C>T. Der gesunde Vater ist homozygot C/C und weist die Veränderung nicht auf.

Variante	<i>chr18:22804549G&gt;C</i> <i>P → P</i>	<i>chr18:22807336C&gt;T</i> <i>A → A</i>	<i>chr18:22807066G&gt;A</i> <i>Cys → Cys</i>
<b>SNP ID</b>	rs34380309	rs182212217	rs114476837
<b>Mutation Taster</b>	- Disease causing - Splice site changes - Protein features affected	- Disease causing - Splice site changes	- Disease causing - Splice site changes - Protein features affected
<b>ExAC</b>			
<i>Allele Count</i>	2419	87	40
<i>Allele Number</i>	121310	121372	121382
<i>Homozygous</i>	42	1	1
<i>Allele Frequency</i>	0,01994	0,0007168	0,0003295
<b>Häufigkeit Kohorte</b>	0,04477	0,0149254	0,0149254
<b>Wertung</b>	Polymorphismus	Polymorphismus	Polymorphismus

**Tabelle 7 Zusammenstellung der synonymen Varianten innerhalb der BDE Kohorte**

Aufgeführt sind die Häufigkeitsangaben der Datenbank *ExAC Browser*, die Prädiktion mit *Mutation Taster* sowie die eigene Wertung der Ergebnisse

Zusammenfassend wurden in der Kohorte drei synonyme Punktmutationen gefunden, die alle von *Mutation Taster* als potentiell pathogen eingestuft werden. Als Ursache werden dafür mögliche Veränderungen beim Splicing von *ZNF521* – Transkripten angegeben. Erkrankte Elternteile tragen die gleichen Veränderungen wie die betroffenen Indexpatienten, während sie bei gesunden Familienmitglieder nicht aufzuweisen sind. Dies spricht zunächst für eine mögliche Pathogenität der gefundenen Varianten. Ein wichtiges weiteres Kriterium für die Beurteilung genetischer Varianten ist ihre Häufigkeit innerhalb der gesunden Bevölkerung und die Anzahl derer, die die Veränderung homozygot tragen und trotzdem nicht erkranken (s. Tab. 7).

Die erste Veränderung (chr18:22804549G>C, P → P) kommt häufig in der gesunden Bevölkerung vor, was eine Pathogenität unwahrscheinlich macht. Genetische Varianten wie diese, die häufig auftreten und bei denen nur eine Base innerhalb der DNA Sequenz ausgetauscht ist, werden als „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) bezeichnet. Per Definition beträgt die „Minor Allele Frequency“, also die Häufigkeit für das Auftreten des SNPs in der Bevölkerung, über 1%. SNPs machen 90% aller genetischen Varianten aus. Man bezeichnet sie auch als „erfolgreiche Punktmutationen“, da sie sich nach erstmaligem Auftreten in der Population durchgesetzt haben und tlw. Selektionsvorteile mit sich brachten <sup>102</sup>. SNPs sind daher stabil und vererbbar, was sich in der Segregationsanalyse der Indexfamilie bestätigt. Da der Basenaustausch ohne Veränderung der Aminosäuresequenz einhergeht, spricht man in diesem Fall von einem synonymen SNP. Ein Austausch mit Aminosäureaustausch wird dagegen als nicht-synonymer SNP bezeichnet <sup>103</sup>. Neben der Häufigkeit der Variante sprechen auch die zahlreichen gesunden homozygoten Fälle gegen eine pathogene Veränderung (s. Abb. 16). Zusätzlich spricht die Klinik der Indexfamilie gegen eine Pathogenität, da ein betroffener Elternteil die Veränderung homozygot trägt und trotzdem einen milderen Phänotyp aufweist als die heterozygote Indexpatientin. Diese erste Veränderung in *ZNF521* ist daher als Ursache einer BDE auszuschließen.

Bei der zweiten Veränderung (chr18:22807066G>A, Cys → Cys) ist allein die Segregationsanalyse mit einer Pathogenität zu vereinbaren, da sie bei beiden erkrankten Familienmitgliedern besteht. Dagegen spricht der bekannte Fall eines gesunden homozygoten Individuums. Außerdem kommt die Veränderung nicht selten in der gesunden Bevölkerung vor. Daher ist auch hier von einem Polymorphismus auszugehen.

Im Gegensatz zu den ersten beiden kommt die dritte Veränderung (chr18:22807066G>A, Cys → Cys) in der gesunden Bevölkerung selten vor, was die Prädiktion einer möglichen Pathogenität unterstützt. Die Segregationsanalyse steht damit im Einklang. Dagegen spricht der Fall eines homozygoten Gesunden. Des Weiteren sind synonyme Mutationen durch die meist unbeeinträchtigte räumliche Struktur des Proteins selten pathogen <sup>98,104</sup>. Deshalb wird die Veränderung auch in diesem Fall als Polymorphismus ohne Krankheitswert gewertet.

### 3.2.2 Analyse der nicht-synonymen Punktmutationen in der BDE Kohorte

Neben den drei synonymen Punktmutationen wurde eine Punktmutation mit Aminosäureaustausch innerhalb der Kohorte mit BDE ausgemacht. Es handelt sich dabei um eine Punktmutation in Exon 4 mit Änderung der Aminosäuresequenz von Glutamin zu Arginin: c.3131A>G, Q1044R (chr18:22804751T>C). *Mutation Taster* prognostiziert für diese Mutation deshalb einen krankheitsverursachenden Effekt. Eine alterierte Aminosäuresequenz kann die räumliche Struktur eines Proteins, zum Beispiel durch Fehlfaltung, verändern und so seine Funktionalität beeinträchtigen <sup>104</sup>. Das geschieht u.a. durch die Interaktion der Ladungen innerhalb des Moleküls <sup>105</sup>. Die hier untersuchte Punktmutation führt durch den Aminosäureaustausch von Glutamin zu Arginin zu genau solch einem Ladungswechsel, da Glutamin ungeladen polar und Arginin positiv geladen ist <sup>106</sup>. Es ist also denkbar, dass die Veränderung einen Einfluss auf den räumlichen Aufbau von *ZNF521* hat.

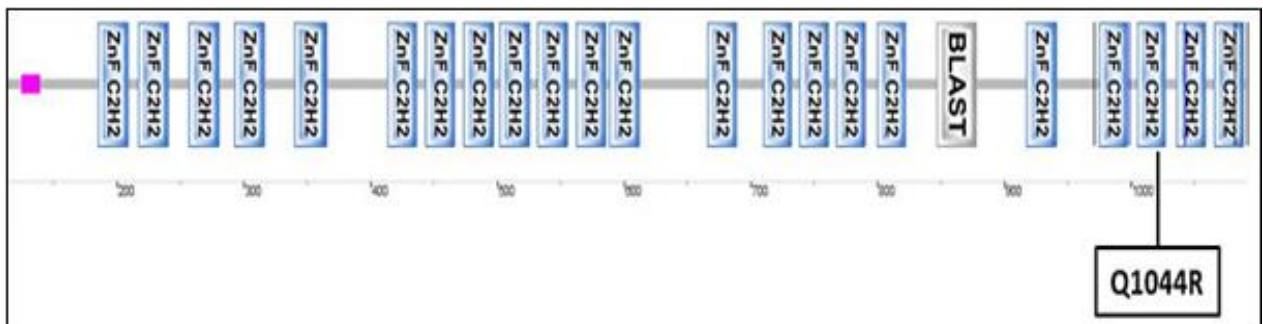


Abb. 16 Konservierung der mutierten Sequenz bis zum Zebrafisch  
Übersicht aus UCSC Genome Browser <sup>107</sup>



Ein weiteres wichtiges Merkmal für die Prädiktion von Pathogenität ist die evolutionäre Konservierung der betroffenen Region <sup>74</sup>. Für die untersuchte Punktmutation ist dem *UCSC Genome Browser* zu entnehmen, dass die veränderte Sequenz bis zum Zebrafisch gut konserviert ist, was auf eine funktionell bedeutende Sequenz hinweist (s. Abb. 16).

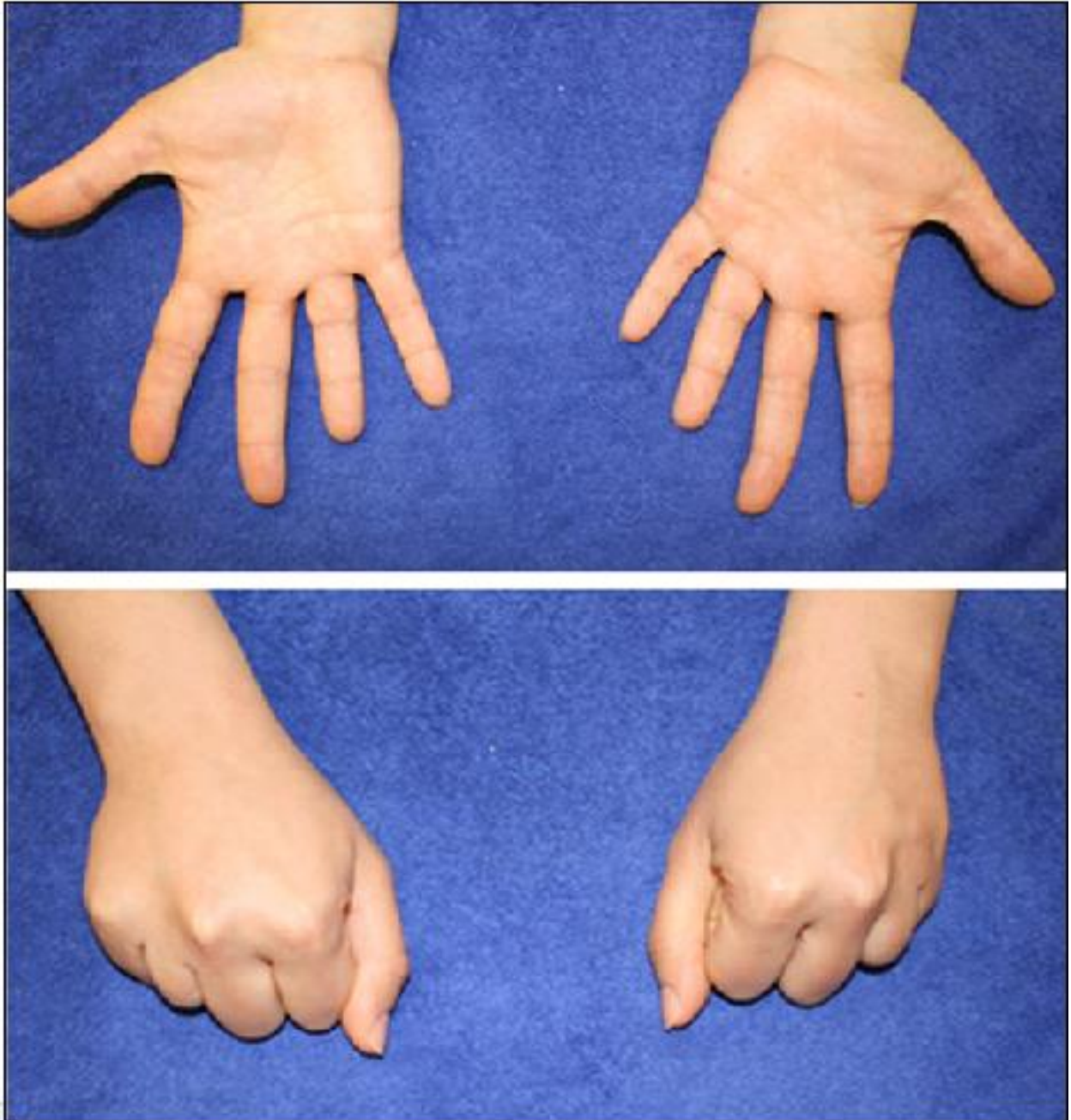
Um die Auswirkung des Aminosäureaustauschs auf die Funktionalität von ZNF521 genauer zu untersuchen, wurde die Lokalisierung dieses Austauschs innerhalb der Proteinstruktur von ZNF521 untersucht. Für diese Untersuchung wurde das Programm *SMART* herangezogen <sup>108,109</sup>. Es stellte sich heraus, dass der Aminosäureaustausch - und damit eine mögliche Veränderung der Raumstruktur von ZNF521 - innerhalb einer Zinkfingerdomäne liegt (s. Abb. 17). Diese Domänen vermitteln die Interaktion zwischen einem Effektorprotein und einer Zielstruktur, wie bspw. DNA, RNA oder andere Proteine. Da ZNF521 über seine Zinkfingerdomänen als Transkriptionsfaktor mit DNA interagiert und so die Genexpression beeinflusst, kann die Änderung der Zinkfingerstruktur durch die beschriebene Mutation zu veränderter Proteinbiosynthese und somit auch zu Auswirkungen auf die Entwicklung von Knorpel- und Knochengewebe führen. Eine Pathogenität der beschriebenen Mutation ist aus diesen Gründen wahrscheinlich.



**Abb. 17 SMART Protein Prädiktion** Die Punktmutation c.3131A>G, Q1044R (chr18:22804751T>C) betrifft die räumliche Struktur von ZNF521 innerhalb einer funktionalen Zinkfingerdomäne.

