

Julia Katharina Renate Hahlweg

---

Untersuchungen zur genetischen  
Grundlage der Kraniosynostose  
bei der Perserkatze



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2022

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2022

© 2022 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: redaktion@doktorverlag.de

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere – Neurochirurgie, Neuroradiologie und klinische Neurologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Martin J. Schmidt

**und**

dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Gesine Lühken

# **Untersuchungen zur genetischen Ursache der Kraniosynostose bei der Perserkatze**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Julia Katharina Renate Hahlweg**

Tierärztin aus Marktredwitz

Gießen 2022

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter:

Prof. Dr. med. vet. Martin J. Schmidt

Prof. Dr. med. vet. Gesine Lühken

Prof. Dr. med. vet. Philipp Olias

Tag der Disputation:

15.07.2022

*Meiner Familie*

**I. Inhaltsverzeichnis**

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>III.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>IV.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1	Anatomische Grundlagen.....	3
2.1.1	Anatomie des Schädels mit Besonderheiten bei der Katze .....	3
2.1.2	Überblick über die Suturen des Kraniums der Katze .....	6
2.2	Kranialer Index .....	7
2.3	Embryologische Entwicklung des Schädels .....	8
2.3.1	Entwicklung der Primitivorgane .....	8
2.3.2	Allgemeine Entwicklung des Schädels .....	10
2.3.3	Ursprungsgewebe der Schädelknochen und Suturen .....	12
2.4	Signalwege und ihre Bedeutung in den Suturen .....	13
2.4.1	FGF-Signalweg .....	14
2.4.2	Wnt-Signalweg.....	16
2.4.3	BMP-Signalweg.....	18
2.4.4	TGF- $\beta$ -Signalweg.....	19
2.4.5	Hedgehog-Signalweg .....	21
2.4.6	Notch-Signalweg.....	22
2.4.7	Zusammenspiel der Signalwege in der Sutura.....	25
2.4.8	Lokalisation der Liganden, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren in der Sutura.....	26
2.5	Kraniosynostose .....	29
2.5.1	Kausale Genmutationen für Kraniosynostosen .....	30
2.5.2	Kraniosynostose beim Menschen.....	33
2.5.3	Tiermodelle für Kraniosynostosen.....	34
2.6	Brachycephalie bei Hund und Katze.....	35
2.6.1	Brachycephalie der Perserkatze und damit einhergehende gesundheitliche Probleme .....	39
2.6.2	<i>Hydrocephalus internus</i> .....	41

<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>43</b>
3.1	Probenmaterial .....	43
3.2	Chemikalien, Puffer und Lösungen .....	44
3.3	Kits, Enzyme und Größenstandards.....	45
3.4	Geräte .....	45
3.5	Software und Datenbanken .....	46
3.6	Kranialer Index .....	46
3.7	DNA-Isolation.....	47
	3.7.1 DNA-Isolation mit dem NucleoSpin® Blood Kit.....	47
	3.7.2 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut mittels Aussalzmethode.....	47
3.8	Gesamtenomsequenzierung .....	48
	3.8.1 <i>Library preparation</i> und Sequenzierung mittels Illumina HiSeq3000 .....	48
	3.8.2 Primärdaten .....	49
	3.8.3 <i>Variant calling</i> , funktionelle Annotation und Identifizierung von Kandidaten-Genen .....	49
3.9	Visuelle Auswertung der Genomsequenzen im Bereich von Kandidatengen.....	52
3.10	Sanger-Sequenzierung von Kandidatengen-Bereichen.....	53
	3.10.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	53
	3.10.2 Kontrolle der Amplifikation .....	56
	3.10.3 Reinigung der PCR-Produkte .....	57
	3.10.4 Vorbereitungen der PCR Produkte für die Sanger-Sequenzierung .....	57
	3.10.5 Automatische Sequenzierung mittels Sanger, Genotypisierung der Varianten.....	57
3.11	Computergestützte Datenauswertung .....	58
	3.11.1 Auswertung von Chromatogrammen.....	58
	3.11.2 Konservierungsgrad der Proteine.....	59
	3.11.3 Statistische Auswertung durch das kommerzielle Statistikprogramm SPSS.....	60
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
4.1	Patientendaten im Studienkollektiv .....	61
4.2	Kranialer Index der untersuchten Perserkatzen .....	61
4.3	Auftreten eines <i>Hydrocephalus internus</i> innerhalb der Studiengruppe .....	62
4.4	Stammbaumrekonstruktion des Studienkollektivs.....	63
4.5	Gesamtenom-Analyse und Identifikation potenziell kausaler Varianten .....	64
4.6	Phylogenetischer Konservierungsgrad der Proteine CNTN6 und FOXL2.....	68
4.7	Genotypisierung der Varianten der Gene <i>CNTN6</i> und <i>FOXL2</i> im Studienkollektiv... 69	
	4.7.1 Rekonstruktion von Mutationen im <i>CNTN6</i> - & <i>FOXL2</i> -Gen innerhalb des Stammbaumes des Studienkollektivs.....	72

## Inhaltsverzeichnis

4.7.2	Verteilung der Mutationen bezogen auf den kranialen Index .....	74
4.8	Statistische Auswertung der Ergebnisse .....	79
4.8.1	Korrelation der Variablen untereinander und mit dem kranialen Index .....	79
4.8.2	Wirkung verschiedener Variablen auf den kranialen Index .....	80
4.8.3	Vorkommen der untersuchten Genvarianten in Assoziation mit dem Auftreten eines <i>Hydrocephalus internus</i> .....	87
4.8.4	Analyse der Assoziation zwischen den Variablen und der Entwicklung eines <i>Hydrocephalus internus</i> .....	90
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>93</b>
5.1	Diskussion der Methoden .....	94
5.2	Stammbaum .....	96
5.3	Kandidatengene <i>CNTN6</i> und <i>FOXL2</i> .....	96
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>105</b>
<b>V.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>Anhang</b>	<b>.....</b>	<b>129</b>



## II. Abkürzungsverzeichnis

°C Grad Celsius	HH Hedgehog
A Adenin	HMDC Human Mouse: Disease Connection
AD autosomal dominant	
ANOVA analysis of variance	IGV Integrative Genomics Viewer
AR autosomal rezessiv	IHH <i>indian hedgehog</i>
	IKD intrakranieller Druck
bHLH basic Helix Loop Helix Klasse	INDEL <i>insertion-deletion polymorphisms</i>
BMP <i>bone morphogenetic protein</i>	IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry
bp Basenpaare	
CFA Cat Fanciers' Association	Jag Jagged
CT Computertomographie	
df Anzahl der Freiheitsgrade	LRP <i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
DHH <i>desert hedgehog</i>	
Dipl. ECVN Diplomate of European College of Veterinary Neurology	M Molar, Mittelwert
DLL Delta-like	MAP <i>mitogen-activating protein</i>
DNER Delta/Notch-like-EGF-related-Rezeptor	<i>Mdn</i> Median
dNTP Desoxynukleosid-Triphosphat	MGI Mouse Genome Informatics
DSL Delta/Serrate/Lag2	MIM Mendelian Inheritance in Man
	mm Millimeter
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	MRT Magnetresonanztomographie
EGF <i>epidermal growth factor</i>	MSX2 Msh Homeobox 2
EKH Europäisch Kurzhaar Katzen	
FGF <i>fibroblast-growth-factor</i>	NCBI National Center for Biotechnology Information
FGFR fibroblast growth factor-Rezeptoren	ng Nanogramm
	NGS <i>next generation sequencing</i>
	NRR Negativ-Regulatorische-Region
g Gramm	OMIA Online Mendelian Inheritance in Animals

## Abkürzungsverzeichnis

OMIM Online Mendelian Inheritance in Man	SOX <i>sex determining region of Y gene like box protein</i>
RUNX2 <i>runt-related transcription factor 2</i>	SPRY Sprouty
SD Standardabweichung	T Thymin
SE Standardfehler	TGF- $\beta$ <i>transforming-growth-factor-<math>\beta</math></i>
SHH <i>sonic hedgehog</i>	V Volt
SMOO Smoothened	Wnt Acronym aus "Wingless" und "Int-1"
SNP <i>single nukleotide polymorphism</i>	

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verknöcherungsformen der einzelnen Schädelknochen. ....	11
Tabelle 2: Einteilung der Brachycephalie bei der Katze.....	36
Tabelle 3: Verwendete Primersequenzen für die PCR.....	54
Tabelle 4: PCR-Profil zum Nachweis der Variante FOXL2 c.588G>C. ....	54
Tabelle 5: PCR-Ansatz für die Variante FOXL2 c.588G>C .....	54
Tabelle 6: PCR-Profil zum Nachweis der Varianten CNTN6 c.910 A>C und CNTN6 c.2992 T>C.....	55
Tabelle 7: PCR-Ansatz für die Variante CNTN6 c910 A>C .....	55
Tabelle 8: PCR-Ansatz für die Variante CNTN6 c.2992T >C .....	56
Tabelle 9: Verwendete Primer-Sequenzen für die Sanger-Sequenzierung. ....	58
Tabelle 10: Mittels IGV überprüfte Kandidatengene.....	65
Tabelle 11: Überblick über die Kandidatengene mit entsprechender Mutation und Aminosäure-Austausch. ....	66
Tabelle 12: Überblick über Phänotyp und Genotyp der fünf genomsequenzierten Tiere.....	68
Tabelle 13: Überblick über die genotypisierten Varianten. ....	70
Tabelle 14: Übersicht über die Sanger-Sequenzierungsergebnisse der einzelnen Perserkatzen ....	71
Tabelle 15: Zusammenhänge der Varianten und dem kranialen Index in einer Spearman's rho Korrelationstabelle. ....	79
Tabelle 16: Kriterien zur Unterteilung des Studienkollektivs anhand der Genotypen der Varianten im CNTN6-Gen. ....	81
Tabelle 17: Kriterien zur Unterteilung des Studienkollektivs anhand des Genotyps der Variante c.588G>C im FOXL2-Gen. ....	81
Tabelle 18: Kriterien zur Unterteilung des Studienkollektivs anhand der Kombinationen der Varianten innerhalb des CNTN6- und FOXL2-Gens. ....	82
Tabelle 19: Kontrastwerte der einfaktoriellen ANOVA der Gruppenvergleiche 1–5 aus den Kombinationen der Varianten der Gene CNTN6 und FOXL2.....	86
Tabelle 20: Übersicht über die Genotypen der untersuchten Varianten .....	87
Tabelle 21: Ergebnisse des binär logistischen Regressionsmodells.....	92
Tabelle 22: Die durch eine Literaturrecherche überprüften Gene und ihre jeweiligen Ergebnisse aus der NGS. ....	129
Tabelle 23: Primärdaten der Perserkatzen im Studienkollektiv, aufsteigend nach dem Wert des kranialen Index.....	181

#### IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: unterschiedliche Kopfformen der zwei Zuchtrichtungen der Perserkatze.....	2
Abbildung 2: Katzenschädel, Aufsicht von kranio-lateral .....	5
Abbildung 3: Katzenschädel, Ansicht von ventro-lateral .....	5
Abbildung 4: Katzenschädel, Ansicht von ventral.....	6
Abbildung 5: Überblick über die Suturen des Katzenschädels .....	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung nach Teilung des Mesoderms .....	9
Abbildung 7: Ursprungsgewebe der Knochen am Mäuseschädel.....	12
Abbildung 8: Ursprungsgewebe der Suturen und der umliegenden Schädelknochen .....	14
Abbildung 9: FGF/FGFR-Signalweg.....	15
Abbildung 10: Wnt-Signalweg.....	17
Abbildung 11: BMP-Signalweg.....	19
Abbildung 12: TGF- $\beta$ -Signalweg.....	20
Abbildung 13: Hedgehog-Signalweg.....	21
Abbildung 14: struktureller Aufbau eines DSL-Liganden des kanonischen Notch-Signalweges .....	23
Abbildung 15: Grundaufbau Notch-Rezeptor.....	24
Abbildung 16: Notch-Signalweg.....	24
Abbildung 17: RUNX2 als Schlüsselfaktor in der Entwicklung von Osteoblasten und Chondrozyten.....	26
Abbildung 18: Vorherrschende Liganden und Rezeptoren der patenten Suture .....	28
Abbildung 19: Vorherrschende Liganden und Rezeptoren der sich schließenden Suture.....	28
Abbildung 20: typische Schädelformen bei Kraniosynostosen.....	29
Abbildung 21: Übersicht über die Stadien der koronalen Nahtentwicklung, der jeweiligen mutierten Gene und dem betreffenden Signalweg.....	32
Abbildung 22: Micro-CT Aufnahmen und korrespondierende histologische Schnitte der koronalen Suture.....	37
Abbildung 23: 3D-Rekonstruktionen des Schädels einer EKH, <i>doll-face</i> und <i>peke-face</i> Perserkatze.....	37
Abbildung 24: <i>peke-face</i> Perserkatze mit einem schweren Hornhautulkus des linken Auges .....	40
Abbildung 25: Vergleichende Abbildung des Schädels einer mesozephalen und einer brachycephalen Katze.....	41
Abbildung 26: Duale Herangehensweise zur Identifizierung der Kandidatengene .....	51
Abbildung 27: beispielhafte Darstellung eines heterozygoten SNPs eines Individuums in IGV .....	52
Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung eines Alignments der Sequenzierungsergebnisse von drei Individuen .....	59

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 29: Absolute und relative Häufigkeit der Geschlechtsverteilung in Abhängigkeit vom kranialen Index. ....	61
Abbildung 30: Absolute und relative Häufigkeit der Geschlechtsverteilung in Abhängigkeit zur Diagnose <i>Hydrocephalus internus</i> .....	62
Abbildung 31: Stammbaum von 23 Perserkatzen aus einer gemeinsamen Zucht. ....	63
Abbildung 32: Stammbaum der an einem Hydrozephalus erkrankten Tiere und ihrer gesunden Verwandten.....	64
Abbildung 33: Bildschirmfoto des SNP im <i>CNTN6</i> -Gen des 43281469 Basenpaars (Chromosom A2) dargestellt im Programm IGV .....	67
Abbildung 34: Konservierungsgrad des FOXL2-Proteins um den Aminosäureaustausch Lys196Asn.....	68
Abbildung 35: Konservierungsgrad des CNTN6-Proteins um die vom Aminosäureaustausch Lys304Gln und Phe998Leu betroffenen Positionen.....	69
Abbildung 36: Ausschnitt aus dem Alignment <i>FOXL2</i> c.588G>C.....	70
Abbildung 37: Auftreten der Mutationen im <i>FOXL2</i> - und <i>CNTN6</i> -Gen innerhalb des Stammbaumes.....	73
Abbildung 38: Überblick über die Variante c.910A>C des <i>CNTN6</i> -Gens .....	75
Abbildung 39: Ausschnitt der Genotypisierung der Variante <i>CNTN6</i> Exon 22 c.2992T>C des Probanden K528.....	76
Abbildung 40: Überblick über die Variante c2292T>C des <i>CNTN6</i> -Gens.....	77
Abbildung 41: Überblick über die Variante c.588G>C des <i>FOXL2</i> -Gens .....	78
Abbildung 42: Mittlerer kranialer Index (M) der Studienpopulation in Abhängigkeit zum Genotyp mit Angabe einer linearen Trendlinie .....	83
Abbildung 43: Verteilung der Werte des kranialen Index mit Angabe des Medians innerhalb der Gruppen aufgeteilt nach Genotyp.....	84
Abbildung 44: Verteilung der Mutationen in Abhängigkeit vom Auftreten eines <i>Hydrocephalus internus</i> .....	89
Abbildung 45: Verteilung der kranialen Indices in Abhängigkeit vom Auftreten eines <i>Hydrocephalus internus</i> .....	90
Abbildung 46: Nicht-kanonischer Notch-Signalweg mit DNER und NB3 (CNTN6) als Ligand.....	99



### 1 Einleitung

Die Perserkatze ist eine der ältesten Katzenrassen und befindet sich seit dem Gründungsjahr der *Cat Fanciers' Association* im Jahre 1906 stets unter den beliebtesten Edelkatzenrassen der USA (The Cat Fanciers' Association, Inc 2017; Case *et al.* 2003). Entgegen der Implikation des Namens weist die Perserkatze allerdings keine genetischen Verwandtschaftsbeziehungen zu Katzen aus dem Nahen Osten auf, sondern ähnelt eher den westeuropäischen Tieren. Es handelt sich bei ihr um die vermutlich älteste Katzenrasse, die durch ihre starke Selektion auf den brachycephalen Phänotyp und die dafür benötigten, komplexen Geninteraktionen ihren phylogeographischen Ursprung verloren hat. Es ist also durchaus möglich, dass der Ursprung der Perserkatze trotz allem im alten Persien liegt (Lipinski *et al.* 2008). Katzen werden bereits seit über 100.000 Jahren von Menschen als Haustiere gehalten (Driscoll *et al.* 2007), doch im Gegensatz zu anderen Haustierrassen entwickelten sich die meisten Katzenrassen erst innerhalb der letzten 150 Jahre und das insbesondere in Europa und den USA. Dabei bildete sich die brachycephale Kopfform zum wichtigsten Zuchtziel der Perserkatze heraus (Wastlhuber 1991). So wird in den Rassestandards großer Zuchtverbände der Kopf der modernen Perserkatze, als rund, breit und massiv mit einer deutlichen Prominenz der Augen, beschrieben. Stirn, Nase und Kinn sollen im Profil eine vertikale Linie bilden und der deutliche Übergang der kurzen, breiten Nase zum Stirnbein, welcher als Stopp bezeichnet wird, soll auf Höhe der Augen liegen (The Cat Fanciers' Association, Inc 2017; The Governing Council of the Cat Fancy 2018). Diese moderne Perserkatze, welche sich durch eine stark brachycephale Schädelmorphologie auszeichnet, wird auch als *peke-face* Perserkatze (Abbildung 1: A und B) bezeichnet. Ihr gegenüber steht der Typ der klassischen Perserkatze, welcher auch unter dem Namen *doll-face* Perserkatze bekannt ist (Abbildung 1: C und D) (Case *et al.* 2003). Schmidt *et al.* (2017) führten Mikro-CT Aufnahmen an einer großen Gruppe von *peke-face* und *doll-face* Perserkatzen im Vergleich zu normalen Hauskatzen (EKH) durch. Die Studie konnte zeigen, dass die koronale Suture bei allen *peke-face* Kitten bereits in den ersten Lebenswochen verschlossen ist, während alle anderen Suturen der Calvarien und die Synchrondrosen der Schädelbasis deutlich sichtbar sind. Die sagittale Suture erscheint im Vergleich mit Aufnahmen gleichaltriger mesozephaler Katzen erweitert. Diese Ergebnisse sprechen für das Vorliegen einer koronalen Kraniosynostose bei den *peke-face* Perserkatzen (Schmidt *et al.* 2017; Schmidt *et al.* 2022). Die möglichen genetischen Ursachen dieser koronalen Kraniosynostose sollten in der folgenden Arbeit durch molekulargenetische Methoden untersucht werden. Dadurch sollen potenzielle kausale Varianten in Kandidatengenen für die koronale Kraniosynostose und die damit

## Einleitung

einhergehende Brachyzephalie der Perserkatze im kleineren Kollektiv identifiziert und durch eine anschließende Genotypisierung im größeren Studienkollektiv evaluiert werden.



Abbildung 1: unterschiedliche Kopfformen der zwei Zuchtrichtungen der Perserkatze. Seiten- und Frontalansicht des modernen Typs (*peke-face*) (A und B) und des klassischen Typs (*doll-face*) (C und D) (Schmidt et al. 2017).



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Anatomische Grundlagen

#### 2.1.1 Anatomie des Schädels mit Besonderheiten bei der Katze

Der Schädel stellt die knöcherne Grundlage des Kopfes dar. Er besteht aus mehreren einzelnen Knochen, die mit Ausnahme des Zungenbeines und des Unterkiefers fest über sogenannte *Suturae* (Knochennähte) oder, an der Schädelbasis, über *Synchondrosen* miteinander verbunden sind. Anatomisch lässt sich der Schädel in Neurokranium (Hirnschädel) und Splanchnokranium (Gesichtsschädel) unterteilen. Der Hirnschädel umgibt knöchern das Gehirn mit seinen Hirnhäuten und den versorgenden Gefäßen, während der Gesichtsschädel von Unterkiefer, Nasenkapsel und Zungenbein gebildet wird (Nickel 1977). Bei der Katze zeichnet er sich, im Vergleich zu anderen Säugetieren, durch eine kurze Gesichts- und Gaumenregion aus, während das Neurokranium proportional gesehen in etwa die selbe Größe wie bei den anderen Säugetieren einnimmt (Hudson *et al.* 2010) (Abbildung 2, Abbildung 3).

Im Speziellen setzt sich das Neurokranium aus den drei paarig angelegten Knochen, dem Scheitelbein (*Os parietale*), dem Schläfenbein (*Os temporale*) und dem Stirnbein (*Os frontale*), sowie den vier unpaaren Knochen, dem Siebbein (*Os ethmoidale*), dem Keilbein (*Os sphenoidale*), dem Hinterhauptsbein (*Os occipitale*) und dem Zwischenscheitelbein (*Os interparietale*) zusammen. Hierbei wird die Nackenwand vom *Os occipitale*, seiner Schuppe und seinen beiden Seitenteilen gebildet. Der basale Teil des *Os occipitale* und das *Os sphenoidale*, welches bei Jungtieren noch in zwei Einzelknochen, dem *Os basisphenoidale* (hinteres Keilbein) und *praesphenoidale* (vorderes Keilbein) unterteilt werden kann, formieren gemeinsam die Bodenwand (Abbildung 4). Als Seitenwände fungieren die paarigen *Ossa temporalia* und als Abgrenzung zur Nase bildet die *Lamina cribrosa* des *Os ethmoidale* die Nasenwand. Das Schädeldach setzt sich aus den paarigen *Ossa frontalia* und den *Ossa parietalia* sowie dem *Os interparietale*, welches als Erhebung die *Christa sagittalis externa* trägt, zusammen. Das Zwischenscheitelbein verwächst bei der Katze nicht mit den umliegenden *Os parietale* und *occipitale* sondern bleibt bei ihr dauerhaft durch eine Naht getrennt (König *et al.* 2009; Nickel 1977).