Zusätzlich wurde die Häufigkeit der Veränderung in der gesunden Bevölkerung untersucht. Die Mutation ist weder im *Exome variant Server* noch im *ExAC Browser* beschrieben. Auch in *PolyPhen-2* ist die Veränderung nicht bekannt und wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.995 als „probably damaging“ eingestuft. Innerhalb der untersuchten Kohorte kommt die Veränderung in einer Familie vor. Das entspricht einer Häufigkeit von 1,4%. Die betroffene Patientin hat eine BDE mit disproportioniertem Kleinwuchs. Die BDE betrifft den vierten und fünften Metacarpalknochen (s. Abb. 18)

sowie den fünften Metatarsalknochen bds. Es besteht außerdem eine Syndaktylie des zweiten und dritten Strahls der Füße sowie eine Sandalenlücke beidseits. Die erwachsene Patientin hat eine Körpergröße von 153cm bei einem Armspann von 147cm und einem Kopfumfang von 56cm. Zusätzlich zeigt sich klinisch eine Mittelgesichtshypoplasie.

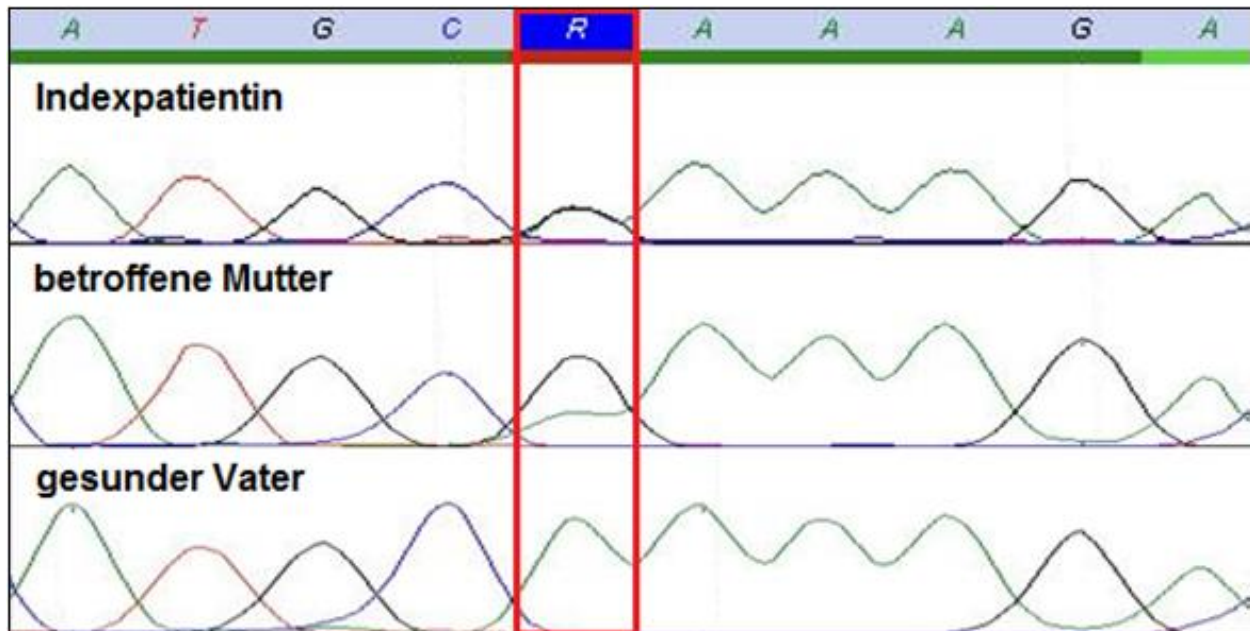


**Abb. 18 Klinik der Indexpatientin mit nicht-synonymer Punktmutation in ZNF521**

Brachydaktylie der Digiti 4 und 5 links und des Digitus 4 rechts. Bei Faustschluss imponieren die durch Metacarpalverkürzung deutlich rückverlagerten Artt. Metacarpo-phalangeales



Im Rahmen der Segregationsanalyse wurden gesunder Vater, gesunde Schwester und betroffene Mutter der Indexpatientin untersucht (s. Abb. 19). Letztere hat eine Körpergröße von 145cm, eine BDE und trägt die gleiche Mutation wie ihre Tochter. Bei den gesunden Verwandten ließ sich die Punktmutation dagegen nicht nachweisen.



**Abb. 19 Ausschnitt aus SeqPilot Sequenzanalyse (nicht-synonyme Variante)**

Die Indexpatientin ist heterozygot A/G, wie auch ihre betroffene Mutter. Gesunder Vater und Schwester sind homozygot A/A und tragen die Veränderung nicht.

Neben der genannten Punktmutation ist bei der Indexpatientin aus früheren Untersuchungen eine weitere genetische Veränderung bekannt. Es handelt sich dabei um eine Translokation und Insertion von Material aus Chromosom 1 in Chromosom 2 und 4 mit einhergehender Mikrodeletion. Der Befund nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung lautet:

Isdel(1)(p31.3p31.3)(RP11-105|06-,RP11-442|03-),ins(2;1)(p?;p31.3p31.3)(RP4-662P1+, RP11-5P4, RP4-537F10+; RP4-662P1-, RP11-5P4-,RP4537F10),ins(4;1)(p15.2;p31.2p31.3)(RP4-759M20+, RP4-700A9+;RP4-759M20dim, RP4-700A9-)

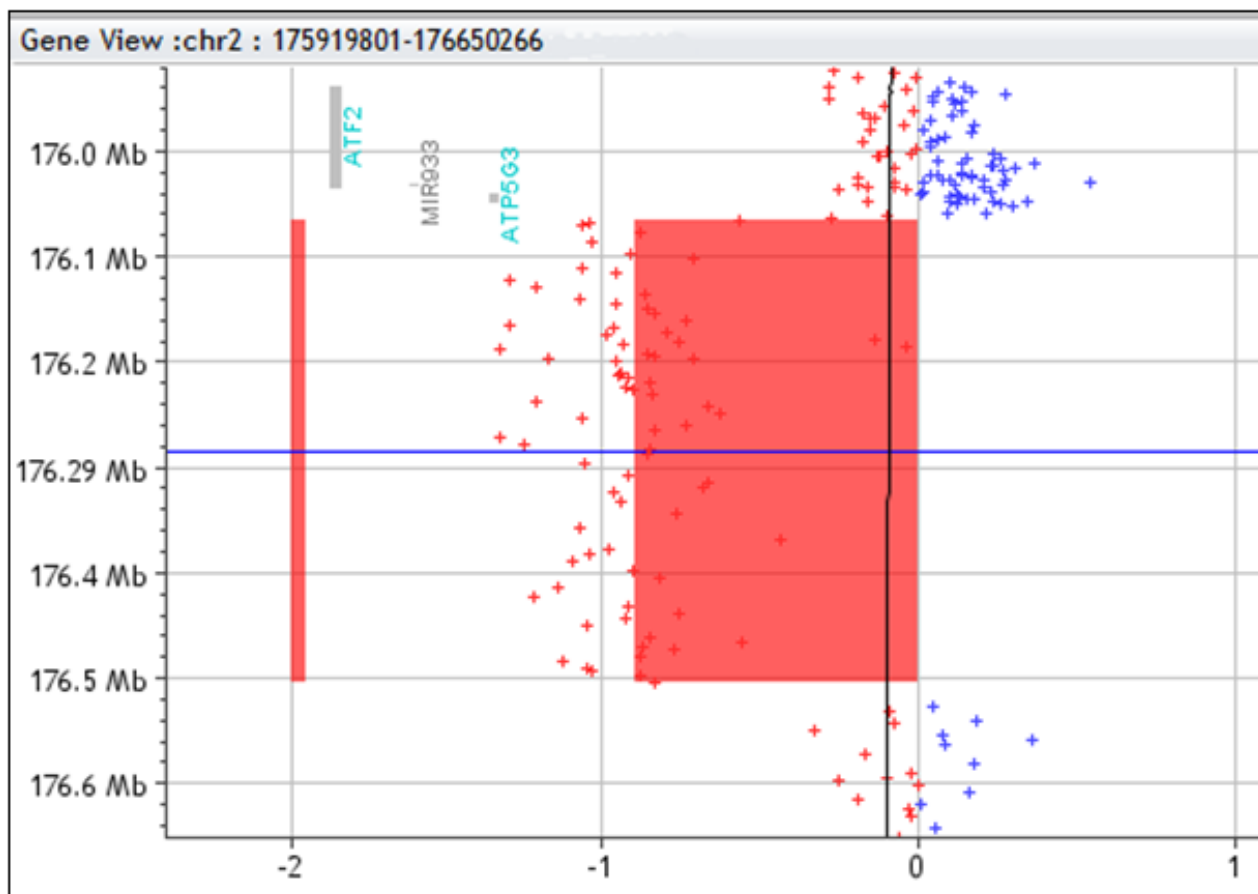
Um herauszufinden, ob diese Veränderung für die Klinik der Patientin verantwortlich sein könnte, wurde der mögliche Zusammenhang der deletierten Gene mit dem Phänotyp analysiert. Mithilfe des *UCSC Genome Browsers* konnten drei Gene im Bereich der Mikrodeletion ermittelt werden: *UBE2U*, *CACHD1* und *ROR1*. In der Literatur sind bislang keine Hinweise auf Interaktionen zwischen diesen Genen und der Entwicklung von

Extremitäten beim Menschen bekannt. Es besteht also kein kausaler Zusammenhang zwischen der genannten Mikrodeletion und der Klinik der Indexpatientin. Zusätzlich ist die Veränderung de novo entstanden - die betroffene Mutter der Patientin trägt sie daher nicht. Beides verringert die Wahrscheinlichkeit, dass die Veränderung für den Phänotyp der Familie verantwortlich ist und lässt die Punktmutation in *ZNF521* als mögliche Ursache offen.

### 3.3 Veränderung im regulatorischen Bereich des *HOXD* Clusters

#### 3.3.1 Ergebnisse der Array CGH

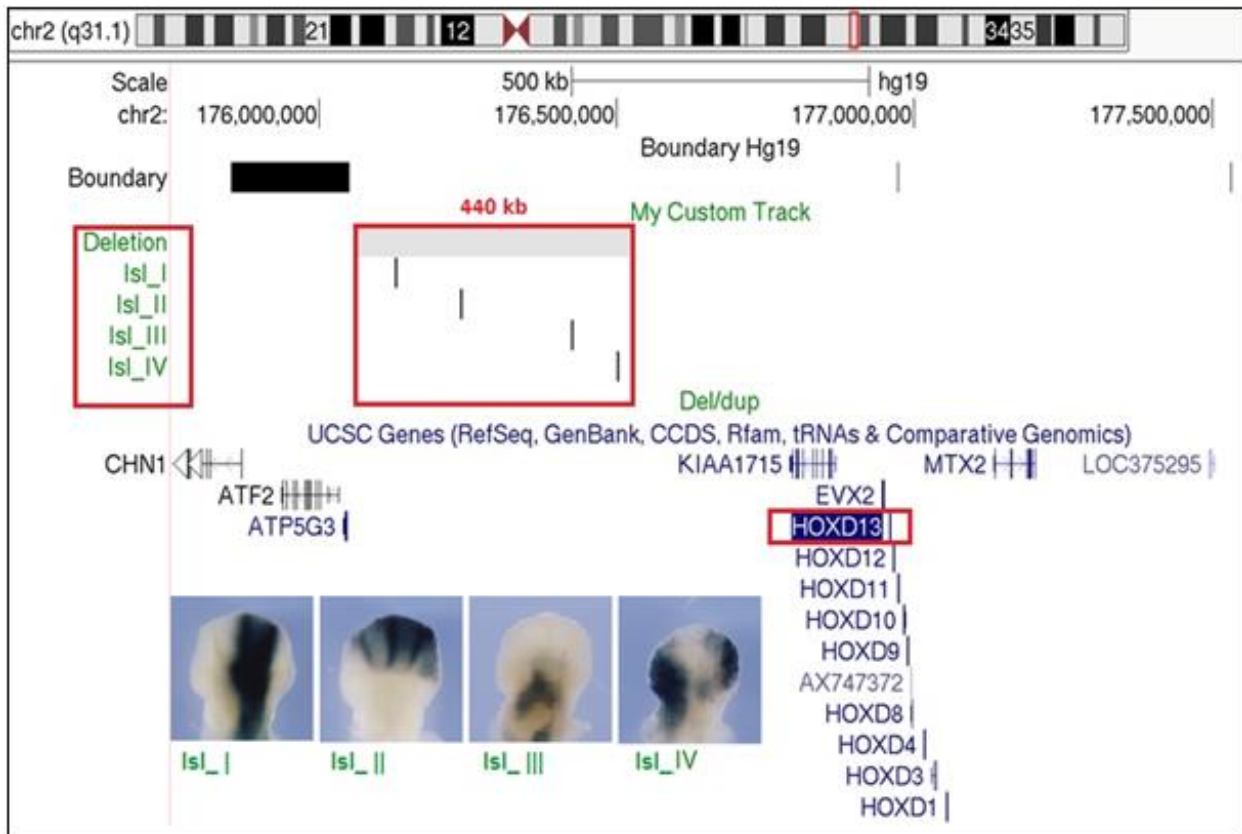
Beim Screening der 11 nicht verwandten Familien mit BDE fiel in einer Familie im Array CGH ein Verlust genetischen Materials im nicht codierenden Bereich 5' des *HOXD* Clusters auf. Dabei handelt es sich um einen Verlust mit einer Größe von ca. 440 kb. Der Befund lautet: Chr2q31.1 (176,063,573)x2 (176065894-176504173)x1 (176,528,040)x2.



**Abb. 20 Auswertung der Array CGH mit Agilent Cyto Genomics**

Ein erhöhtes Farbsignal der Kontroll-DNA (rot) im Vergleich zur Patienten-DNA (blau) zeigt den Verlust genetischen Materials im Patienten an.