Das Splanchnokranium besteht zu großen Teilen aus der Nasenkapsel. Das Nasendach wird gemeinsam von den paarig angelegten *Ossa nasale* (Nasenbein) und von den rostralen Anteilen der *Ossa frontalia* gebildet. Die jeweilige Seitenwand besteht aus dem jeweils paarig angelegten *Os lacrimale* (Tränenbein), *Os zygomaticum* (Jochbein), *Os incisivum* (Zwischenkieferbein) und der *Maxilla*. Zusätzlich bilden die *Maxillae* und *Ossa incisivae*

## Literaturübersicht

gemeinsam mit dem paarigen *Os palatinum* und dem unpaaren *Vomer* (Pflugscharbein) den Boden der Nasenhöhle und somit die Abgrenzung zur Mundhöhle. Der größte Teil des *Vomers* liegt den *Ossa incisiva* auf und ragt nasenhöhlenwärts. Ebenso befinden sich die *Ossa conchae* innerhalb der Nasenhöhle. Die dorsale und die mediale Endoturbinale sind Bestandteile des *Os ethmoidale*, welches die Nasenhöhle zum Neurokranium hin begrenzt und mit seinen Endoturbinalen I und II rostral ragt. Als eigenständiger Knochen fungiert die knöcherne Grundlage der ventralen Nasenmuschel, das *Os conchae nasalis ventralis* (Nickel 1977). Das median in der Nasenhöhle gelegene *Septum nasi* unterteilt diese in eine rechte und linke Höhle. Zwischen der medialen und der ventralen Nasenmuschel befindet sich bei der Katze jeweils der Eingang in die einheitliche Stirnhöhle (*Sinus frontalis*), über die *Apertura nasomaxillaris* (König *et al.* 2009) besteht der Zugang in eine relativ kleine Kieferhöhlenbucht (*Recessus maxillaris*), welche außen von der *Maxilla* und dem *Os palatinum* und innen von der *Lamina orbitalis* des *Os ethmoidale* begrenzt wird. Zusätzlich ist beidseits eine Keilbeinhöhle (*Sinus sphenoidalis*) ausgebildet, welche über den ventralen Siebbeingang Verbindung zur Nasenhöhle aufnimmt (Nickel 1977). Kaudal schließt sich an die Nasenhöhle die Schlundkopfhöhle an. Seine Dach- und Seitenwand werden von den paarigen *Ossa pterygoidea* (Flügelbein), den *Ossa palatinae*, dem rostralen Anteil der *Ossa sphenoidalia* sowie von Teilen des *Vomers* gebildet (Nickel 1977; König *et al.* 2009). Folglich sind auch drei *Ossa cranii*, das *Os frontale*, *ethmoidale* und *sphenoidale*, am Aufbau des Splanchnokraniums beteiligt (Abbildung 2 und Abbildung 3).

Über bewegliche Verbindungen sind dem Schädel nur das *Os hyoideum* (Zungenbein) und die beiden Unterkieferhälften (*Mandibula*) angeschlossen. Das Zungenbein ist mit seinem aus straffem Bindegewebe aufgebauten Tympanohyoid syndesmotisch mit dem *Processus mastoideus* der *Pars petrosa* des Schläfenbeins verbunden. Die beiden Unterkieferhälften, welche rostral über eine bindegewebige *Articulatio intermandibularis* verwachsen sind, artikulieren über ein synoviales Gelenk, dem *Articulatio temporomandibularis*, ebenfalls mit dem Schläfenbein. Hierbei handelt es sich um ein inkongruentes Walzengelenk, in welches ein faserknorpeliger *Diskus articularis* eingelagert ist (Nickel 1977).

Literaturübersicht

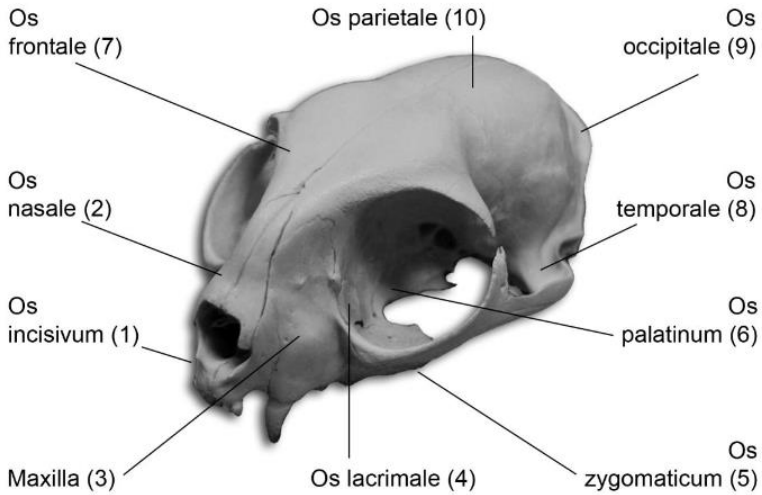


Abbildung 2: Katzenschädel, Aufsicht von kranio-lateral (Wunderlin 2010).

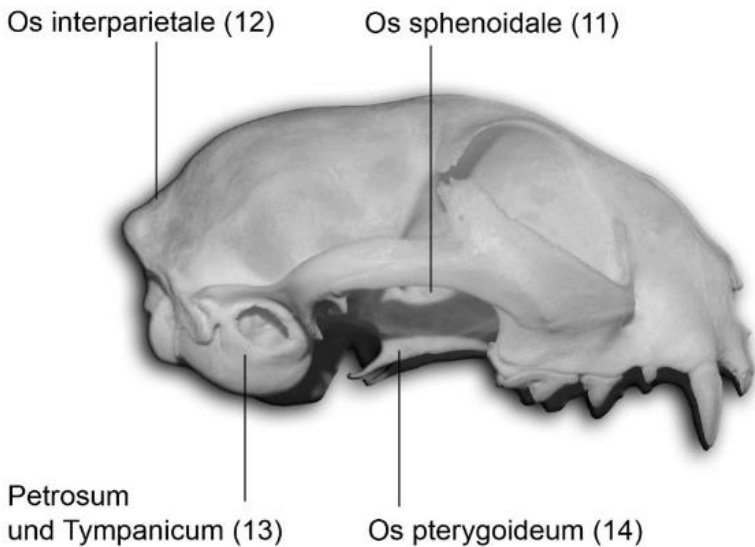


Abbildung 3: Katzenschädel, Ansicht von ventro-lateral (Wunderlin 2010).

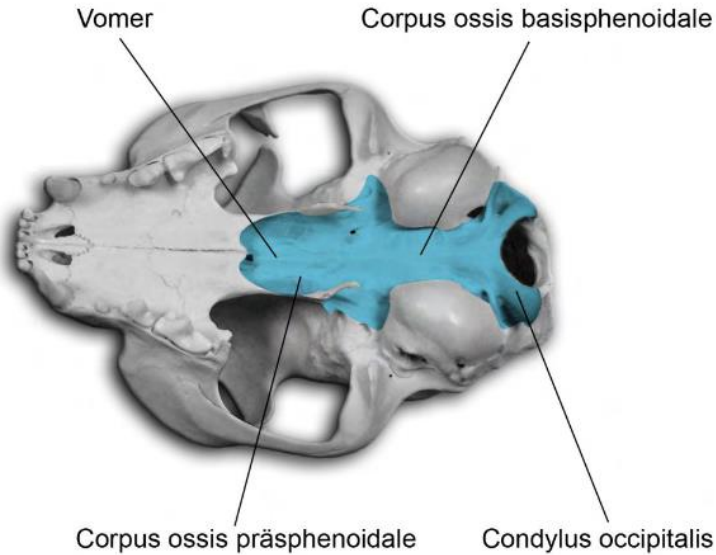
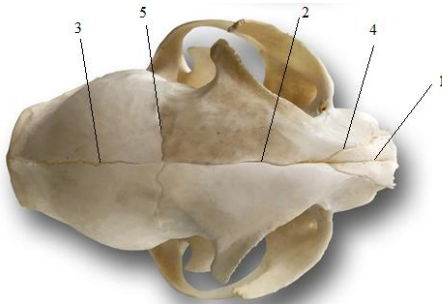


Abbildung 4: Katzenschädel, Ansicht von ventral, die Schädelbasis ist blau markiert (Wunderlin 2010).

### 2.1.2 Überblick über die Suturen des Kraniums der Katze

Mit Ausnahme von Zungenbein und Unterkiefer sind die weiteren Knochen des Schädels weitgehend unbeweglich miteinander verbunden. Erzielt wird dies über die mehr oder weniger vollständige Verknöcherung der in der Jugend noch bindegewebigen oder knorpeligen Nähte. In der Medianen verlaufen von rostral nach kaudal (Abbildung 5), als Verbindung der beiden *Os nasale*, *Os frontale* und *Os parietale*, die *Sutura internasalis* (1), die *Sutura interfrontalis/metopica* (2) und die *Sutura sagittalis* (3) (Popesko 2011). Von kaudal schiebt sich V-förmig das *Os interparietale* in die *Sutura sagittalis* hinein, welches über die *Sutura parietointerparietales* mit dem *Os parietale* verbunden ist. In der *Sutura lambdoidea* überlappen sich *Os parietale* und *Os occipitale*, ventral schließt sich daran mit der *Sutura occipitotympanica* die Verbindung von *Os occipitale* und dem *Pars tympanica* des *Os temporale* an (Coussens *et al.* 2007; Evans *et al.* 2013). Rostral ist das *Os frontale* über die *Sutura frontonasalis* (4)



1. Sutura internasalis
2. Sutura interfrontalis
3. Sutura sagittalis
4. Sutura frontonasalis
5. Sutura coronalis

Abbildung 5: Überblick über die Suturen des Katzenschädels. In der Medianen liegen von rostral nach kaudal die Suturen 1 – 3, quer dazu im rostralen Bereich die *Sutura frontonasalis* (4) und weiter kaudal die *Sutura coronalis* (5) (Lizenz der Abbildung: CC BY-SA 4.0).

mit dem Nasen- und über die *Sutura frontolacrimalis* mit dem Tränenbein verbunden. An den Seiten schiebt sich das *Os parietale* über das *Os frontale* und bildet so die *Sutura coronalis* (5) (Jiang *et al.* 2002). Die *Sutura coronalis* liegt nach Abschluss der ontogenetischen Entwicklung im Bereich der beiden Großhirnhemisphären und ist daher keinem genauen Bereich des darunterliegenden Gehirns zuzuordnen. Anders verhält es sich mit der *Sutura sagittalis*, die oberhalb der medianen Verbindung der beiden Großhirnhälften liegt und der *Sutura lambdoidea*, die das Gewebe zwischen *Hemispherium cerebri* und Kleinhirn überlagert (Jiang *et al.* 2002).

## 2.2 Kranialer Index

Um die Schädel der Katzen vergleichend vermessen zu können, werden einheitliche Messpunkte benötigt. In der Medianen der *Sutura frontonasalis*, also der Verbindung von Nasen- und Stirnbein, liegt das Nasion. Als Inion wird der kaudalste und zentralste Punkt der *Protuberantia occipitalis externa* (Hinterhauptbein) bezeichnet. An der weitesten Stelle der äußeren Schädelkapsel, im Bereich der Scheitelbeine (*Ossa parietalia*), liegt beidseits das Euryon (Stockard 1941). Die Verbindungslinie von Nasion zu Inion ist als kraniale Länge definiert, durch die Messung von Euryon zu Euryon erhält man die kraniale Breite. Der kraniale Index wird durch Schädelbreite x 100 / Schädelhöhe angegeben (Evans *et al.* 2013).

## 2.3 Embryologische Entwicklung des Schädels

### 2.3.1 Entwicklung der Primitivorgane

Zu Beginn der Entwicklung eines dreidimensionalen Embryos bilden sich zuerst zwei Keimblätter aus, das äußere (Ektoderm) und das innere (Entoderm). Insbesondere im dorsokaudalen Bereich des äußeren Keimblatts proliferieren die Zellen und bilden so den Primitivstreifen. Durch die voranschreitende Zellvermehrung, speziell im kranialen Abschnitt des Primitivstreifens, formiert sich hier eine Verdickung, welche als Primitivknoten bezeichnet wird. Aus dieser Verdickung wächst nach schräg vorne der Kopffortsatz, der im Anschluss Verbindung mit dem Entoderm aufnimmt. Direkt vor der Vereinigungsstelle liegt im Entoderm ein Bereich, der Prächordalplatte genannt wird. Die Prächordalplatte bildet die Grundlage für das rostrale Mesenchym und den kranialen Teil der *Chorda dorsalis*. Der kaudale Teil der *Chorda dorsalis* entsteht aus dem Kopffortsatz und ist somit ektodermalen Ursprungs. Die *Chorda dorsalis* stellt bei allen Wirbeltieren das erste primitive Stützskelett dar, wird aber bei den höheren Wirbeltieren in der weiteren ontogenetischen Entwicklung fast vollständig zurückgebildet. Als Überbleibsel finden sich beim erwachsenen Tier nur die *Nuclei pulposi* der Zwischenwirbelscheiben (Rüsse *et al.* 2015; Schnorr *et al.* 2006).