Innerhalb des fehlenden Bereichs liegt bei Gesunden der regulatorische Archipel 5' des *HOXD* Clusters, der die Genexpression für die Entwicklung der distalen Extremitäten steuert<sup>87</sup>. Bei einer Größe von ca. 440 kb ist von einer Deletion aller vier regulatorischen Islands auszugehen, was im Folgenden durch qPCR überprüft wurde (s. Abschnitt 3.3.2).



**Abb. 21 Lokalisierung der Deletion: Beteiligung vier regulatorischer Islands des *HOXD* Clusters**  
Ausschnitt aus *UCSC Genome Browser*. Unten das Reporter Gene Essay der vier regulatorischen Islands im Mausembryo. In Anlehnung an Montavon et al.<sup>83</sup>

Die Veränderung ist weder in der Datenbank *Decipher* noch in der *Database of Genomic Variants* gelistet und im Menschen daher bislang nicht beschrieben<sup>110,111</sup>. Es existiert lediglich das zuvor beschriebene Mausmodell (s. Abschnitt 1.6). Klinisch zeigt sich bei der Indexpatientin eine Brachydaktylie Typ E mit Verkürzung aller Metacarpalknochen. Zusätzlich ist auch der dritte Metatarsalknochen bds. betroffen.



**Abb. 22 Klinik der Indexpatientin mit Deletion der vier regulatorischen Islands**

**a** Hände der Patientin mit plumpem Erscheinungsbild durch Verkürzung aller Metacarpalia.

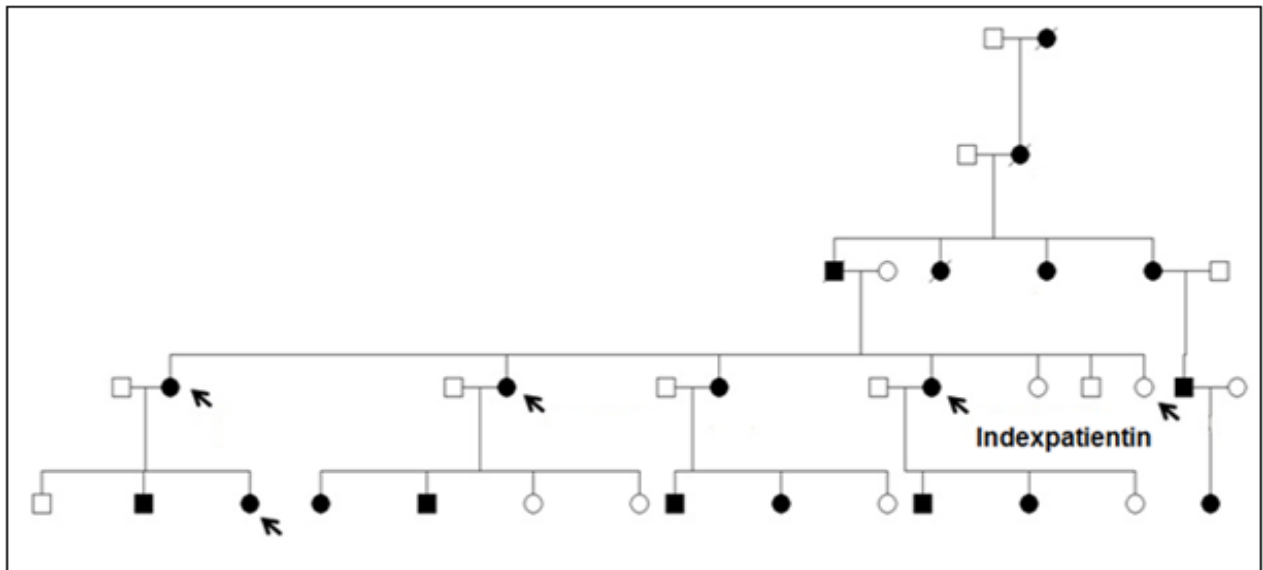
**b** entsprechende Röntgenaufnahme, markiert ist der besonders verkürzte vierte Metacarpalknochen.

**c** Füße der Patientin, Digitus 3 ist durch die Verkürzung des dritten Metatarsalknochens stark nach proximal

verlagert. **d** entsprechende Röntgenaufnahme.

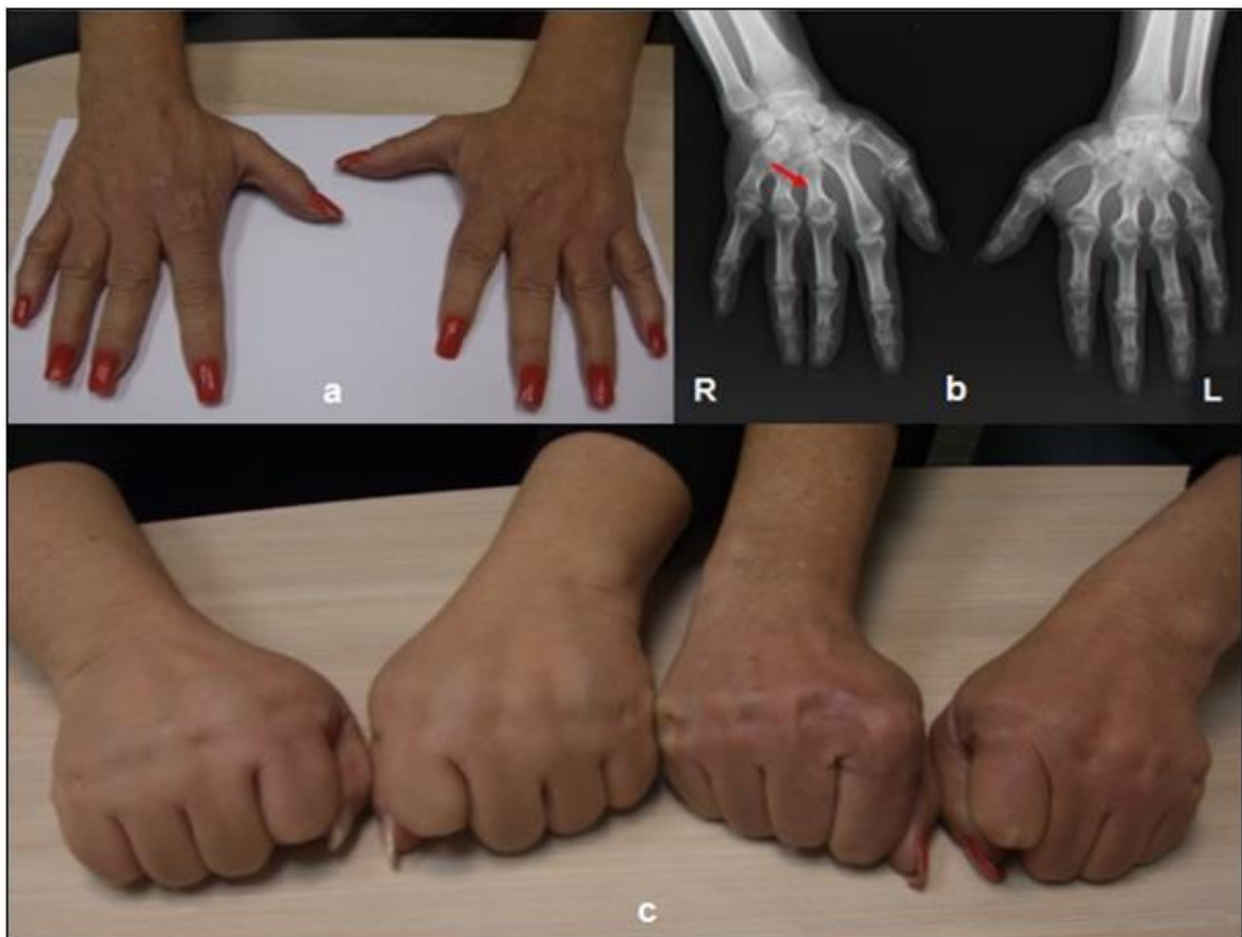
### 3.3.2 Segregationsanalyse via qPCR

In der Familie der Indexpatientin gibt es weitere Fälle skelettaler Fehlbildungen an den Extremitäten (s. Abb. 23). Die Fälle folgen einem autosomal dominanten Erbgang. Mit qPCR wurden die Ergebnisse aus dem Array CGH validiert und eine Segregationsanalyse durchgeführt. Zusätzlich zum genetischen Material der Indexpatientin wurde die DNA gesunder Verwandter sowie die DNA ihrer beiden betroffenen Schwestern untersucht. Letztere zeigen ebenfalls eine BDE. An den Händen sind alle Metacarpalia bis auf den zweiten Strahl der rechten Hand betroffen (s. Abb. 24).



**Abb. 23 Stammbaum der Indexfamilie mit BDE**

Es wurden die Indexpatientin, zwei ihrer betroffenen Schwestern, eine nicht betroffene Schwester sowie eine betroffene Nichte untersucht

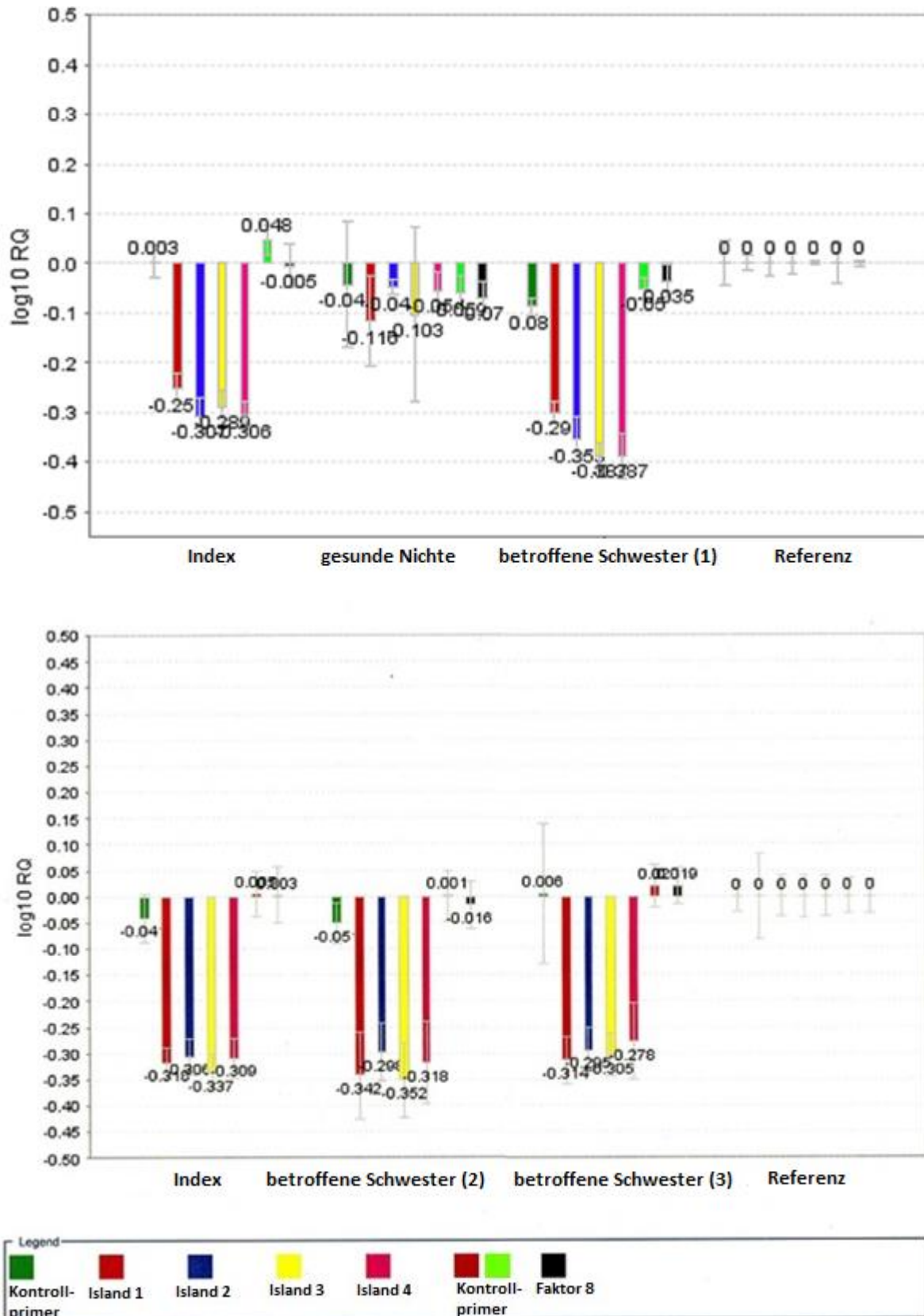


**Abb. 24 Phänotyp der betroffenen Schwestern**

**a** Hände einer betroffenen Schwester, verkürzte Finger fallen im Vergleich zum normal entwickelten Digitus 2 rechts auf. **b** entsprechende Röntgenaufnahme, markiert ist der stark verkürzte dritte Metacarpalknochen rechts. **c** Links im Bild Indexpatientin, rechts ihre betroffene Schwester. Typische Ausprägung von BDE mit fehlendem Hervorstehen der Artt. Metacarpo-phalangeales bei Faustschluss.

Die qCR sollte Aufschluss darüber geben, ob auch andere betroffene Familienmitglieder einen Verlust genetischen Materials im regulatorischen Archipel vor dem *HOXD* Cluster aufweisen. Der Zielsetzung entsprechend wurden dafür neben Kontrollprimern vier Primer designet, die jeweils genau im Bereich der regulatorischen Islands liegen. Das Ergebnis der qPCR stellte heraus, dass alle untersuchten, betroffenen Familienmitglieder den gleichen Verlust genetischen Materials aufweisen wie die Indexpatientin. Ein gesundes Familienmitglied zeigt die Veränderung dagegen nicht (s. Abb. 25).