Durch weitere Zellproliferation formiert sich, sekundär zum äußeren und inneren Keimblatt als mittleres Keimblatt, das Mesoderm. Für die Entwicklung des Schädels, sowie des zentralen Nervensystems, spielen insbesondere das Ektoderm und das Mesoderm eine wichtige Rolle. Unterdessen ist das Entoderm an der Bildung der Darmanlage und zahlreichen inneren Organen beteiligt (Schnorr *et al.* 2006). Mithilfe der Entstehung des *Chorda*-Mesoderm-Komplexes wird im äußeren Keimblatt die *Neurulation*, also die Bildung des zentralen Nervensystems, induziert. Durch Wucherung im Ektoderm kommt es zur Ausbildung der Neuralplatte, welche sich in der Mittellinie abflacht und so zur Neuralrinne wird. Die seitlichen Randbereiche der Rinne werden als Neuralfalten bezeichnet. Im weiteren Verlauf verschließt sich die Rinne durch immer stärkeres Anwachsen der Seitenbereiche, sowie ihrem immer tieferen Absinken. Der Schluss der Rinne beginnt im mittleren Bereich der Neuralplatte, der der späteren Halsregion des Embryos entspricht. Die am rostralen und kaudalen Ende entstandenen Öffnungen des Neuralrohrs werden als *Neuroporus anterior* und *posterior* bezeichnet. Durch ihren Verschluss wird die Trennung von Neuralrohr und Epidermisblatt vollendet. Am rostralen Ende des Neuralrohrs entsteht durch Hohlraumbildung und Zellproliferation das Zweiblaskenstadium der Gehirnanlage. Außerdem bilden sich hier nach dem Schluss der *Neuropori* drei paarige ektodermale Verdickungen, die sogenannten Plakoden, heraus. Sie stellen die Grundlage für die spätere Entwicklung von Riechepithel, Linse und Epithel des häutigen Labyrinths und

werden Nasen-, Linsen- beziehungsweise Ohrplakode genannt (Schnorr *et al.* 2006). Im Gebiet zwischen Epidermisblatt und Neuralfurche lösen sich Zellen heraus, welche sich zu den Neuralleisten formieren. Aus diesen multipotenten Zellen entstehen in der weiteren Entwicklung unter anderem die spinalen und vegetativen Ganglien, die Gliazellen des peripheren Nervensystems, die Melanozyten, die Zellen des Nebennierenmarks und ein Großteil der Schädel- und Gesichtsknochen und -knorpel (Schnorr *et al.* 2006; Rüsse *et al.* 2015; Yoshida *et al.* 2008; Senarath-Yapa *et al.* 2013). Das mittlere Keimblatt kann wiederum in seiner weiteren Differenzierung in paraxiales, laterales und intermediäres Mesoderm unterteilt werden (Abbildung 6). Das paraxiale Mesoderm liegt seitlich der Neuralfurche an und wird durch seine Segmentierung zu den Urwirbeln (Somiten). Das rostrale Ende bleibt hierbei unsegmentiert. Die ersten Somiten entstehen circa auf Höhe der Ohrbläschen und werden als okzipitale Urwirbel bezeichnet, die weiteren Segmente reichen kaudal bis zum Schwanzende. Durch weitere Umbauprozesse der Somiten kommt es zur Bildung eines zentralen Kanals, welcher als *Myocoel* bezeichnet wird (Schnorr *et al.* 2006). Die Wände der Urwirbel entwickeln sich nun unterschiedlich weiter. Der ventromediale Abschnitt wird als Sklerotom bezeichnet, der dorsolaterale Bereich als Dermatome und Myotome und bildet somit die Haut-Muskelplatte (Schnorr *et al.* 2006).

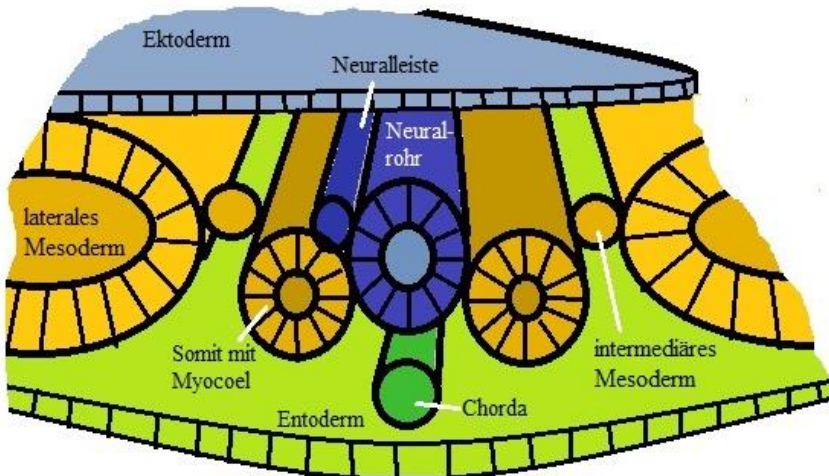


Abbildung 6: Schematische Darstellung nach Teilung des Mesoderms, modifiziert nach Schnorr *et al.* (2006). Gewebe mit ektodermalem Ursprung sind in blauen Farben, Gewebe aus Zellen des Entoderms in grünen Farben dargestellt. Mesodermale Gewebe sind mit braunen Farben markiert.

### 2.3.2 Allgemeine Entwicklung des Schädels

Wie bereits erwähnt, besteht der Schädelknochen an sich aus einer Vielzahl an Einzelknochen. Aus Sicht der ontogenetischen Schädelentwicklung können aber zwei große Bauteile unterschieden werden. Das vielgliedrige primordiale Splanchnokranium (Gesichtsschädel) und das ungegliederte primordiale Neurokranium (Hirnschädel) (Nickel 1977). Das kraniofaziale Mesenchym des Schädels wird aus Zellen der Neuralleiste, sowie dem lateralen und paraxialen Mesoderm gebildet (Jiang *et al.* 2002; Mishina *et al.* 2014). Die mesenchymale Grundlage für die Entstehung des Splanchnokraniums liefert Material aus den Somiten und dem Mesektoderm, beziehungsweise den ersten drei Kiemenbögen, die sich hieraus entwickelt haben. Beim Neurokranium stammt das Mesenchym zur Schädelbildung stattdessen aus dem Kopffortsatz und den okzipitalen Sklerotomen (Rüsse *et al.* 2015).

Ein Chondrokranium entwickelt sich im Bereich des Gesichtsschädels aus dem Mesenchym der Kiemenbögen. So entsteht im Bereich des ersten Kiemenbogens der Mekelsche Knorpel, aus dem später die Anlagen der beiden Gehörknöchelchen Hammer (*Malleus*) und Amboss (*Incus*) hervorgehen. Der Reichertsche Knorpel aus dem Bereich des zweiten Kiemenbogens liefert die Grundlage für das dritte Gehörknöchelchen, dem Steigbügel (*Stapes*), sowie dem *Processus styloideus* und dem *Cornu minus* des Zungenbeins. Aus dem Knorpel des dritten Kiemenbogens entwickelt sich der Körper und das *Cornu majus* des Zungenbeins. Beim Neurokranium tritt eine Verknorpelung im Bereich der späteren Schädelbasis auf. Zu dieser medialen Platte, die sich von der rostralen Begrenzung des *Foramen magnum* bis zur Nasenregion zieht, kommen seitlich knorpelige Vorläufer der Keilbeine und Schläfenbeine, sowie eine Ohr- und eine Nasenkapsel hinzu (Rüsse *et al.* 2015; Schnorr *et al.* 2006). Noch während der vollständigen Anbildung des Chondrokraniums beginnt an anderer Stelle des Schädels bereits die Verknöcherung und somit die Entwicklung des Osteokraniums. Hierbei werden zwei grundlegende Wege der Knochenentstehung unterschieden (Rüsse *et al.* 2015). Zum einen die enchondrale Ossifikation, bei der sich die Mesenchymzellen in Chondroblasten differenzieren und primordiale Knorpel bilden, welcher daraufhin durch Knochen ersetzt wird (Ersatzknochen). Zum anderen die desmale Ossifikation, bei der es ohne vorherigen Knorpel im Mesenchym, in primären Ossifikationszentren, zur Knochenbildung kommt (Mishina *et al.* 2014). Knochen, die durch desmale Ossifikation entstehen, werden als Deck- oder Belegknochen bezeichnet, während die, die durch beide Arten der Ossifikation entstehen und sich später zu einer Einheit zusammenfügen, Mischknochen genannt werden (Schnorr *et al.* 2006) (Tabelle 1). An den Berührungstellen bleibt nach Beendigung der Ontogenese bei den Deckknochen das bindegewebige Nahtband (*Sutur*) und bei den Ersatzknochen der Nahtknorpel



## Literaturübersicht

(*Synchondrose*) übrig. Die großen bindegewebigen Bereiche zwischen mehreren Deckknochen, die als Fontanellen bezeichnet werden, schließen sich beim Tier im Unterschied zum Menschen noch vor der Geburt (Rüsse *et al.* 2015).

**Tabelle 1: Verknöcherungsformen der einzelnen Schädelknochen.**

	<b>Ersatzknochen</b>	<b>Mischknochen</b>	<b>Deckknochen</b>
Splanchnokranium	<i>Os hyoideum</i>	<i>Malleus</i>	<i>Os nasale</i>
	<i>Incus</i>		<i>Os lacrimale</i>
	<i>Stapes</i>		<i>Os zygomaticum</i>
	<i>Ossa conchae</i>		<i>Maxilla</i>
			<i>Os incisivum</i>
			<i>Os palatinum</i>
			<i>Vomer</i>
			<i>Os pterygoideum</i>
			<i>Mandibula</i>
	Neurokranium	<i>Os sphenoidale</i>	<i>Os occipitale</i>
<i>Os ethmoidale</i>		<i>Os temporale</i>	<i>Os parietale</i>
			<i>Os frontale</i>

### 2.3.3 Ursprungsgewebe der Schädelknochen und Suturen

Die Suturen werden, wie auch die Knochen des Schädels, von Zellen des Mesoderms oder der Neuralleiste gebildet. Durch verschiedene Studien an Mäusen konnte von Jiang *et al.* (2002) und Yoshida *et al.* (2008) gezeigt werden, dass neben der Dura mater (Opperman 2000) und den Knochen des Splanchnokraniums auch das *Os frontale*, die *Squama* und *Pars tympanica* des *Os temporale*, sowie das *Orbito-* und *Präsphenoid* von Zellen der Neuralleiste gebildet werden. Das *Os interparietale* trägt vor allem in seinem Zentrum Zellen der Neuralleiste, in seiner Peripherie aber Zellen des Mesoderms und ist somit als einziger Knochen des Schädels gemischten Ursprungs (Jiang *et al.* 2002). Alle übrigen Schädelknochen stammen, wie in Abbildung 7 dargestellt, von Zellen des Mesoderms ab (Noden *et al.* 2005). Ebenso ist die koronale Suture mesodermalen Ursprungs, während die nasale, interfrontale (metopische) und sagittale Suture von Zellen der Neuralleiste stammen (Mishina *et al.* 2014). Neben ihrer Funktion als Wachstumszonen bilden die Suturen auch gelenkige Verbindungen der Schädelknochen, durch die im geringen Maße Bewegung möglich ist (Mishina *et al.* 2014).