**Abb. 25 Ergebnis der qPCR: Replikons im regulatorischen Archipel des *HOXD* Clusters**

Die betroffenen Familienmitglieder weisen den gleichen heterozygoten Verlust genetischen Materials für jede der vier regulatorischen Islands auf. Ein gesundes Familienmitglied zeigt diesen Verlust nicht. Zum Vergleich die Referenz-DNA.

### 3.3.3 Screening der restlichen Kohorte auf diese Veränderung via qPCR und Sanger Sequenzierung

Anschließend an die Segregationsanalyse wurden 53 der 67 nicht verwandten Familien mit BDE via qPCR auf die genannte Veränderung 5' des *HOXD* Clusters untersucht. 12 Familien konnten aufgrund ungenügenden genetischen Materials nicht untersucht werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen ergaben sich keine weiteren pathologischen Befunde.

Im Laufe weiterer Forschung am Institut fiel jedoch eine Patientin auf, die in der qPCR einen Verlust genetischen Materials im Bereich der Island 4 zeigte, was hinweisend für eine Deletion der entsprechenden Region ist. Klinisch besteht bei der Indexpatientin eine BDE und BDA mit Kleinwuchs (s. Abb. 27). Im Rahmen der Segregationsanalyse wurden die restlichen Familienmitglieder ebenfalls via qPCR auf diese Veränderung

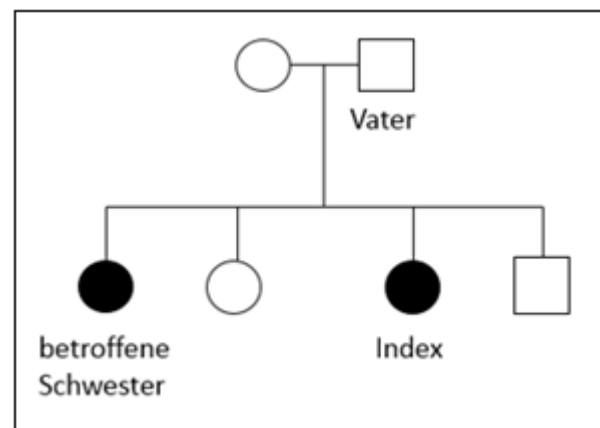


Abb. 26 Stammbaum der Indexfamilie mit BDE, BDA und Kleinwuchs

untersucht. Die betroffene Schwester der Patientin zeigt bei gleicher Klinik ebenfalls einen Verlust genetischen Materials in Island 4. Bei gesunder Schwester und Mutter der Indexpatientin ließ sich hingegen kein Verlust feststellen. Der Vater der Patientin konnte aufgrund unzureichender DNA-Qualität nicht in der qPCR untersucht werden. Anschließend an die qPCR wurde die DNA der untersuchten Familienmitglieder nach Sanger sequenziert, um den Bruchpunkt der vermuteten Deletion zu lokalisieren. Dabei fiel auf, dass es sich bei der Veränderung nicht um eine Deletion, sondern um eine heterozygote Punktmutation innerhalb der Island 4 handelt: chr2:176501624C>T (s. Abb. 29). Da diese Punktmutation im Bindungsbereich des qPCR Primers für Island 4 lag, konnte die entsprechende Region nicht repliziert werden – im Vergleich zu den anderen replizierten Islands des *HOXD* Clusters fiel die Veränderung daher als Verlust genetischen Materials auf. Die Variante ist in der Online Datenbank *ENSEMBL* unter der SNP-ID rs35729413 zu finden. Die globale Allelfrequenz für das seltenere Allel T statt C wird mit einer Häufigkeit von 0,08% angegeben<sup>97</sup>. Die Seltenheit dieser Punktmutation weist auf eine mögliche Pathogenität hin.





**Abb. 27 Klinik der Indexpatientin mit verminderter Replikon-Menge in Island 4**

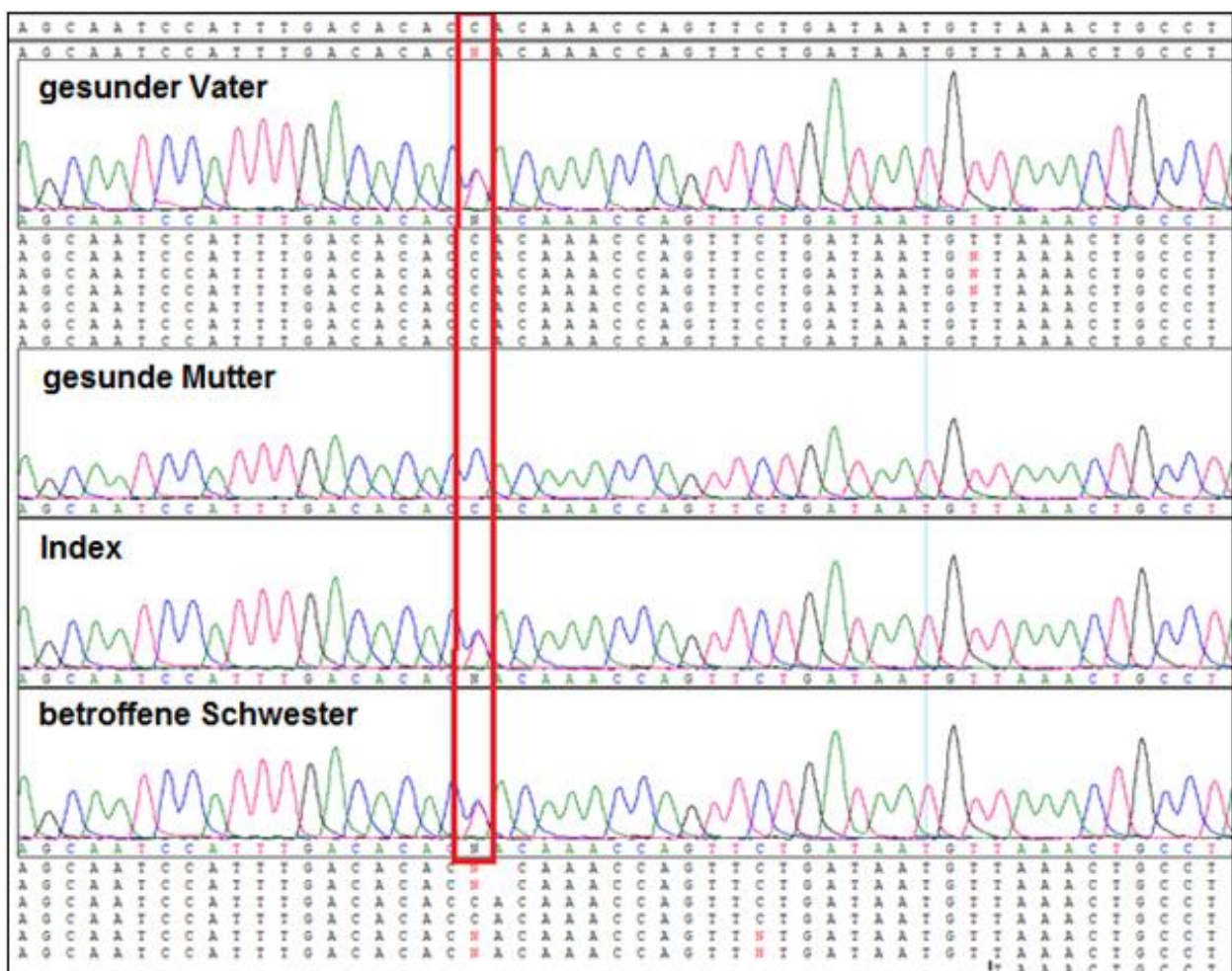
**a** Linke und rechte Hand der Patientin mit auffällig verkürzter Endphalanx des Digitus 2 links als Manifestation der BDA und plumpem Erscheinungsbild durch die BDE. **b** Linker und rechter Fuß der Patientin mit auffallend stark verkürzten Digiti 3 und 4 bds. **c** Röntgenaufnahme der Hände mit BDA am Digitus 2 links und BDE am Digitus 4 rechts. **d** Röntgenaufnahme der Füße mit ausgeprägter BDE der Digiti 3 und 4 rechts.

Im Rahmen der Segregationsanalyse zeigte sich die Punktmutation erwartungsgemäß bei der Indexpatientin sowie bei ihrer betroffenen Schwester. Die gesunde Mutter und beide gesunden Geschwister sind nicht Träger der Mutation. Die Veränderung fiel zusätzlich beim bisher klinisch unauffälligen Vater auf. Bei näherer Betrachtung von Röntgenaufnahmen zeigte sich jedoch bds. eine sehr diskrete Verkürzung der Mittelphalangen am Fuß, die als BDA mit verminderter Penetranz diskutiert werden kann (s. Abb. 28).



**Abb. 28 Klinik des Vaters mit Punktmutation in Island 4**

**a** Linker Fuß des Vaters mit milder Ausprägung einer BDA im Sinne verkürzter Mittelphalangen, v.a. an Digitus 2 und 3. **b** zum Vergleich Röntgenaufnahme eines linken Fußes mit normal ausgebildeten Mittelphalangen. Bild der Universität Bern <sup>112</sup>



**Abb. 29 Sequenzanalyse im Bereich der Island 4**

Heterozygote Punktmutation bei beiden betroffenen Töchtern und gesundem Vater (fragliche Minimalvariante der BDA s.o.). Wildtyp Base C (blau) wird überlagert von mutierter Variante T (rot). Die gesunde Mutter trägt die Veränderung nicht.

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

#### 4.1.1 Mutationen in *ZNF521* sind eine mögliche Ursache von BDE und Kleinwuchs

*PTHLH* ist ein bekanntes Gen in der Entstehung von Brachydaktylie Typ E mit Kleinwuchs, *ZNF521* ein bewiesener Effektor in dessen Signalkette und in dieser Arbeit folglich Gegenstand der Untersuchung als neues Kandidatengen für Brachydaktylie Typ E <sup>35,55</sup>. Innerhalb der BDE Kohorte von 67 nicht verwandten Familien wurden bei der Sequenzierung nach Sanger drei synonyme sowie eine non-synonyme Punktmutation gefunden. Bei zwei der drei synonymen Veränderungen (chr18:22804549G>C, P → P und chr18:22807336C>T, A → A) handelte es sich nach weiterer Recherche in verschiedenen Datenbanken um Polymorphismen ohne Krankheitswert - zum einen begründet durch die hohe Häufigkeit innerhalb der gesunden Bevölkerung, zum anderen durch die Anzahl gesunder homozygoter Individuen trotz entsprechender Veränderungen. Die dritte synonyme Mutation (chr18:22807066G>A, Cys→Cys) ist zwar seltener als die beiden zuvor genannten Varianten, ein gesunder homozygoter Fall mit dieser Mutation sowie die generelle Seltenheit von pathogenen synonymen Mutationen sprechen dennoch insgesamt gegen eine Pathogenität <sup>104,105</sup>.

Zusätzlich zu den synonymen Mutationen wurde bei der Sequenzierung nach Sanger eine Punktmutation mit Aminosäureaustausch gefunden: c.3131A>G, Q1044R (chr18:22804751T>C). Dieser Aminosäureaustausch bringt im kodierten Protein einen Ladungswechsel mit sich, der sich auf die räumliche Struktur des Proteins und damit auch auf seine Funktionalität auswirken kann – eine Voraussetzung für die Pathogenität einer Mutation <sup>104,105</sup>. Die Mutation befindet sich in einer Zink Finger Domäne. Zudem ist die Region der Mutation in *ZNF521* bis zum Zebrafisch konserviert, was eine hohe funktionelle Bedeutung dieses DNA-Abschnitts unterstützt <sup>98</sup>. Weiterhin ist die Punktmutation bislang in keiner Datenbank beschrieben (bspw. *ExAC* und *1000 Genomes Project*). In verschiedenen Prädiktionsprogrammen (*Mutation Taster*, *Polyphen-2*, *UCSC*) wurden hohe Pathogenitätswerte vorhergesagt. Die Mutation ist daher unter Berücksichtigung der Klinik in der Indexfamilie sowohl als Kandidat für die Entstehung einer BDE als auch eines Kleinwuchses zu werten. Die gemeinsame Klinik