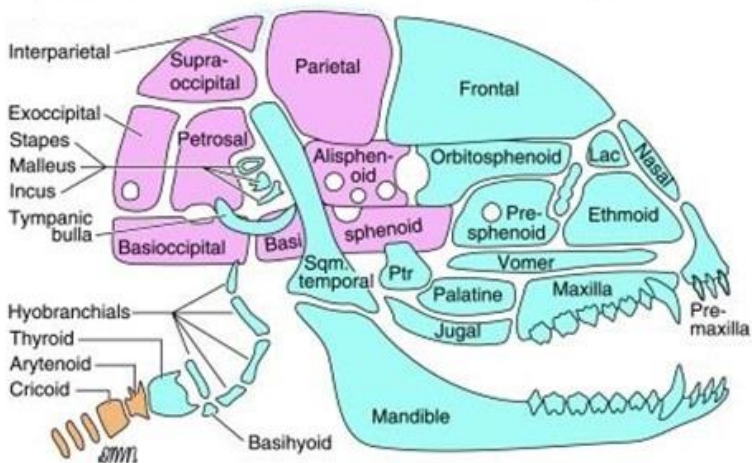


Abbildung 7: Ursprungsgewebe der Knochen am Mäuseschädel. Mesodermale Ursprungsgewebe wird in violett dargestellt. Blau gekennzeichnete Knochen entspringen aus Zellen der Neuralleiste (Noden und Trainor 2005).

## 2.4 Signalwege und ihre Bedeutung in den Suturen

Nach Meinhardt (1983) stellt in der Biologie ein organisatorisches Zentrum einen Ort dar, in dem zwei Gewebe unterschiedlichen Ursprungs aufeinander treffen und durch deren Interaktion es zur Bildung eines Signalsystems kommt. Diese Voraussetzung erfüllen am Schädel, wie bereits oben erwähnt, insbesondere die *Sutura sagittalis* und *coronalis* (Jiang *et al.* 2002). Die koronale Sutura ist mesodermalen Ursprungs und liegt zwischen dem ebenso mesodermalen Parietalknochen und dem Stirnbein, welches von Zellen der Neuralleiste gebildet wird. Die mesodermalen *Ossa parietalia* werden wiederum von der *Sutura sagittalis* verbunden, deren Mesenchym aus der Neuralleiste entspringt (Jiang *et al.* 2002) (Abbildung 7, Abbildung 8).

Beim Menschen sind die koronale und die sagittale Sutura für das Hauptwachstum des Schädels verantwortlich (Wall 1997). Der stärkste Stimulus zum appositionellen Wachstum der Deckknochen wird über die Ausdehnung des neuronalen Gewebes ausgelöst (Baer 1954) und über die Dura mater als extrinsisches Signal an die Schädelknochen geleitet (Cohen 2000). Um eine normale Entwicklung entlang der Suturen zu erreichen, agieren die benachbarten Knochenenden, das undifferenzierte Mesenchym zwischen ihnen, das angrenzende Perikranium, sowie die darunter liegende Dura mater als Komplex (Teven *et al.* 2014). Damit hierbei das Mesenchym der Suturen trotz der Proliferation der Knochen nicht selbst ossifiziert und die Wachstumszonen dadurch verfrüht geschlossen werden, ist ein diffiziles Gleichgewicht von Proliferation und Migration der Osteoblasten sowie deren Apoptose unabdingbar. Dies wird über multiple Signalwege koordiniert (Opperman 2000; Senarath-Yapa *et al.* 2013). Während des Wachstums enthalten die Suturen des Schädeldachs ein zellreiches Gewebe und an den Rändern der Knochenenden finden sich eine große Anzahl an Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten. Erst mit Abnahme der kranialen Entfaltung nimmt auch die Zellzahl innerhalb der Suturen ab, die Knochenränder nähern sich an und die Nähte erreichen ihre reife Form (Opperman *et al.* 2005). Zu den wichtigsten Signalwegen innerhalb der Suturen- und Schädelentwicklung zählen der *fibroblast-growth-factor-* (FGF), der Wnt-, der *bone morphogenetic protein-* (BMP) und *transforming-growth-factor- $\beta$ -* (TGF- $\beta$ ), der Hedgehog- und der Notch-Signalweg, die über komplexe Interaktionen die physiologische Entwicklung der Suturen steuern.

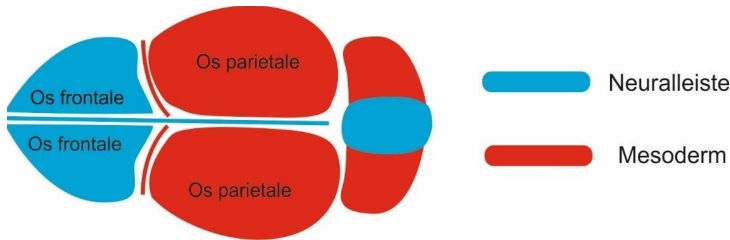


Abbildung 8: Ursprungsgewebe der Suturen und der umliegenden Schädelknochen modifiziert nach Senarath-Yapa *et al.* (2013). Mesodermales Ursprungsgewebe wird in der Farbe Rot dargestellt. Stammen die Ursprungszellen aus der Neuralleiste, ist das Gewebe blau gekennzeichnet.

#### 2.4.1 FGF-Signalweg

Bei den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) handelt es sich um Mitglieder einer Polypeptidfamilie, die eine aus 120–130 Aminosäuren bestehende homologe Kernregion und eine hohe Bindungsaffinität zu den *fibroblast-growth-factor*-Rezeptoren (FGFR) und Heparin-Rezeptoren aufweisen. Bei den Säugetieren sind derzeit 18 verschiedene FGF bekannt, FGF1–10 und FGF16–23, die wiederum in sechs Untergruppen eingeteilt werden können (Beenken *et al.* 2009; Teven *et al.* 2014). Die vier *fibroblast-growth-factor*-Rezeptoren (FGFR1–FGFR4) sind Tyrosinkinase-Transmembranproteine, die aus einer Heparin-bindenden Sequenz, drei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne aufgebaut sind (Karsenty *et al.* 2002). Durch Bindung der Liganden an die FGF-Rezeptoren kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoren und zur Trans-Phosphorylierung der Kinase-Domänen (Spivak-Kroizman *et al.* 1994), wodurch wiederum einer der drei intrazellulären Signaltransduktions-Mechanismen in Gang gesetzt wird (Marie 2012).

Am häufigsten wird durch die Bindung der spezifischen FGF an den FGF-Rezeptor der RAS/MAP-Kinase-Weg induziert. Weitere sind der Phosphoinositid 3 (PI3)-Kinase/AKT-Signalweg und der Phospholipase  $\gamma$ -Weg (Yun *et al.* 2010). Die Signalkaskade des RAS/MAP-Kinase und des PI3/AKT-Weges beginnt mit Bildung eines FRS2-Komplexes, welcher aus FRS2 $\alpha$ , GRB2, GAB1 und SOS und SHP2 besteht (Abbildung 9). Durch die Bildung dieses Komplexes wird die Aktivierung der beiden Wege erleichtert (Dailey *et al.* 2005). Während der Signalweg über die RAS/MAP-Kinase die Zellproliferation und Zelldifferenzierung steuert (Dorey *et al.* 2010), entscheidet der PI3/AKT-Weg über das zelluläre Überleben (Dailey *et al.* 2005). Der dritte Weg über die Phospholipase  $\gamma$  beeinflusst die Morphologie, Migration und Adhäsion der Zellen (Dailey *et al.* 2005).

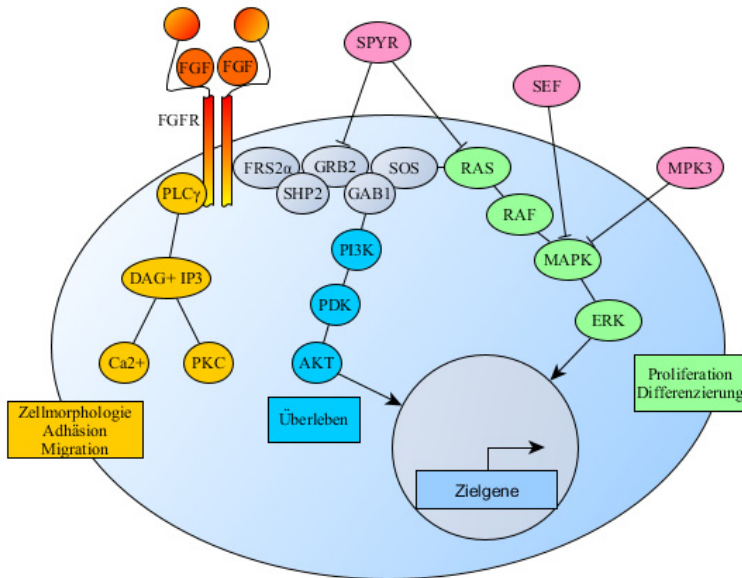


Abbildung 9: FGF/FGFR-Signalweg modifiziert nach Teven *et al.* (2014). Initiiert durch die Bindung der FGFs wird einer der drei intrazellulären Signaltransduktions-Mechanismen (RAS/MAP-Kinase-, Phospholipase  $\gamma$ -, oder der PI3/AKT-Weg) in Gang gesetzt. Die jeweiligen Wege steuern die Morphologie, Migration und Adhäsion, sowie das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der Zellen. Gehemmt wird der FGF/FGFR-Signalweg insbesondere durch MAPK-Phosphatasen (SPRY, MPK3, SEF), welche an verschiedenen Positionen in die Signaltransduktion eingreifen.

Neben den aktivierenden Signalen gibt es auch Proteine, die eine dämpfende Wirkung auf die FGF-FGFR-Wege haben. Dazu zählen vor allem MAPK-Phosphatasen, worunter die Proteine der SPRY-Familie (Hacohen *et al.* 1998) fallen, sowie die MAPK-Phosphatase 3 (MPK3) (Zhao *et al.* 2001) und SEF (Fürthauer *et al.* 2002). Eine weitere Inhibition der Signalkaskaden findet auf Ebene der Rezeptoren statt. Nach einer erfolgten Aktivierung folgt mitunter ihre Internalisierung (Thien *et al.* 2001). Innerhalb der kraniofazialen Schädelentwicklung spielen die komplexen FGF-Signalwege eine tragende Rolle und interagieren dabei mit weiteren Signalwegen (Morriss-Kay *et al.* 2001). Die frühe desmale Ossifikation ist gekennzeichnet durch eine Koexpression von FGFR1–FGFR3 in den Vorläuferzellen der Osteoblasten und den Osteoblasten selbst (Teven *et al.* 2014).

Hohe FGF-Spiegel gehen mit einer osteogenen Differenzierung einher. Während aber an den Knochenenden ein Knochenwachstum und somit eine Differenzierung zu Osteoblasten

erwünscht ist, bedarf es undifferenzierter Mesenchymzellen inmitten der Suture. Dies wird durch unterschiedlich hohe FGF-Level innerhalb der verschiedenen Bereiche der Wachstumszone erreicht. So sind die Spiegel an FGF im Bereich der Knochenenden höher als in der Mitte der Suture. Zum Zeitpunkt des Fugenschlusses zeigen sich vor allem steigende FGF2-Spiegel (Iseki *et al.* 1999; Mehrara *et al.* 1998). FGFR2- und FGFR3-Rezeptoren werden insbesondere von den Osteoprogenitorzellen im Zentrum der Suture exprimiert und erhalten die Proliferation dieser Zellpopulation aufrecht. Im Gegensatz dazu zeigt sich durch eine erhöhte Aktivität des FGFR1-Rezeptors ein verfrühter Fugenschluss (Iseki *et al.* 1999). Zusammenfassend kann man also sagen, dass an einer physiologischen patenten Suture am Rande der Knochenenden durch hohe FGF2-Spiegel differenzierte Osteoblasten mit FGFR1-Rezeptoren dominieren, während im Zentrum mit niedrigem FGF2-Level Osteoprogenitorzellen mit FGFR2- und FGFR3-Rezeptoren überwiegen (Teven *et al.* 2014).