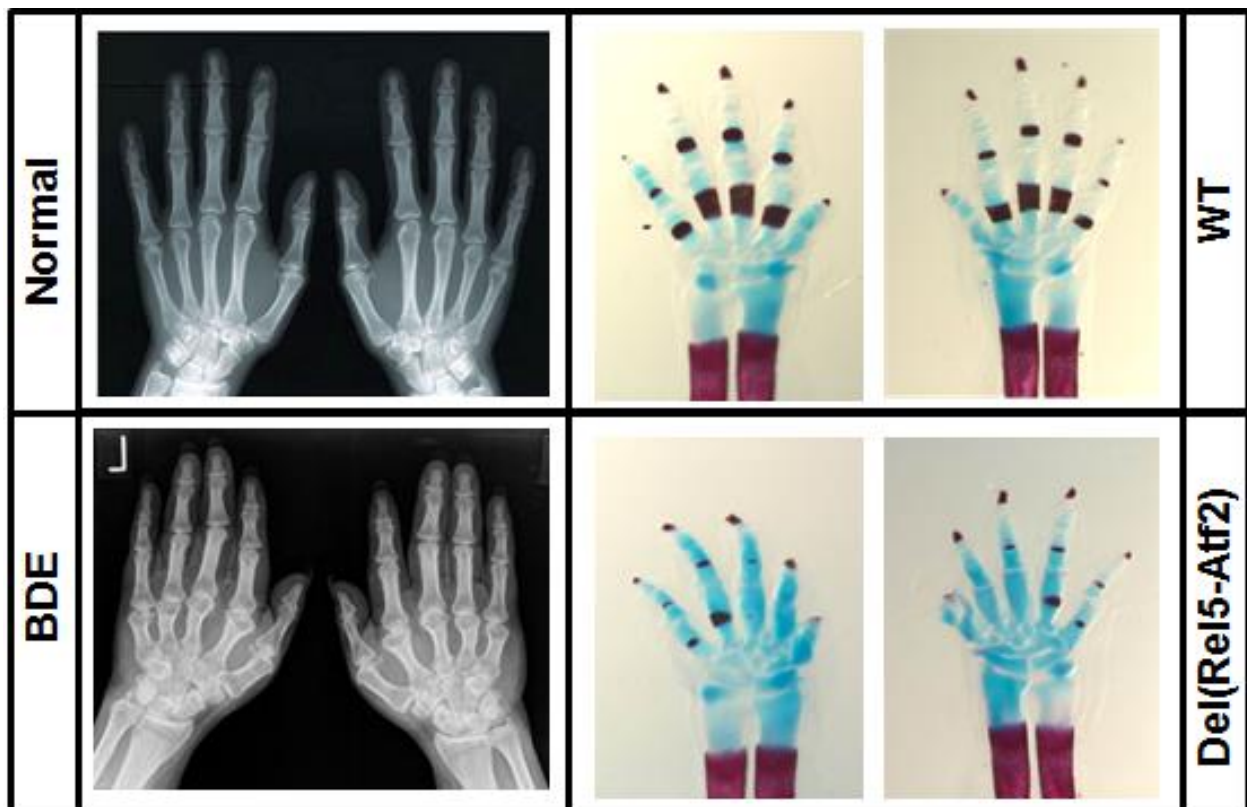
von BDE und Kleinwuchs ist durch die Funktion von ZNF521 als Effektor von PTHLH zu erwarten, da Mutationen in *PTHLH* zur gleichen klinischen Ausprägung führen. Auch das ist ein Hinweis auf die Pathogenität der gefundenen Mutation.

#### **4.1.2 Deletionen im regulatorischen Archipel des *HOXD* Clusters führen im Menschen zur Ausprägung einer Brachydaktylie Typ E**

Mutationen im *HOXD* Cluster sind eine bereits bekannte Ursache für die Ausprägung einer Brachydaktylie Typ E <sup>48,91</sup>. Um der Frage nachzugehen, ob auch Mutationen im regulatorischen Archipel des Clusters zum Phänotyp einer Brachydaktylie führen, wurden 11 nicht verwandte Familien via Array CGH und qPCR untersucht. So konnte bei einer Familie eine Deletion der ersten vier regulatorischen Islands in der Genwüste 5' des *HOXD* Clusters gefunden werden (Manuskript Flöttmann et al. under review). Die Deletion segregiert mit der Klinik einer BDE bei allen untersuchten betroffenen Familienmitgliedern. Skelettale Fehlbildungen der Hand konnten im Mausmodell bei Deletionen einzelner Islands gezeigt werden und sprechen mit den Befunden der Indexfamilie grundsätzlich überein (s. Abschnitt 3.3.1), was den Verdacht auf eine Pathogenität der gefundenen Deletion unterstützt <sup>83</sup>. Zudem ist die Deletion dieser regulatorischen Islands im Menschen bislang nicht bekannt – verschiedene Datenbanken wurden für diese Recherche herangezogen (*Decipher, Database of Genomic Variants*). Bei dieser Informationslage kann die Deletion daher als wahrscheinliche Ursache für die BDE der Indexfamilie betrachtet werden.

Im weiteren Verlauf der Zusammenarbeit mit dem Max Planck Institut für molekulare Genetik konnte die gefundene Deletion als Ursache für die Entwicklung einer BDE bewiesen werden. Um der Veränderung eine sichere Pathogenität zuschreiben zu können, wurde ein Mausmodell mit dem Genotyp der betroffenen Familienmitglieder erstellt. Die ersten fünf regulatorischen Islands wurden dafür im Mausgenom deletiert, was der gefundenen Deletion genotypisch sehr nahe kommt. Allerdings erfolgte die Deletion im Mausgenom homozygot, während sie in der Indexfamilie heterozygot vorliegt. Dies ist eine notwendige Abweichung bei der Erstellung von Mausmodellen, da diese robuster sind als der menschliche Organismus und bei einer heterozygoten Mutation in einer Maus nicht mit einer Veränderung des Phänotyps zu rechnen wäre <sup>113</sup>. Das Ergebnis der nachgestellten Deletion war eine exakte Kopie des menschlichen Phänotyps in der erstellten Maus (s. Abb. 30). Damit kann die Deletion der regulatorischen Islands 1 bis 4 sicher als Ursache der Brachydaktylie Typ E in der

Indexfamilie gewertet werden.



**Abb. 30 Phänotyp der betroffenen Familie und des entsprechenden Mausmodells – Wildtyp im Vergleich**  
 Links unten Röntgenbild der Indexpatientin mit BDE an allen Mittelphalangen. Rechts unten Abbildung des Phänotyps im Mausmodell nach Deletion der ersten fünf regulatorischen Islands. Es zeigt sich eine exakte Phänokopie des menschlichen Phänotyps als Beweis der Deletion für die BDE. Links und rechts oben Normalbefunde zum Vergleich.  
 Manuskript Flöttmann et al. under review

#### 4.1.3 Punktmutationen im regulatorischen Archipel des *HOXD* Clusters sind eine mögliche Ursache für die Ausprägung einer BDE oder einer BDA

Im Laufe weiterer Untersuchungen in der Arbeitsgruppe konnte eine weitere Familie mit einer Veränderung im regulatorischen Archipel des *HOXD* Clusters gefunden werden. Es handelt sich dabei um eine Punktmutation innerhalb der vierten regulatorischen Island: chr2:176501624C>T (Manuskript Flöttmann et al. under review). Klinisch zeigt sich bei der Familie sowohl eine BDA als auch eine BDE. Mit Ausnahme des bislang als gesund geltenden Vaters, bei dem eine Minimalvariante der BDA angenommen werden kann, segregiert die Veränderung ausschließlich mit den betroffenen Familienmitgliedern. Die Punktmutation ist bereits als Polymorphismus bekannt (SNP-ID rs35729413) und kommt in der Bevölkerung selten vor (Minor Allele Frequency von 0,08% im *Exome Variant Server*), was eine Pathogenität der Veränderung möglich macht. Zudem belegt die in



Abschnitt 4.1.2 beschriebene Deletion der Islands die funktionelle Bedeutsamkeit dieser Region vor dem *HOXD* Cluster. Weitere Veränderungen im regulatorischen Archipel - wie die gefundene Punktmutation – können demnach als wahrscheinliche Ursache der Klinik in der Familie gewertet werden. Dabei käme sie in diesem Fall sowohl für eine BDE als auch für eine BDA in Frage.

## 4.2 Schwächen der vorliegenden Arbeit

### 4.2.1 Eingeschränkte Aussagekraft der Segregationsanalysen

Mangels DNA Material konnten in einigen Segregationsanalysen nicht alle Familienmitglieder untersucht werden. Trotz starker Bemühungen, nachträglich mehr DNA der betroffenen Familien zu erhalten, gestaltete sich die Sammlung durch die z.T. großen räumlichen Entfernungen und die eingeschränkte Bereitschaft gesunder Familienmitglieder, DNA Proben abzugeben, schwierig. Eine unvollständige Segregationsanalyse findet sich bei der Untersuchung der zweiten synonymen Punktmutation in *ZNF521* (chr18:22807336C>T, A → A), in der der Kindsvater nicht untersucht werden konnte. Da es sich bei dieser Veränderung jedoch nachweislich um einen Polymorphismus ohne Krankheitswert handelt, führt der Mangel an DNA nicht zu Einschränkungen in der Bewertung der Veränderung.

In der Familie mit Deletion der vier regulatorischen Islands 5' des *HOXD* Clusters konnte in der qPCR nur ein einziges gesundes Familienmitglied untersucht werden, was die Aussage zur Pathogenität der Läsion zunächst ungenau machte, da nicht hinreichend ausgeschlossen werden konnte, dass gesunde Familienmitglieder nicht von der Veränderung betroffen sind. Durch den anschließenden Beweis zur Pathogenität der Deletion im Mausmodell konnte die Veränderung als Ursache der BDE jedoch trotz eingeschränkter Segregationsanalyse eindeutig ausgemacht werden.

In der Familie mit Punktmutation der vierten regulatorischen Island (chr2:176501624C>T), konnten die beiden gesunden Geschwister der Indexpatientin nicht auf die Veränderung untersucht werden. Da in diesem Fall die Pathogenität der Mutation weder eindeutig ausgeschlossen noch bewiesen ist, würde die Untersuchung bei Ausschluss der Vorkommens in gesunden Familienmitgliedern den Verdacht auf eine wahrscheinliche Pathogenität weiter erhärten.

#### 4.2.2 Geringe Fallzahl der non-synonymen Punktmutation in *ZNF521*

Innerhalb der Kohorte von 67 nicht verwandten Familien mit BDE wurde die non-synonyme Punktmutation c.3131A>G, Q1044R (chr18:22804751T>C) nur in einer Familie gefunden. Trotz hoher Wahrscheinlichkeit für die Pathogenität dieser Mutation ist die Bewertung aufgrund des Einzelfalls und des mangelnden Beweises durch ein Mausmodell eingeschränkt.

#### 4.2.3 Schwierige Zuordnung der Phänotypen durch multiple Klinik

Welcher Phänotyp durch eine Mutation ausgelöst wird, kann nur durch eine funktionelle Untersuchung, wie z.B. ein Mausmodell bewiesen werden. Solang es kein Modell gibt, muss der Phänotyp durch die klinische Begutachtung der Symptome innerhalb der betroffenen Familien und die Kombination zum abweichenden Genotyp erörtert werden. Haben die Patienten mehrere Symptome gleichzeitig, ist es meist schwierig, eine genaue Aussage darüber zu treffen, welches Symptom genau von der Mutation verursacht werden könnte und welches nicht. Vor allem, wenn sie bei den untersuchten Patienten in der Kohorte das gleiche System betreffen – im hier untersuchten Fall das Skelettsystem. Bei der gefundenen dritten synonymen Punktmutation in *ZNF521* (chr18:22807066G>A, Cys→Cys) zeigt sich in der Familie sowohl eine BDE als auch ein Kleinwuchs. Die Veränderung zeigt sich auch bei Patienten, die nur einen Kleinwuchs und keine BDE haben. Damit wäre die Punktmutation zwar insgesamt als unwahrscheinliche Ursache der Klinik, aber am ehesten als Ursache des Kleinwuchses zu werten – und nicht als Ursache der BDE. Dem hingegen besteht immer ein Risiko, Minimalvarianten einer Brachydaktylie zu übersehen, was die Zuordnung von genomischen Veränderung zur Klinik zusätzlich erschwert.

Die gefundene non-synonyme Punktmutation in *ZNF521* c.3131A>G, Q1044R (chr18:22804751T>C) tritt innerhalb der Familie gleichzeitig mit BDE und Kleinwuchs auf, was gut zum Profil von *ZNF521* als Effektor von PTHLH passt (s. Abschnitt 4.1.1). Trotzdem reicht die Herleitung aus der Signalkette von PTHLH als Information nicht aus, um mit Sicherheit sagen zu können, dass die Veränderung in *ZNF521* eine BDE, einen Kleinwuchs oder beide Symptome bedingen könnte.

Ein gleichartiges Problem findet sich bei der Familie mit der Punktmutation in der vierten regulatorischen Island 5' des *HOXD* Clusters (chr2:176501624C>T), bei der sowohl eine BDE als auch eine BDA auftritt. Da sich die Veränderung auch beim bisher als gesund geltenden Vater der Indexpatientin zeigt und bei diesem eine Minimalvariante der BDA

zu diskutieren ist, spricht dies eher für die Veränderung als Ursache einer BDA. Eine genaue Abklärung ist bei der aktuellen Datenlage ohne funktionelle Untersuchung auch hier noch nicht möglich.

### 4.3 Zusammenfassung, Schlussfolgerungen und Ausblick

Brachydaktylie Typ E (BDE) gehört zu einer Gruppe von Fehlbildungen der Extremitäten und bezeichnet die disproportionale Verkürzung oder das Fehlen von Mittelphalangen. Die Mehrheit der Fälle von BDE ist ätiologisch bis heute nicht geklärt, sodass auf diesem Gebiet Forschungsbedarf besteht<sup>1,2</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits bekannte genetische Ursachen von BDE recherchiert und daraus ein neues Kandidatengen sowie eine zu untersuchende Zielregion abgeleitet. Diese wurden auf neue Mutationen als mögliche Ursache von BDE analysiert.

Bereits bekannte Ursachen sind Mutationen in *PTHLH*, die zu BDE und Kleinwuchs führen<sup>35</sup>. *PTHLH* fördert das Längenwachstum von Knochen und induziert die Expression des Transkriptionsfaktors *ZNF521*, das als sein direkter Effektor fungiert. Im Mausmodell entwickeln *ZNF521*-Knockout-Mäuse verkürzte Extremitäten, sodass sich die Frage ergab, ob Mutationen in *ZNF521* auch im Menschen Ursache einer BDE sein könnten<sup>55</sup>. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde eine Kohorte von 67 nicht verwandten Familien mit BDE via Sanger Sequenzierung untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine bislang unbekannte nicht-synonyme Punktmutation in *ZNF521* gefunden. Der Befund lautet: c.3131A>G, Q1044R (chr18:22804751T>C). Klinisch zeigen sich eine BDE und Kleinwuchs. In Programmen zur Prädiktion der Pathogenität wird die Variante als „disease causing“ (*Mutation Taster*) und mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,5% als „probably damaging“ (*PolyPhen2*) eingestuft<sup>98</sup>. Zusätzlich liegt die Mutation in einer gut konservierten funktionalen Zinkfingerdomäne, sodass eine Modifizierung der Proteinstruktur zu erwarten ist. Insgesamt ist es wahrscheinlich, dass diese Faktoren zu einer Beeinträchtigung in der Funktion von *ZNF521* als Transkriptionsfaktor führen und das klinische Bild einer Brachydaktylie erklären können. Trotz vieler Faktoren, die auf eine Pathogenität hinweisen, hat die Diskussion der Kausalität auch ihre Grenzen. In der Kohorte wurde nur eine Familie mit der genannten Mutation gefunden - ein zweiter Fall würde den Verdacht weiter erhärten. Außerdem ist der Bezug zur Klinik nicht eindeutig auf BDE einzugrenzen, da sich in der Indexfamilie auch ein Kleinwuchs zeigt. Mutationen in *ZNF521* könnten möglicherweise



für beide Phänotypen infrage kommen. Um Mutationen in *ZNF521* als allgemeingültige Krankheitsursache für BDE und/oder Kleiwuchs klarer darzustellen, müsste die gleiche Punktmutation in weiteren Familien mit dieser Pathologie gefunden werden. Nach dem Fund einer zweiten Familie mit dieser Punktmutation könnte ein Mausmodell mit dem gleichen Genotyp den abschließenden Beweis erbringen, dass Mutationen in *ZNF521* Kleinwuchs und/oder BDE bedingen. Die Ergebnisse würden die Funktion von *ZNF521* im Knochenstoffwechsel näher beleuchten und so neue Erkenntnisse über die Entwicklung von Knochenstrukturen erbringen. Diese Informationen könnten hilfreich für die Aufklärung von Pathologien im Knochenstoffwechsel sein und die Entwicklung von Therapien für Knochenerkrankungen im Allgemeinen voranbringen.

Eine weitere bekannte Ursache von BDE sind Mutationen im *HOXD* Cluster, das die Entwicklung der Extremitäten räumlich und zeitlich koordiniert <sup>89</sup>. Im Mausmodell zeigt sich, dass Deletionen einzelner regulatorischer Islands im nicht-kodierenden Bereich vor dem *Hoxd* Cluster zu fehlerhafter Ausbildung der Extremitäten führen <sup>83</sup>. So stellte sich die Frage, ob auch im Menschen Mutationen im nicht kodierenden Bereich der DNA - und insbesondere in der regulatorischen Region des *HOXD* Clusters - Ursache von BDE sein können. Um dem nachzugehen, wurden 11 nicht verwandte Familien mit BDE via Array CGH auf Verluste oder Zugewinne genetischen Materials im gesamten Genom analysiert. Auffallende Mutationen wurden via qPCR validiert. Anschließend wurden 53 Familien der BDE Kohorte gezielt auf diese Veränderung gescreent. Mit dieser Methode wurde eine Deletion im Bereich des *HOXD* Clusters gefunden, die vier der fünf regulatorischen Islands betrifft. Klinisch zeigt sich bei der Familie eine isolierte BDE. In aktuellen Datenbanken (*Decipher, Database of Genomic Variants*) ist die Veränderung bislang nicht beschrieben <sup>110,111</sup>. Im Laufe weiterer Zusammenarbeit mit dem Max Planck Institut für molekulare Genetik wurde ein Mausmodell mit dem gleichen Genotyp der betroffenen Familienmitglieder erstellt, das eine exakte Phänokopie der Klinik im Menschen zeigte. Somit konnte die Deletion, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurde, als Ursache für die Entwicklung von BDE bewiesen werden (Manuskript Flöttmann et al. under review). Im Laufe weiterer Kooperation mit dem Institut für Humangenetik der Charité wurde außerdem eine Punktmutation in der vierten regulatorischen Island gefunden, die klinisch mit einer BDE sowie mit einer BDA einhergeht. Diese Erkenntnisse lassen auf eine allgemein hohe pathologische Bedeutung von Veränderungen im regulatorischen Archipel des *HOXD* Clusters schließen. Möglicherweise sind weitere Veränderungen in diesem Areal Ursache von BDE und weiterer Brachydaktylie Typen, sodass weitere

Untersuchungen zur Aufklärung unbekannter Brachydaktylie-Fälle angestrebt werden sollten. Da erstmalig gezeigt wurde, dass der regulatorische Archipel des *HOXD* Clusters auch im Menschen eine große Rolle in der Entwicklung der Extremitäten spielt, können sich auf lange Sicht auch in diesem Fall Konsequenzen für das Verständnis und die Therapie weiterer Erkrankungen des Skelettsystems ergeben.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Mundlos S. The brachydactylies: a molecular disease family. *Clinical genetics* 2009;76:123-36.
2. Temtamy SA, Aglan MS. Brachydactyly. *Orphanet journal of rare diseases* 2008;3:15.
3. Hall CM. International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001). *American journal of medical genetics* 2002;113:65-77.
4. Superti-Furga A, Unger S. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2006 revision. *American journal of medical genetics Part A* 2007;143:1-18.
5. Gao B, Guo J, She C, Shu A, Yang M, Tan Z, Yang X, Guo S, Feng G, He L. Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nature genetics* 2001;28:386-8.
6. McCready ME, Sweeney E, Fryer AE, Donnai D, Baig A, Racacho L, Warman ML, Hunter AG, Bulman DE. A novel mutation in the IHH gene causes brachydactyly type A1: a 95-year-old mystery resolved. *Human genetics* 2002;111:368-75.
7. Kjaer KW, Eiberg H, Hansen L, van der Hagen CB, Rosendahl K, Tommerup N, Mundlos S. A mutation in the receptor binding site of GDF5 causes Mohr-Wriedt brachydactyly type A2. *Journal of medical genetics* 2006;43:225-31.
8. Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Suring K, Majewski F, Tinschert S, Grzeschik KH, Muller D, Knaus P, Nurnberg P, Mundlos S. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:12277-82.
9. Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, Yoneda T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *Journal of biochemistry* 2012;151:247-54.
10. Temtamy SA, McKusick VA. The genetics of hand malformations. *Birth defects original article series* 1978;14:i-xviii, 1-619.
11. Oldridge M, Fortuna AM, Maringa M, Propping P, Mansour S, Pollitt C, DeChiara TM, Kimble RB, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Wilkie AO. Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nature genetics* 2000;24:275-8.
12. Schwabe GC, Tinschert S, Buschow C, Meinecke P, Wolff G, Gillessen-Kaesbach G, Oldridge M, Wilkie AO, Komec R, Mundlos S. Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. *American journal of human genetics* 2000;67:822-31.
13. Lehmann K, Seemann P, Silan F, Goecke TO, Irgang S, Kjaer KW, Kjaergaard S, Mahoney MJ, Morlot S, Reissner C, Kerr B, Wilkie AO, Mundlos S. A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *American journal of human genetics* 2007;81:388-96.
14. Storm EE, Kingsley DM. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 1996;122:3969-79.
15. Schwabe GC, Turkmen S, Leschik G, Palanduz S, Stover B, Goecke TO, Mundlos

- S. Brachydactyly type C caused by a homozygous missense mutation in the prodomain of CDMP1. *American journal of medical genetics Part A* 2004;124A:356-63.
16. Johnson D, Kan SH, Oldridge M, Trembath RC, Roche P, Esnouf RM, Giele H, Wilkie AO. Missense mutations in the homeodomain of HOXD13 are associated with brachydactyly types D and E. *American journal of human genetics* 2003;72:984-97.
17. Hertzog KP. Brachydactyly and pseudo-pseudohypoparathyroidism. *Acta geneticae medicae et gemellologiae* 1968;17:428-38.
18. Pereda A, Garin I, Garcia-Barcina M, Gener B, Beristain E, Ibanez AM, Perez de Nanclares G. Brachydactyly E: isolated or as a feature of a syndrome. *Orphanet journal of rare diseases* 2013;8:141.
19. Mortlock DP, Innis JW. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nature genetics* 1997;15:179-80.
20. van Bokhoven H, Celli J, van Reeuwijk J, Rinne T, Glaudemans B, van Beusekom E, Rieu P, Newbury-Ecob RA, Chiang C, Brunner HG. MYCN haploinsufficiency is associated with reduced brain size and intestinal atresias in Feingold syndrome. *Nature genetics* 2005;37:465-7.
21. Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* 2003;130:15-28.
22. Zhulyn O, Li D, Deimling S, Vakili NA, Mo R, Puvindran V, Chen MH, Chuang PT, Hopyan S, Hui CC. A switch from low to high Shh activity regulates establishment of limb progenitors and signaling centers. *Developmental cell* 2014;29:241-9.
23. Drezner MK, Neelon FA, Haussler M, McPherson HT, Lebovitz HE. 1,25-Dihydroxycholecalciferol deficiency: the probable cause of hypocalcemia and metabolic bone disease in pseudohypoparathyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1976;42:621-8.
24. de Sanctis L, Vai S, Andreo MR, Romagnolo D, Silvestro L, de Sanctis C. Brachydactyly in 14 genetically characterized pseudohypoparathyroidism type Ia patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004;89:1650-5.
25. Levine MA, Modi WS, O'Brien SJ. Mapping of the gene encoding the alpha subunit of the stimulatory G protein of adenylyl cyclase (GNAS1) to 20q13.2----q13.3 in human by in situ hybridization. *Genomics* 1991;11:478-9.
26. Chillambhi S, Turan S, Hwang DY, Chen HC, Juppner H, Bastepe M. Deletion of the noncoding GNAS antisense transcript causes pseudohypoparathyroidism type Ib and biparental defects of GNAS methylation in cis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2010;95:3993-4002.
27. Bastepe M, Frohlich LF, Linglart A, Abu-Zahra HS, Tojo K, Ward LM, Juppner H. Deletion of the NESP55 differentially methylated region causes loss of maternal GNAS imprints and pseudohypoparathyroidism type Ib. *Nature genetics* 2005;37:25-7.
28. Linglart A, Fryssira H, Hiort O, Holterhus PM, Perez de Nanclares G, Argente J, Heinrichs C, Kuechler A, Mantovani G, Leheup B, Wicart P, Chassot V, Schmidt D, Rubio-Cabezas O, Richter-Unruh A, Berrade S, Pereda A, Boros E, Munoz-Calvo MT, Castori M, Gunes Y, Bertrand G, Bougneres P, Clauser E, Silve C. PRKAR1A and PDE4D mutations cause acrodysostosis but two distinct syndromes with or without GPCR-signaling hormone resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*

2012;97:E2328-38.

29. Silve C, Clauser E, Linglart A. Acrodysostosis. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme 2012;44:749-58.
30. Linglart A, Menguy C, Couvineau A, Auzan C, Gunes Y, Cancel M, Motte E, Pinto G, Chanson P, Bougneres P, Clauser E, Silve C. Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. The New England journal of medicine 2011;364:2218-26.
31. Bilginturan N, Zileli S, Karacadag S, Pirnar T. Hereditary brachydactyly associated with hypertension. Journal of medical genetics 1973;10:253-9.
32. Bähring S, Rauch A, Toka O, Schroeder C, Hesse C, Siedler H, Fesus G, Haefeli WE, Busjahn A, Aydin A, Neuenfeld Y, Muhl A, Toka HR, Gollasch M, Jordan J, Luft FC. Autosomal-dominant hypertension with type E brachydactyly is caused by rearrangement on the short arm of chromosome 12. Hypertension 2004;43:471-6.
33. Maass PG, Wirth J, Aydin A, Rump A, Stricker S, Tinschert S, Otero M, Tsuchimochi K, Goldring MB, Luft FC, Bähring S. A cis-regulatory site downregulates PTHLH in translocation t(8;12)(q13;p11.2) and leads to Brachydactyly Type E. Human molecular genetics 2010;19:848-60.
34. Bai XH, Wang DW, Kong L, Zhang Y, Luan Y, Kobayashi T, Kronenberg HM, Yu XP, Liu CJ. ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. Molecular and cellular biology 2009;29:4201-19.
35. Klopocki E, Hennig BP, Dathe K, Koll R, de Ravel T, Baten E, Blom E, Gillerot Y, Weigel JF, Kruger G, Hiort O, Seemann P, Mundlos S. Deletion and point mutations of PTHLH cause brachydactyly type E. American journal of human genetics 2010;86:434-9.
36. Collinson M, Leonard SJ, Charlton J, Crolla JA, Silve C, Hall CM, Oglivie C, James MA, Smithson SF. Symmetrical enchondromatosis is associated with duplication of 12p11.23 to 12p11.22 including PTHLH. American journal of medical genetics Part A 2010;152A:3124-8.
37. Jamsheer A, Sowinska-Seidler A, Olech EM, Socha M, Kozlowski K, Pyrkosz A, Trzeciak T, Materna-Kiryluk A, Latos-Bielenska A. Variable expressivity of the phenotype in two families with brachydactyly type E, craniofacial dysmorphism, short stature and delayed bone age caused by novel heterozygous mutations in the PTHLH gene. Journal of human genetics 2016;61:457-61.
38. Flottmann R, Sowinska-Seidler A, Lavie J, Chateil JF, Lacombe D, Mundlos S, Horn D, Spielmann M. Duplication of PTHLH causes osteochondroplasia with a combined brachydactyly type E/A1 phenotype with disturbed bone maturation and rhizomelia. European journal of human genetics : EJHG 2016;24:1132-6.
39. Maass PG, Rump A, Schulz H, Stricker S, Schulze L, Platzer K, Aydin A, Tinschert S, Goldring MB, Luft FC, Bähring S. A misplaced lncRNA causes brachydactyly in humans. The Journal of clinical investigation 2012;122:3990-4002.
40. Fernandez-Rebollo E, Perez O, Martinez-Bouzas C, Cotarelo-Perez MC, Garin I, Ruibal JL, Perez-Nanclares G, Castano L, de Nanclares GP. Two cases of deletion 2q37 associated with segregation of an unbalanced translocation 2;21: choanal atresia leading to misdiagnosis of CHARGE syndrome. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 2009;160:711-7.