### 2.4.2 Wnt-Signalweg

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der zellulären Differenzierung, Skelettentwicklung und Knochenbildung. Bereits kleine Störungen in der Dauer, der Intensität und dem Kontext der Signalübertragung haben auf die Knochenbiologie einen großen Einfluss (Clevers *et al.* 2012; Reinhold *et al.* 2007). Die meisten Säugetiergenome, so auch das menschliche, enthalten 19 Gene für Wnt-Proteine (Clevers *et al.* 2012). Als Rezeptor dieser Proteine fungiert ein Transmembranrezeptor, der als Frizzled bezeichnet wird, sowie die Co-Rezeptoren LRP-5, LRP-6 und nach neusten Erkenntnissen auch LRP-4 (Leupin *et al.* 2011; Monroe *et al.* 2012). Durch Bindung der Wnt-Liganden an den Rezeptor wird über die Aktivierung des intrazellulären Proteins Dishevelled der Abbau von  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma inhibiert (Lee *et al.* 1999). Dadurch kommt es zum Anstieg der  $\beta$ -Catenin Konzentration im Cytoplasma und zur Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, wo es zusammen mit TCF/LEF als Transkriptionsfaktor wirkt und mehrere Gene aktiviert (Jho *et al.* 2002). Unter den Zielen des Wnt-Signalweges befindet sich auch ein Transkriptionsfaktor der basic-Helix-Loop-Helix-Klasse (bHLH) namens TWIST1 (Howe *et al.* 2003), sowie das *FGF18*-Gen (Reinhold *et al.* 2007). TWIST1 hemmt die Chondrogenese und verhindert damit einen Schluss der Suture (Behr *et al.* 2010). Reinhold *et al.* (2007) vermuten unterdessen, dass FGF18 das Schlüsselprotein in der Umsetzung der Wnt-Signale für die Differenzierung der Osteoblasten ist. Neben dem Wnt-Signalweg hängt die Expression von FGF18 allerdings auch von dem Transkriptionsfaktor RUNX2 ab, welcher unter anderem auch ein Ziel des FGF/FGFR-Signalweges ist (Reinhold *et al.* 2007). Dadurch entsteht eine enge Vernetzung der beiden

Signalwege FGF/FGFR und Wnt. Dies wird auch von Fei *et al.* (2011) unterstützt. Sie demonstrierten, dass FGF2 die Differenzierung der Osteoblasten teilweise über die Aktivierung des Wnt-Signalweges induziert.

Axin2 agiert als negativer Regulator des Wnt-Signalweges, indem es den Spiegel von  $\beta$ -Catenin senkt (Abbildung 10). Während des Knochenwachstums wird Axin2 in den Knochenenden und dem Periost der Suturen exprimiert. Studien an Mäusen zeigten, dass es bei einer gezielten Inaktivierung der Axin2-Signale zu einem verfrühten Schluss der metopischen/interfrontalen Suture kommt (Yu *et al.* 2005).

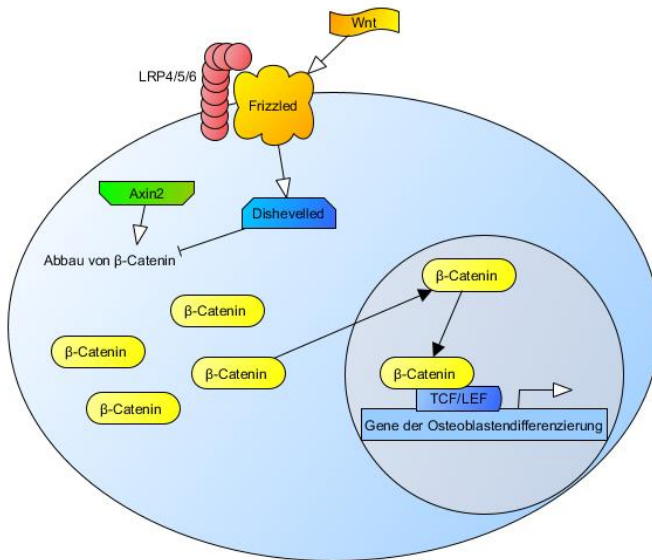


Abbildung 10: Wnt-Signalweg modifiziert nach Katsianou *et al.* (2016). Durch Bindung der Wnt-Liganden an den Rezeptor Frizzled und seinen Co-Rezeptoren kommt es zur intrazellulären Aktivierung des Proteins Dishevelled, wodurch der Abbau von  $\beta$ -Catenin gehemmt wird. Im Zellkern kommt es  $\beta$ -Catenin-abhängig zur Aktivierung der Zielgene. Axin2 führt zu einem Abbau von  $\beta$ -Catenin und dadurch zu einer Hemmung des Wnt-Signalweges.

### 2.4.3 BMP-Signalweg

*Bone morphogenetic proteins* (BMPs) induzieren durch die Stimulation der Osteo- und Chondroblasten Differenzierung des Knochens und Knorpelwachstum (Nishimura *et al.* 2008). Sie sind Mitglieder der *transforming-growth-factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie (Celeste *et al.* 1990) und binden an membrangebundene Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, die dann phosphorylieren und intrazelluläre zytoplasmatische SMAD-Proteine aktivieren. Diese wiederum translozieren in den Zellkern und agieren dort als Transkriptionsfaktoren (Nishimura *et al.* 2012). Der BMP/SMAD-Signalweg steuert die Expression und/oder Funktion vieler Transkriptionsfaktoren, die für die Chondro- und Osteogenese essentiell sind, darunter Osterix, SOX9, RUNX2, MSX2 und DLX5/6 (Nishimura *et al.* 2008; Nishimura *et al.* 2012). Der BMP-Signalweg wird auf mehreren Ebenen streng reguliert. Extrazelluläre Proteine wie Noggin und Chordin fungieren als BMP-Antagonisten. Sie binden die Liganden der BMP-Rezeptoren, sodass eine Interaktion mit den Rezeptoren nicht mehr stattfinden kann (Abbildung 11) (Warren *et al.* 2003). Warren *et al.* (2003) untersuchte in Studien an Mäusen die Expression von Noggin in patenten und verschlossenen Suturen. Während in der aktiven koronalen und sagittalen Suture hohe Noggin-Spiegel nachgewiesen werden konnten, war die Noggin-Expression in der verschlossenen metopischen Suture kaum nachweisbar.

Auch der BMP-Signalweg ist eng mit anderen Signalwegen verknüpft. FGF2 und FGF18 unterdrücken die Noggin-Expression und verstärken dadurch die BMP-Wirkung (Warren *et al.* 2003; Reinhold *et al.* 2004). Die Interaktion mit dem Wnt-Signalweg erscheint sehr komplex. Gemeinsame molekulare Drehpunkte stellen der Transkriptionsfaktor RUNX2,  $\beta$ -Catenin, sowie die zwei inhibitorischen Proteine des Wnt-Signalweges, DKK1 und GSK3 $\beta$ , dar (Lin *et al.* 2011).



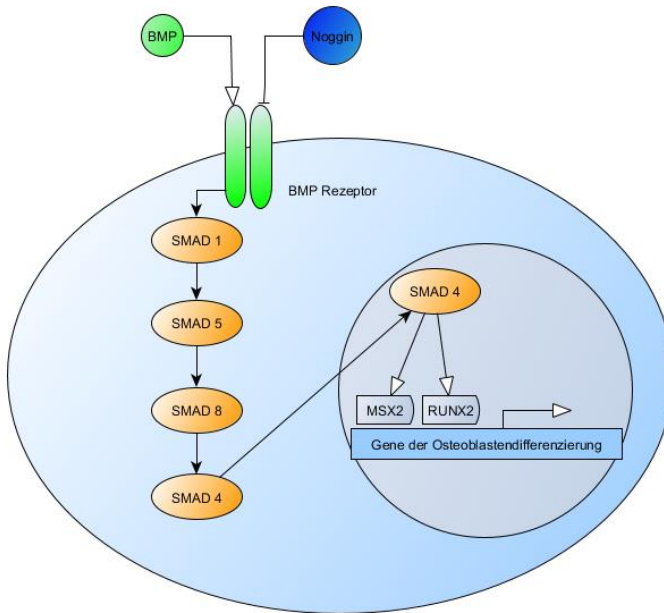


Abbildung 11: BMP-Signalweg, modifiziert nach Lin *et al.* (2011). Die Aktivierung des Signalweges erfolgt durch die BMP-Liganden, wodurch intrazellulär SMAD-Proteine aktiviert werden, welche wiederum als Transkriptionsfaktoren agieren. Die Inhibierung des BMP-Signalweges wird unter anderem durch den BMP-Antagonisten Noggin geregelt.

#### 2.4.4 TGF- $\beta$ -Signalweg

Wie auch BMPs sind TGF- $\beta$ s Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie und teilen als solche Gemeinsamkeiten in der Signaltransduktion. Während bei dem BMP-Weg allerdings die Rezeptor-assoziierten SMAD-Proteine 1, 5 und 8 aktiviert werden, sind es bei dem TGF- $\beta$ -Signalweg die Rezeptor-assoziierten SMAD 2- und SMAD 3-Proteine. Diese wiederum aktivieren SMAD 4, welches in den Kern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor fungiert (Derynck *et al.* 2007; Senarath-Yapa *et al.* 2013) (Abbildung 12). SMAD 3 wiederum wirkt inhibierend auf den Osteoblasten-Transkriptionsfaktor RUNX2, wodurch die Differenzierung zu Osteoblasten unterdrückt wird (Alliston *et al.* 2001). Neben der Differenzierung zu Osteoblasten inhibiert TGF- $\beta$  auch die Entwicklung der mesenchymalen Stammzellen zu Myoblasten und Adipozyten und fördert die Proliferation der Stammzellen (Dijke *et al.* 2006). Er stellt somit in diesem Bereich den Gegenspieler zum BMP-Weg dar, welcher die Differenzierung entlang der

Mesenchym-Linien zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten fördert (Derynck *et al.* 2007).

Die Expression von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 in den Suturen wurde von Opperman *et al.* (1997) beschrieben. Die Ergebnisse zeigten, dass hohe TGF- $\beta$ 1- und TGF- $\beta$ 2-Spiegel mit der Obliteration der frontonasalen Sutur assoziiert sind, während hohe TGF- $\beta$ 3- und niedrige TGF- $\beta$ 1- und TGF- $\beta$ 2-Spiegel in der unverschlossenen *Sutura coronalis* nachweisbar waren (Opperman *et al.* 1997).

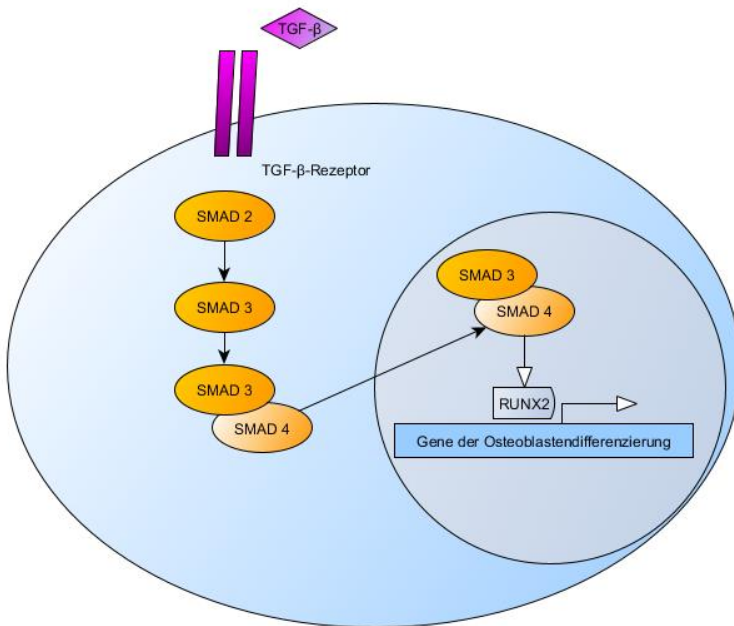


Abbildung 12: TGF- $\beta$ -Signalweg modifiziert nach Lin *et al.* (2011). Die Aktivierung des Signalweges erfolgt durch die TGF- $\beta$  Liganden, wodurch intrazelluläre SMAD-Proteine aktiviert werden. Diese wirken wiederum als Transkriptionsfaktoren im Zellkern.