41. Villavicencio-Lorini P, Klopocki E, Trimborn M, Koll R, Mundlos S, Horn D. Phenotypic variant of Brachydactyly-mental retardation syndrome in a family with an inherited interstitial 2q37.3 microdeletion including HDAC4. *European journal of human genetics* : EJHG 2013;21:743-8.
42. Williams SR, Aldred MA, Der Kaloustian VM, Halal F, Gowans G, McLeod DR, Zondag S, Toriello HV, Magenis RE, Elsea SH. Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. *American journal of human genetics* 2010;87:219-28.
43. Tammachote R, Kingsuwanpong N, Tongkobpetch S, Srichomthong C, Yeetong P, Kingwatanakul P, Monico CG, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Primary hyperoxaluria type 1 and brachydactyly mental retardation syndrome caused by a novel mutation in AGXT and a terminal deletion of chromosome 2. *American journal of medical genetics Part A* 2012;158A:2124-30.
44. Michot C, Le Goff C, Goldenberg A, Abhyankar A, Klein C, Kinning E, Guerrot AM, Flahaut P, Duncombe A, Baujat G, Lyonnet S, Thalassinos C, Nitschke P, Casanova JL, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *American journal of human genetics* 2012;90:740-5.
45. Lee H, Graham JM, Jr., Rimoin DL, Lachman RS, Krejci P, Tompson SW, Nelson SF, Krakow D, Cohn DH. Exome sequencing identifies PDE4D mutations in acrodysostosis. *American journal of human genetics* 2012;90:746-51.
46. Ludecke HJ, Schaper J, Meinecke P, Momeni P, Gross S, von Holtum D, Hirche H, Abramowicz MJ, Albrecht B, Apacik C, Christen HJ, Claussen U, Devriendt K, Fastnacht E, Forderer A, Friedrich U, Goodship TH, Greiwe M, Hamm H, Hennekam RC, Hinkel GK, Hoeltzenbein M, Kayserili H, Majewski F, Mathieu M, McLeod R, Midro AT, Moog U, Nagai T, Niikawa N, Orstavik KH, Plochl E, Seitz C, Schmidtke J, Tranebjaerg L, Tsukahara M, Wittwer B, Zabel B, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B. Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *American journal of human genetics* 2001;68:81-91.
47. Akierman SV, Skappak CD, Girgis R, Ho J. Turner Syndrome and apparent absent uterus: a case report and review of the literature. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism* : JPEM 2013;26:587-9.
48. Jamsheer A, Sowinska A, Kaczmarek L, Latos-Bielenska A. Isolated brachydactyly type E caused by a HOXD13 nonsense mutation: a case report. *BMC medical genetics* 2012;13:4.
49. Brison N, Tylzanowski P, Debeer P. Limb skeletal malformations - what the HOX is going on? *European journal of medical genetics* 2012;55:1-7.
50. Caronia G, Goodman FR, McKeown CM, Scambler PJ, Zappavigna V. An I47L substitution in the HOXD13 homeodomain causes a novel human limb malformation by producing a selective loss of function. *Development* 2003;130:1701-12.
51. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 3 ed: Georg Thieme Verlag KG; 2009.
52. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;423:332-6.
53. Kronenberg HM. PTHrP and skeletal development. *Annals of the New York*

Academy of Sciences 2006;1068:1-13.

54. Guo J, Chung UI, Yang D, Karsenty G, Bringhurst FR, Kronenberg HM. PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx2-dependent and -independent pathways. *Developmental biology* 2006;292:116-28.
55. Correa D, Hesse E, Seriwatanachai D, Kiviranta R, Saito H, Yamana K, Neff L, Atfi A, Coillard L, Sitara D, Maeda Y, Warming S, Jenkins NA, Copeland NG, Horne WC, Lanske B, Baron R. Zfp521 is a target gene and key effector of parathyroid hormone-related peptide signaling in growth plate chondrocytes. *Developmental cell* 2010;19:533-46.
56. Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, Goltzman D, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *The Journal of cell biology* 1994;126:1611-23.
57. Miao D, He B, Karaplis AC, Goltzman D. Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. *The Journal of clinical investigation* 2002;109:1173-82.
58. Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, Mulligan RC. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes & development* 1994;8:277-89.
59. Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R, Broadus AE. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:10240-5.
60. Bond HM, Mesuraca M, Carbone E, Bonelli P, Agosti V, Amodio N, De Rosa G, Di Nicola M, Gianni AM, Moore MA, Hata A, Grieco M, Morrone G, Venuta S. Early hematopoietic zinc finger protein (EHZF), the human homolog to mouse Evi3, is highly expressed in primitive human hematopoietic cells. *Blood* 2004;103:2062-70.
61. Justice MJ, Morse HC, 3rd, Jenkins NA, Copeland NG. Identification of Evi-3, a novel common site of retroviral integration in mouse AKXD B-cell lymphomas. *Journal of virology* 1994;68:1293-300.
62. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nature reviews Genetics* 2006;7:85-97.
63. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome research* 2006;16:949-61.
64. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006;444:444-54.
65. Kumar D. Disorders of the genome architecture: a review. *Genomic medicine* 2008;2:69-76.
66. Verdin H, D'Haene B, Beysen D, Novikova Y, Menten B, Sante T, Lapunzina P, Nevado J, Carvalho CM, Lupski JR, De Baere E. Microhomology-mediated mechanisms

underlie non-recurrent disease-causing microdeletions of the FOXL2 gene or its regulatory domain. *PLoS genetics* 2013;9:e1003358.

67. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, chromosomes & cancer* 1997;20:399-407.

68. Lapierre JM, Tachdjian G. Detection of chromosomal abnormalities by comparative genomic hybridization. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 2005;17:171-7.

69. McElroy JP, Krupp LB, Johnson BA, McCauley JL, Qi Z, Caillier SJ, Gourraud PA, Yu J, Nathanson L, Belman AL, Hauser SL, Waubant E, Hedges DJ, Oksenberg JR. Copy number variation in pediatric multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 2013;19:1014-21.

70. Spielmann M, Klopocki E. CNVs of noncoding cis-regulatory elements in human disease. *Current opinion in genetics & development* 2013;23:249-56.

71. Consortium EP. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* 2004;306:636-40.

72. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57-74.

73. Spitz F, Furlong EE. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature reviews Genetics* 2012;13:613-26.

74. Klopocki E, Mundlos S. Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annual review of genomics and human genetics* 2011;12:53-72.

75. Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh TY, Cui K, Zhao K. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome research* 2009;19:24-32.

76. Amano T, Sagai T, Tanabe H, Mizushina Y, Nakazawa H, Shiroishi T. Chromosomal dynamics at the Shh locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Developmental cell* 2009;16:47-57.

77. Rosa A, Becker NB, Everaers R. Looping probabilities in model interphase chromosomes. *Biophysical journal* 2010;98:2410-9.

78. Pennacchio LA, Ahituv N, Moses AM, Prabhakar S, Nobrega MA, Shoukry M, Minovitsky S, Dubchak I, Holt A, Lewis KD, Plajzer-Frick I, Akiyama J, De Val S, Afzal V, Black BL, Couronne O, Eisen MB, Visel A, Rubin EM. In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature* 2006;444:499-502.

79. Macgregor GR, Nolan GP, Fiering S, Roederer M, Herzenberg LA. Use of *Escherichia coli* (*E. coli*) lacZ (beta-Galactosidase) as a Reporter Gene. *Methods in molecular biology* 1991;7:217-35.

80. Spielmann M, Mundlos S. Structural variations, the regulatory landscape of the genome and their alteration in human disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2013;35:533-43.

81. Spielmann M, Brancati F, Krawitz PM, Robinson PN, Ibrahim DM, Franke M, Hecht J, Lohan S, Dathe K, Nardone AM, Ferrari P, Landi A, Wittler L, Timmermann B, Chan D, Mennen U, Klopocki E, Mundlos S. Homeotic arm-to-leg transformation associated with genomic rearrangements at the PITX1 locus. *American journal of human genetics* 2012;91:629-35.



82. Kmita M, Duboule D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* 2003;301:331-3.
83. Montavon T, Soshnikova N, Mascrez B, Joye E, Thevenet L, Splinter E, de Laat W, Spitz F, Duboule D. A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell* 2011;147:1132-45.
84. Navratilova P, Becker TS. Genomic regulatory blocks in vertebrates and implications in human disease. *Briefings in functional genomics & proteomics* 2009;8:333-42.
85. Montavon T, Le Garrec JF, Kerszberg M, Duboule D. Modeling Hox gene regulation in digits: reverse collinearity and the molecular origin of thumbness. *Genes & development* 2008;22:346-59.
86. Spitz F, Herkenne C, Morris MA, Duboule D. Inversion-induced disruption of the Hoxd cluster leads to the partition of regulatory landscapes. *Nature genetics* 2005;37:889-93.
87. Andrey G, Montavon T, Mascrez B, Gonzalez F, Noordermeer D, Leleu M, Trono D, Spitz F, Duboule D. A switch between topological domains underlies HoxD genes collinearity in mouse limbs. *Science* 2013;340:1234167.
88. Noordermeer D, Leleu M, Splinter E, Rougemont J, De Laat W, Duboule D. The dynamic architecture of Hox gene clusters. *Science* 2011;334:222-5.
89. Brison N, Debeer P, Tylzanowski P. Joining the fingers: a HOXD13 Story. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2014;243:37-48.
90. Kurban M, Wajid M, Petukhova L, Shimomura Y, Christiano AM. A nonsense mutation in the HOXD13 gene underlies synpolydactyly with incomplete penetrance. *Journal of human genetics* 2011;56:701-6.
91. Goodman FR. Limb malformations and the human HOX genes. *American journal of medical genetics* 2002;112:256-65.
92. Di-Poi N, Zakany J, Duboule D. Distinct roles and regulations for HoxD genes in metanephric kidney development. *PLoS genetics* 2007;3:e232.
93. Lohan S. Analyse von genomischen Aberrationen mit hochauflösender Array CGH bei Patienten mit Fehlbildungen der Extremitäten. 2012.
94. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2012:e3998.
95. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977;74:5463-7.
96. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 2006;27:95-125.
97. Kersey PJ, Allen JE, Christensen M, Davis P, Falin LJ, Grabmueller C, Hughes DS, Humphrey J, Kerhornou A, Khobova J, Langridge N, McDowall MD, Maheswari U, Maslen G, Nuhn M, Ong CK, Paulini M, Pedro H, Toneva I, Tuli MA, Walts B, Williams G, Wilson D, Youens-Clark K, Monaco MK, Stein J, Wei X, Ware D, Bolser DM, Howe KL, Kulesha E, Lawson D, Staines DM. *Ensembl Genomes 2013: scaling up access to genome-wide*

data. *Nucleic acids research* 2014;42:D546-52.

98. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods* 2010;7:575-6.

99. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 2010;7:248-9.

100. Exome Variant Server. NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP). (Accessed 04.2015, at <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.)

101. Exome Aggregation Consortium (ExAC). (Accessed 04.2015, at <http://exac.broadinstitute.org>.)

102. Friedrich DC, de Andrade FM, Fiegenbaum M, de Almeida S, Mattevi VS, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. The lactase persistence genotype is a protective factor for the metabolic syndrome. *Genetics and molecular biology* 2014;37:611-5.

103. Doris PA. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease:common variant hypothesis. *Hypertension* 2002;39:323-31.

104. Stange K, Thieme T, Hertel K, Kuhfahl S, Janecke AR, Piza-Katzer H, Penttinen M, Hietala M, Dathe K, Mundlos S, Schwarz E, Seemann P. Molecular analysis of two novel missense mutations in the GDF5 proregion that reduce protein activity and are associated with brachydactyly type C. *Journal of molecular biology* 2014;426:3221-31.

105. Abriata LA, Palzkill T, Dal Peraro M. How structural and physicochemical determinants shape sequence constraints in a functional enzyme. *PLoS one* 2015;10:e0118684.

106. Solovyev AY, Tarnovskaya SI, Chernova IA, Shataeva LK, Skorik YA. The interaction of amino acids, peptides, and proteins with DNA. *International journal of biological macromolecules* 2015;78:39-45.

107. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome research* 2002;12:996-1006.

108. Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic acids research* 2015;43:D257-60.

109. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:5857-64.

110. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *American journal of human genetics* 2009;84:524-33.

111. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic acids research* 2014;42:D986-92.

112. RadioSurf. Universität Bern, 2014. (Accessed 17.11.2015, at <http://e-learning.studmed.unibe.ch/radiosurf/htmls/slide.html?radiosurf|radskeleton|anatomy|anafoot|4>.)

113. Kraus P, Sivakamasundari V, Xing X, Lufkin T. Generating mouse lines for lineage

tracing and knockout studies. *Methods in molecular biology* 2014;1194:37-62.