### 2.4.5 Hedgehog-Signalweg

Bei den Wirbeltieren gibt es nach heutigem Kenntnisstand drei Liganden, die den Hedgehog (HH)-Signalweg induzieren, das *sonic* (SHH), *desert* (DHH) und *indian hedgehog* (IHH)-Protein (Riddle *et al.* 1993). Bei dem Rezeptor namens Patched handelt es sich um einen Transkriptionsinhibitor. Er übt eine inhibierende Wirkung auf das Transkriptionsprotein Smoothed (SMO) aus. Durch Bindung eines HH-Proteins an den Rezeptor wird seine inhibierende Wirkung auf SMO aufgehoben und der Signalweg gestartet. Es kommt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3, die in den Zellkern translozieren und dort als Schlüsselregulatoren der Zielgene agieren (Ruiz i Altaba *et al.* 2007) (Abbildung 13).

DHH wird vornehmlich in den männlichen Geschlechtsorganen exprimiert (Yao *et al.* 2002), während SHH eine Schlüsselrolle bei der Schädelentwicklung (Chiang *et al.* 1996) und IHH bei der Chondrogenese spielt (Vortkamp *et al.* 1996).

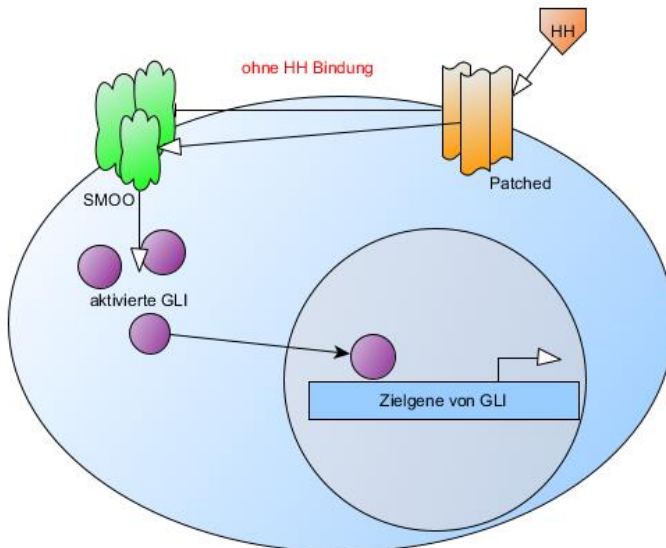


Abbildung 13: Hedgehog-Signalweg modifiziert nach Pan *et al.* (2013). Aktivierung des Signalweges durch Bindung eines HH-Proteins an den Rezeptor Patched, wodurch dessen inhibierende Wirkung auf das Transkriptionsprotein SMOO aufgehoben wird. Es kommt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren GLI.

Im Vergleich zu den FGF, TGF- $\beta$  und BMP-Signalwegen ist die Bedeutung des Hedgehog-Signalwegs bei der Entwicklung der Suturen erst seit relativ kurzer Zeit Grundlage von Forschungen. Trotzdem konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl IHH als auch SHH in der physiologischen Entwicklung der Suturen relevant sind (Pan *et al.* 2013). Studien an Mäusen zeigten, dass IHH während der Proliferation der Osteoblasten an den Knochenenden exprimiert wird. Die Expression führt vermutlich zum vermehrten Expressieren von BMP2, BMP4 und dem Rezeptor Patched. Dies hat wiederum die desmale Ossifikation an den Knochenenden und später die Obliteration der Sutur zur Folge (Jacob *et al.* 2007; Lenton *et al.* 2011). SHH dagegen wird eher im mittleren Bereich der Suturen exprimiert und steuert dort, gemeinsam mit BMP4 über die Aktivierung von MSX2 die Proliferation der Mesenchymzellen im suturalen Spalt (Alappat *et al.* 2003).

### 2.4.6 Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist evolutionär stark konserviert und ubiquitär an embryonalen und postnatalen Differenzierungswegen von Zellen beteiligt (Artavanis-Tsakonas 1999). Zur Induktion des klassischen kanonischen Notch-Signalweges bindet einer der fünf Delta/Serrate/Lag2(DSL)-Liganden an einen der vier Notch-Rezeptoren (Notch 1–Notch 4). Die fünf Liganden, Jagged (Jag) 1 und Jag 2, sowie *delta-like* (DLL) 1, DLL 2 und DLL 3 sind selbst Transmembranproteine, die eine Kommunikation zwischen benachbarten Zellen vermitteln (Lindsell *et al.* 1996). Sie zählen zu den Typ-1-Transmembranproteinen und weisen in ihren extrazellulären Domänen einen gemeinsamen Aufbau auf (Abbildung 14). Nach der N-terminalen (NT)-Domäne folgt die DSL-Domäne, die eine degenerierte *epidermal growth factor* (EGF)-ähnliche-Wiederholung darstellt. An die DSL-Domäne schließt sich eine Reihe von EGF-ähnlichen, teilweise Calcium bindende, Tandem-Wiederholungen an, worauf der transmembrane und der intrazelluläre Bereich des Proteins folgen. Die DSL-Domäne ist für eine Bindung mit Notch unabdingbar, reicht allein allerdings nicht aus (Shimizu *et al.* 1999; D'Souza *et al.* 2010). Mutationen innerhalb der konservierten Reste dieser Domäne sind sowohl bei Vertebraten als auch bei Intervertebraten mit einem Funktionsverlust der Notch-Signale verbunden (Henderson *et al.* 1997; Warthen *et al.* 2006).

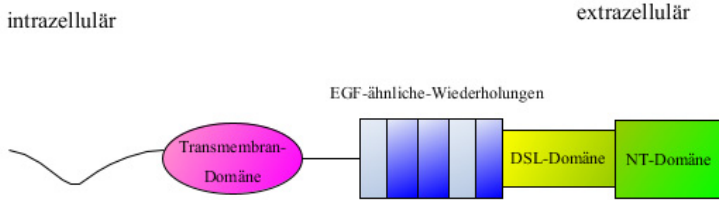


Abbildung 14: struktureller Aufbau eines DSL-Liganden des kanonischen Notch-Signalweges modifiziert nach D'Souza *et al.* (2010). Der DSL-Ligand stellt selbst ein Transmembranprotein dar mit einer extrazellulär gelegenen NT- und DSL-Domäne gefolgt von EGF-ähnlichen-Wiederholungen. Daran schließt sich die Transmembran-Domäne und der intrazelluläre Teil des Proteins an.

Die Notch-Rezeptoren, die wiederum selbst Transmembranproteine sind, weisen ebenso einen konservierten Aufbau auf (Abbildung 15). Extrazellulär zeichnen sie sich durch multiple EGF-ähnliche-Tandem-Wiederholungen aus, auf die eine Negativ-Regulatorische-Region (NRR) folgt. Während in der EGF-Region die Interaktion mit den jeweiligen Liganden stattfindet, verhindert die NRR eine Liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors (Cordle *et al.* 2008; Sanchez-Irizarry *et al.* 2004). Die folgende Transmembrandomäne enthält Spaltstellen, welche vom  $\gamma$ -Sekretase-Komplex erkannt werden und an denen die intrazelluläre Domäne (NICD) des Notch-Rezeptors abgespalten werden kann (Kopan *et al.* 2009). Nach der Bindung eines DSL-Liganden kommt es zur Abspaltung der NICD, die dann selbst als Transkriptionsfaktor in den Zellkern transloziert und dort unter der Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor der CSL-Familie zur Aktivierung der Notch-Zielgene *Hey* und *Hes* führt (Honjo 1996) (Abbildung 16).

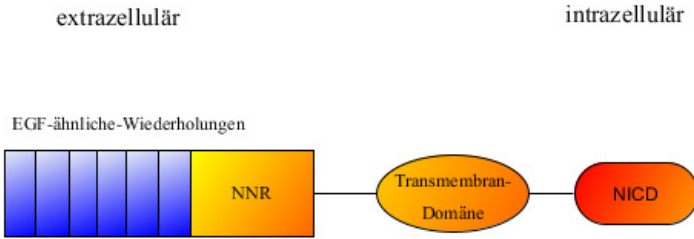


Abbildung 15: Grundaufbau Notch-Rezeptor modifiziert nach Zanotti *et al.* (2016). Das Transmembranprotein ist aus extrazellulär gelegenen EGF-ähnlichen Wiederholungen und einer NNR, gefolgt von der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne NICD, aufgebaut.

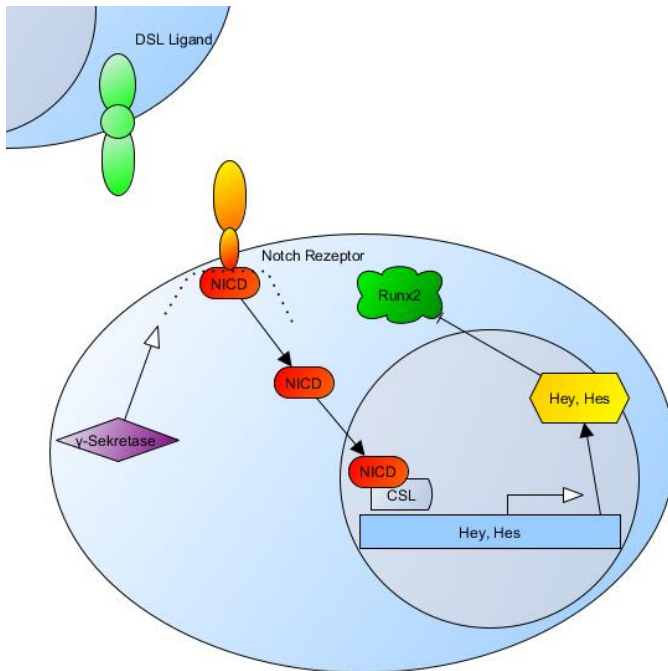


Abbildung 16: Notch-Signalweg modifiziert nach Lin *et al.* (2011). Aktivierung des Signalweges durch Bindung eines DSL-Liganden, wodurch es zu einer  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Abspaltung der NICD kommt. NICD wirkt als Transkriptionsfaktor im Zellkern und führt unter anderem zur Aktivierung der Notch Zielgene *Hey* und *Hes*, in dessen Folge es zur Inhibierung des Transkriptionsfaktors RUNX2 kommt.

Der Notch-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und dem Schluss der Suturen (Liu *et al.* 2017). Auf molekularer und zellulärer Ebene hemmt Notch über die Unterdrückung des Transkriptionsfaktors RUNX2 die Differenzierung der Osteoblasten (Hilton *et al.* 2008). Des Weiteren konnten Yen *et al.* (2010) an Studien von Ratten zeigen, dass die Expression von Jag1 in der koronalen Suture vom Transkriptionsfaktor TWIST beeinflusst wird. Ferner konnte ebenfalls an Ratten gezeigt werden, dass der Schluss der frontalen Suture streng durch eine Abnahme der Notch-Signale reguliert wird. Stattdessen konnte in der patenten sagittalen Suture ein dauerhaft hoher Wert an Notch-Signalen nachgewiesen werden, welcher vermutlich über die Hemmung der Osteoblastendifferenzierung an den Knochenenden einen Verschluss der Suture verhindert (Liu *et al.* 2017).