## 6. Weitere Verzeichnisse

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Isolierte Brachydaktylie-Typen (BDA)	3
Abb. 1.2	Isolierte Brachydaktylie-Typen (BDB)	4
Abb. 1.3	Isolierte Brachydaktylie-Typen (BDC)	4
Abb. 1.4	Isolierte Brachydaktylie-Typen (BDD)	4
Abb. 1.5	Isolierte Brachydaktylie-Typen (BDE)	5
Abb. 2	Klinik der BDE	5
Abb. 3	Wachstumsplatte (Schema)	8
Abb. 4	Vereinfachter Signalweg von ZNF521	10
Abb. 5	Proximale Tibia-Wachstumsplatte, Safraninfärbung	10
Abb. 6	Schematische Darstellung einer Array CGH	13
Abb. 7	Reporter Gen Analyse	15
Abb. 8	Mutationen in cis-regulatorischen Elementen verändern die Expression ihrer Zielgene	16
Abb. 9	<i>HOXD</i> Lokus (Schema)	17
Abb. 10	Reporter Gen Analyse der regulatorischen Inseln 1-4	18
Abb. 11	Gelelektrophorese der <i>ZNF521</i> Amplifikate	27
Abb. 12	<i>ZNF521</i> Amplifikate	34
Abb. 13	Ausschnitt aus der SeqPilot Sequenzanalyse (erste synonyme Variante)	35
Abb. 14	Ausschnitt aus der SeqPilot Sequenzanalyse (zweite synonyme Variante)	36
Abb. 15	Ausschnitt aus der SeqPilot Sequenzanalyse (dritte synonyme Variante)	37
Abb. 16	Konservierung der mutierten Sequenz bis zum Zebrafisch	39
Abb. 17	SMART Protein Prädiktion	40
Abb. 18	Klinik der Indexpatientin mit nicht-synoymer Punktmutation in <i>ZNF521</i>	41
Abb. 19	Ausschnitt aus der SeqPilot Sequenzanalyse	42
Abb. 20	Auswertung der Array CGH mit Agilent Cyto Genomics	43
Abb. 21	Lokalisierung der Deletion: Beteiligung vier regulatorischer Islands	

	des <i>HOXD</i> Clusters _____	44
Abb. 22	Klinik der Indexpatientin mit Deletion der vier regulatorischen Islands _____	45
Abb. 23	Stammbaum der Indexfamilie mit BDE _____	46
Abb. 24	Phänotyp der betroffenen Schwestern _____	46
Abb. 25	Ergebnis der qPCR: Replikons im regulatorischen Archipel des <i>HOXD</i> Clusters _____	48
Abb. 26	Stammbaum der Indexfamilie mit BDE, BDA und Kleinwuchs _____	49
Abb. 27	Klinik der Indexpatientin mit verminderter Replikon-Menge in Island 4 _____	50
Abb. 28	Klinik des Vaters mit Punktmutation in Island 4 _____	51
Abb. 29	Sequenzanalyse im Bereich der Island 4 _____	51
Abb. 30	Phänotyp der betroffenen Familie und des entsprechenden Mausmodells – Wildtyp im Vergleich _____	54

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Standard PCR Reaktion _____	26
Tab. 2	PCR Aufreinigungsansatz _____	27
Tab. 3	Ansatz für Sequenzier-Reaktion _____	28
Tab. 4	Random-Primer-Labeling-Kit _____	29
Tab. 5	Lösen der Proben (110 µl Ansatz) _____	29
Tab. 6	Reaktionsansatz qPCR _____	31
Tab. 7	Zusammenstellung der synonymen Varianten innerhalb der BDE Kohorte _____	37
Tab. 8	Cyclerprogramm für Touch Down PCR _____	70
Tab. 9	Cyclerprogramm für Phusion® PCR _____	70
Tab. 10	Cyclerprogramm für Sequenzierreaktion _____	70
Tab. 11	Programm qPCR Maschine _____	71
Tab. 12	Primer-Sequenzen für die Sequenzierung von <i>ZNF521</i> _____	71
Tab. 13	Primer-Sequenzen für die qPCR der Kohorte _____	72
Tab. 14	Primer-Sequenzen für die Eingrenzung der Deletion vor dem <i>HOXD</i> Cluster _____	72

## 7. Anhang

### 7.1 Cyclerprogramme

**Tabelle 8 Cyclerprogramm für Touch Down PCR**

PHASE	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	98 °C	10 sec	5
Primer Anlagerung (Annealing)	60 – 55 °C (jeden Zyklus ein Grad °C weniger)	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Denaturierung	98 °C	10 sec	35
Annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Kühlung	12 °C	∞	

**Tabelle 9 Cyclerprogramm für Phusion® PCR**

PHASE	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sec	2
Annealing	61 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	8 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	2
Annealing	59 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	8 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	2
Annealing	57 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	8 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	28
Annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	8 min	
Finale Elongation	68 °C	10 min	1
Kühlung	15 °C	∞	

**Tabelle 10 Cyclerprogramm für Sequenzierreaktion**

PHASE	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
Denaturierung	98 °C	5 sec	25
Annealing	55 °C	5 sec	
Elongation	60 °C	4 min	
Kühlung	12 °C	∞	

**Tabelle 11 Programm qPCR Maschine**

PHASE	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
Initiale Denaturierung	95 °C	8 min	1
Denaturierung	95 °C	15 sec	40
Annealing und Elongation	60 °C	1 min	„
E. d. SchmK.	95 °C	15 sec	1
Erstellen der Schmelzkurve	60 °C	1 min	1
E. d. SchmK.	95 °C	15 sec	1

## 7.2 Primer-Sequenzen

**Tabelle 12 Primer-Sequenzen für die Sequenzierung von ZNF521**

(Transcript ENST000000361524)

PRIMERNAME	SEQUENZ
E2-ZNF521-F	AAGGCTGGGAAAGTTTGGTG
E2-ZNF521-R	CTCCTCCCGTCTTCGTCTC
E3-ZNF521-F	CAATGAAGCCCTCCTATTGC
E3-ZNF521-R	TGAGGTTACCCCAAACAACC
E4a-ZNF521-F	ACTGCTTTGGGCTCAGATTT
E4a-ZNF521-R	CGCAGCATCACATTCACTG
E4b-ZNF521-F	TCGCCACATAAACTCCACA
E4b-ZNF521-R	GTCGTAAGTGGACACGGAGGT
E4c-ZNF521-F	CATGGACAGTCACCAGCAAC
E4c-ZNF521-R	CAGTGAGAAACCCCATATAGCA
E4d-ZNF521-F	GCAAACCCTGCAGCTAAAGA
E4d-ZNF521-R	GGTAACATGCTTCAGCAAGGA
E4e-ZNF521-F	CTCGACACTGTGCTTCCAAA
E4e-ZNF521-R	CTCGGAAGCTCCATTTGTTT
E4f-ZNF521-F	AACACTTGCGAGAAAAACACTG
E4f-ZNF521-R	CACACCACGCAGCGAAAG
E4g-ZNF521-F	ATGCACCCTGACTTGAGGAA
E4g-ZNF521-R	GGACCGTTTCTTGAGGAGGT
E5-ZNF521-F	GCAACATAGGTAAGATCAGCATC
E5-ZNF521-R	CCGAGGAAAAACAATGATGG
E6-ZNF521-F	TGAATAATGTGAAATAACCAGAAACC
E6-ZNF521-R	CCCCCAAATTGAACTGAAGTC
E7-ZNF521-F	CCAACCATGAGCAAATGTGA
E7-ZNF521-R	GCCCAGGGTGAGTGATACTG
E8-ZNF521-F	TGCTTGGTCTGATGAAAATGA
E8-ZNF521-R	GTGCGCAAAGTTCAAACAC

**Tabelle 13 Primer-Sequenzen für die qPCR der Kohorte**

PRIMERNAME	SEQUENZ
2q31.1.1_J_F	GCAAGGTCAGGGATATGAGC
2q31.1.1_J_R	TCCTATGACCCAACCCACTG
2q31.1.1_K_F	ACTCGAGGTGTAATGGGTGG
2q31.1.1_K_R	ACTTAAATTGGATGGCGTCG
2q31.1.1_L_F	CCAAGAGCAAGTCATCTGGC
2q31.1.1_L_R	CAATGTCACCTGCGACCTC
2q31.1.1_M_F	GTGCTGACACAGCCTTATCC
2q31.1.1_M_R	CTCTCTTCAGACACGGCCTC
2q31.1.1_N_F	AGCAATCCATTTGACACACC
2q31.1.1_N_R	ATCAGTTCTCTCACAGGAAGGTAG
2q31.1.1_O_F	GAGTTTCAGGCCACATTGCT
2q31.1.1_O_R	TGCCCTCCCATCTGTATCTT

**Tabelle 14 Primer-Sequenzen für die Eingrenzung der Deletion vor dem *HOXD* Cluster**

PRIMERNAME	SEQUENZ
2q31.1_#3821a_F	TAGCGGCAGCTAGAGAAAGG
2q31.1_#3821a_R	CAATTTGCCACGTGAAGAGA
2q31.1_#3821b_F	GAACTCCTGGCTTCAAGTGC
2q31.1_#3821b_R	TGCTTCCTATACAGCCACA
2q31.1_#3821c_F	AGGCCTCAGAATCATTGCAG
2q31.1_#3821c_R	TACTGAATCATGGGCCTGGT
2q31.1_#3821d_F	CTGGGAAGACTGGTGCCTT
2q31.1_#3821d_R	CCCAGAATTCTCCCCTTCA
2q31.1_#3821e_F	TCTGCAGCCTCCCTGATACT
2q31.1_#3821e_R	GCCAAAGGTCCAACAACAAT
2q31.1_#3821f_F	TGGAGGCTGTGCTGTTAATG
2q31.1_#3821f_R	AGGGCTAATGTGCTTCCAGA
2q31.1_#3821g_F	CCACCGCCTTATGAAGTGTT
2q31.1_#3821g_R	ACTCTGGGAACTGGCATTG
2q31.1_#3821h_F	GGAGCATGGAAACAAGTTGG
2q31.1_#3821h_R	TGTGTGTGGGTTCTCTGCAT
2q31.1_#3821i_F	AGGAATGCAAACCCATTAC
2q31.1_#3821i_R	ATGGAATGTCTTTCCGCTTG
2q31.1_#3821j_F	AGTGGGAGGAGGGAGAAGAG
2q31.1_#3821j_R	TGTGTCACGTGGGTTTCTTG
2q31.1_#3821k_F	TGCCCTTGTATAGCCAAACC
2q31.1_#3821k_R	GGGTTTGTTCAGAGATGCAA
2q31.1_#3821l_F	TGCCTCAACTGTCAAACATG
2q31.1_#3821l_R	GGAACCTTGGAGCATCAGAA
2q31.1_#3821m_F	GCCTCCCAACATGGACTCTA
2q31.1_#3821m_R	GCCCAAGGTGAAACTTGAAA
2q31.1_#3821n_F	CAAGTTTCACCTTGGGCAAT
2q31.1_#3821n_R	TTTCCCAGACAACCTCAACC
2q31.1_#3821o_F	AGGGACCCAAGAGGTGACTT
2q31.1_#3821o_R	CATCCTGGAGGGAACTGAA
2q31.1_#3821p_F	GACCCAGTGGCAGATGAGTT
2q31.1_#3821p_R	AACTCCACCCATTGCTTCAG



## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Laure Bosquillon de Jarcy hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Ricarda Flöttmann, Bjørt K. Kragsteen, Sinje Geuer, Magdalena Socha, Lila Allou, Anna Sowińska-Seidler, **Laure Bosquillon de Jarcy**, Johannes Wagner, Aleksander Jamsheer, Barbara Oehl-Jaschkowitz, Lars Wittler, Deepthi de Silva, Ingo Kurth, Idit Maya, Fernando Santos, Wiebke Hülsemann, Eva Klopocki, Roger Mountford, Guntram Borck, Denise Horn, Lapunzina P, Bénédicte Mascrez, Dennis Duboule, Stefan Mundlos, Malte Spielmann

### **Non-coding copy number variations in congenital limb malformation**

Under review

Beitrag im Einzelnen: Laure Bosquillon de Jarcy hat im Rahmen des Screenings mehrerer Familien mit Brachydaktylie Typ E die unter „Subject 1“ beschriebene Deletion im regulatorischen Archipel des HOXD Clusters gefunden und die entsprechenden Segregationsanalysen durchgeführt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

**Unterschrift der Doktorandin**

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Laure Bosquillon de Jarcy, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neue molekulare Ursachen der Brachydaktylie Typ E: Screening einer Kohorte von 67 nicht verwandten Familien“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 11.10.2016

Unterschrift:

## Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Stefan Mundlos für die Bereitstellung des interessanten Themas, das ich am Institut für Humangenetik der Charité am Campus Virchow bearbeiten durfte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Malte Spielmann für seine stets äußerst engagierte, kompetente und zuverlässige Unterstützung. Gemeinsame Gespräche, neue Denkanstöße sowie sein Beistand in besonders herausfordernden Phasen der Arbeit haben meine Zeit am Institut sehr bereichert und meine Motivation stetig aufrechterhalten.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. Ricarda Flöttmann, die mir in medizinischen Fragestellungen zur Seite stand. Frau Dr. Mojgan Tayebi danke ich sehr für die Einarbeitung in die Methoden und ihren kompetenten Beistand über die gesamte Zeit im Labor.

Ganz herzlich danke ich dem gesamten Laborteam für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die warmherzige und kollegiale Zusammenarbeit. Besonders zu nennen sind Herr Mohsen Karbasyan und Frau Fabienne Pritsch. Ich habe mich jeden Morgen auf die Zusammenarbeit gefreut, vielen Dank dafür!