### **2.4.7 Zusammenspiel der Signalwege in der Suture**

Die oben genannten Signalwege spielen in der Entwicklung und dem Wachstum des Schädels entscheidende Rollen. Auch die Dura mater trägt, vor allem in der pränatalen Phase, entscheidend dazu bei, dass die Suturen keinem verfrühten Schluss unterliegen. Postnatal kommen dieser Aufgabe aber überwiegend die verschiedenen Signalsysteme nach und der Einfluss der harten Hirnhaut sinkt (Kim *et al.* 1998).

Beim Zusammenspiel der einzelnen Signalwege kommt dem Transkriptionsfaktor RUNX2 eine Schlüsselrolle zu. So nehmen der Wnt-, BMP- und Notch-Weg über die Regulation der Aktivität von RUNX2 Einfluss auf die Entwicklung der Osteoblasten. Ferner zeigen mehrere Studien, dass auch der Hedgehog-Signalweg größter Wahrscheinlichkeit nach über RUNX2 in die Osteoblastogenese eingreift (St-Jacques *et al.* 1999; Mak *et al.* 2006). Ebenso scheint es sich bei den FGFs zu verhalten, die über eine Modulation von RUNX2 einzugreifen scheinen. So stieg in einer Studie an *FGF2*-Knockout-Mäusen die mRNA-Konzentration von RUNX2 nach der Verabreichung von FGF2 in den aus dem Knochenmark stammenden Zellkulturen an (Naganawa *et al.* 2006). Der Transkriptionsfaktor TWIST1 wiederum verhindert über Wechselwirkungen mit RUNX2 seine Bindung an die DNA (Bialek *et al.* 2004). RUNX2 selbst setzt dann an verschiedenen Positionen in der Entwicklung von Chondrozyten und Osteoblasten an (Abbildung 17). Über die Stimulation von FGF18 (Hinoi *et al.* 2006), welcher wiederum ein Ligand von FGFR3 ist, inhibiert RUNX2 indirekt die Chondrozyten Entwicklung (Liu *et al.* 2002). Stattdessen übt RUNX2 direkt einen aktivierenden Einfluss auf das Hypertrophieren der Chondrozyten aus (Yan *et al.* 2018).

## Literaturübersicht

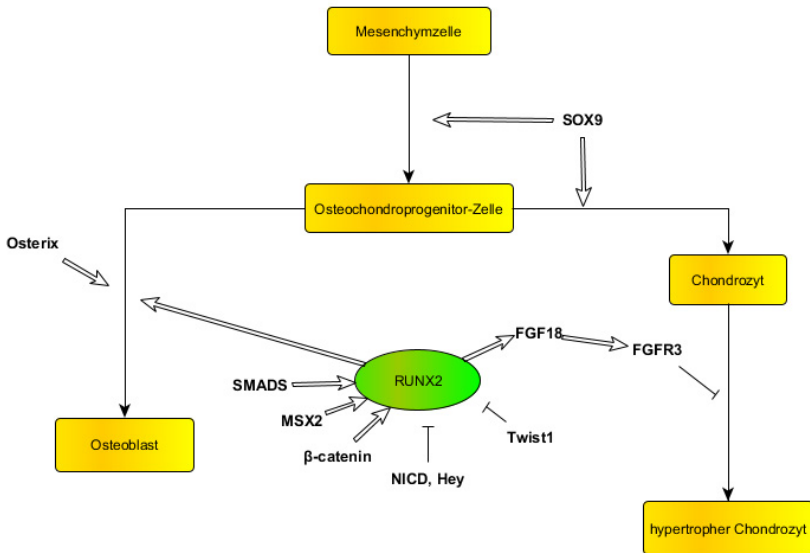


Abbildung 17: RUNX2 als Schlüsselfaktor in der Entwicklung von Osteoblasten und Chondrozyten, modifiziert nach Karsenty (2008) & Lin *et al.* (2011). Ausgehend von der Mesenchymzelle entwickeln sich stimuliert von SOX9 die Osteochondroprogenitor-Zelle. Diese differenziert sich dann je nach Einfluss der Signalsysteme entweder zum Osteoblasten oder Chondrozyt weiter. Dabei stellt RUNX2 einen Schlüsselfaktor dar, welcher von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. RUNX2 hat einen aktivierenden Einfluss auf die Entwicklung der Osteoblasten und übt über die Stimulation von FGF18, welcher ein Ligand des FGFR3-Rezeptors ist, indirekt eine inhibierende Wirkung auf die Entwicklung zu Chondrozyten aus.

### 2.4.8 Lokalisation der Liganden, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren in der Suture

Um das Zusammenspiel der Signalwege innerhalb der Suture zu verstehen, ist es essenziell, die Lokalisation der einzelnen Liganden, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Suture zu betrachten (Abbildung 18 und Abbildung 19). Während im Mesenchym der funktionell aktiven Suture hohe Spiegel an TWIST1, Noggin und TGF- $\beta$ 3 (Opperman *et al.* 2005), sowie die Expression von MSX1 (Kim *et al.* 1998) und SHH (Alappat *et al.* 2003) nachgewiesen werden können, exprimieren die Osteoblasten der Knochenfronten die Rezeptoren FGFR1, FGFR2 und FGFR3 (Rice *et al.* 2000) und weisen den Transkriptionsfaktor MSX2 auf (Liu *et al.* 1999). Des Weiteren können hohe Spiegel von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 (Opperman *et al.* 1997), dem Hedgehog Liganden IHH (Jacob *et al.* 2007) und von BMP4 nachgewiesen werden (Kim *et al.* 1998).



Zum Zeitpunkt der Fusion der Suturen fallen im Mesenchym die Spiegel an TWIST1, Noggin und TGF- $\beta$ 3 stark ab (Opperman *et al.* 2005). Stattdessen steigt die Expression der Liganden TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und BMP4 an (Opperman *et al.* 1997; Opperman *et al.* 2005). Auch die Expression der Rezeptoren FGFR1 und FGFR2, sowie des Liganden FGF2 (Rice *et al.* 2000) und des Transkriptionsfaktors MSX2 steigt zum Zeitpunkt des Fugenschlusses stark an (Liu *et al.* 1999). Die Knochenenden weisen während der Fusion ebenso hohe Spiegel der Liganden TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und FGF2 auf (Opperman *et al.* 1997; Rice *et al.* 2000). In der Dura mater können Spiegel von FGF2 und die Rezeptoren FGFR1 und FGFR3 aufgezeigt werden (Rice *et al.* 2000; Iseki *et al.* 1999; Most *et al.* 1998). Ebenso wird TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 exprimiert (Opperman *et al.* 1997). MSX1 wird sowohl pränatal als auch postnatal in der Dura mater nachgewiesen und auch MSX2 tritt pränatal in der harten Hirnhaut auf, kann dann aber postnatal kaum mehr detektiert werden. Ebenso verhält es sich mit dem Liganden BMP4. Auch er kann postnatal kaum mehr nachgewiesen werden. Dies deckt sich auch mit der Annahme, dass der Einfluss der Dura mater auf die Entwicklung der Suturen nach der Geburt stark abnimmt (Kim *et al.* 1998).

Allerdings haben nicht nur Zeitpunkt und Lokalisation der Expression, sondern auch das embryonale Ursprungsgewebe der Knochen Einfluss auf die Entwicklung. Senarath-Yapa *et al.* (2013) konnten zeigen, dass Knochen mit mesodermalem Ursprung eine geringere Aktivität des Wnt-, BMP- und FGF-Signalweges, allerdings eine höhere Aktivität des TGF- $\beta$ -Signalweges aufweisen, während Knochen, die aus den Zellen der Neuralleiste gebildet wurden, eine genau umgekehrte Aktivität der Signalwege zeigen. Daraus ergibt sich ein geringeres osteogenes Potential der aus dem Mesoderm gebildeten Knochen (Senarath-Yapa *et al.* 2013).

## Literaturübersicht



Abbildung 18: Vorherrschende Liganden und Rezeptoren der patenten Sutur modifiziert nach Opperman (2000). In Blau sind die Knochenenden, in Orange der suturale Spalt und in Rot die Dura mater dargestellt. Die vorherrschenden Liganden und Rezeptoren sind in die jeweiligen Gewebe eingetragen.

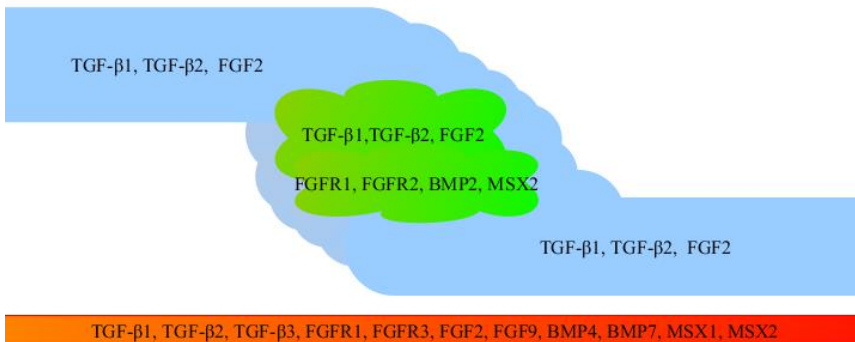


Abbildung 19: Vorherrschende Liganden und Rezeptoren der sich schließenden Sutur modifiziert nach Opperman (2000). Die Knochenfronten sind in Blau, das Mesenchym in Grün und die Dura mater in Rot dargestellt. Die vorherrschenden Liganden und Rezeptoren sind jeweils in die Gewebe eingetragen.

## 2.5 Kraniosynostose

Der Begriff Kraniosynostose wurde erstmals 1830 von Adolph-Wilhelm Otto verwendet und beschreibt den vorzeitigen Schluss von einer oder mehreren Suturen des Schädels. Insbesondere durch Störungen der diffizilen Mechanismen, die das Wachstum im Bereich der Suturen aufrechterhalten, kann es zur Ausbildung dieser Anomalie kommen (Twigg *et al.* 2015b; Otto 1830). Entsprechend dem von Rudolf Virchow 1851 aufgestellten Gesetz führt die Obliteration einer Naht zu einem Wachstumsstopp senkrecht zu ihr. Unterdessen kommt es zu einem kompensatorischen Wachstum der verbliebenen Schädelnähte parallel zu der betroffenen Naht. Dies führt zur Ausbildung einer veränderten Schädelform, die für den jeweiligen Nahtverschluss typisch ist (Persing *et al.* 1989; Cohen 2000) (Abbildung 20). Beim verfrühten Schluss beider koronalen Suturen kommt es beispielsweise durch das unterbrochene Längen- und das vermehrte Breitenwachstum zur Ausformung einer brachycephalen Kopfform mit prominentem Stirnbein, flachem Os occipitale und vergrößertem Augenabstand (*Hypertelorismus*) (Kutkowska-Kaźmierczak *et al.* 2018; Badve *et al.* 2013). Stattdessen führt eine sagittale Kraniosynostose durch das fehlende Breitenwachstum zu einem abnorm langen, schmalen Schädel, welcher als dolichocephal bezeichnet wird (Panchal *et al.* 2003). Die Pathogenese der Kraniosynostose ist multifaktoriell und bis heute noch nicht ganz geklärt. Zu den Faktoren, die eine verfrühte Fusion von ein oder mehreren Schädelnähten begünstigen, zählen eine verminderte mechanische Krafteinwirkung des wachsenden Gehirns durch eine Mikrozephalie (Bächli *et al.* 2018), extrinsische Krafteinwirkungen auf den juvenilen Schädel, insbesondere dann, wenn sie in der fetalen Periode einwirken (Boulet *et al.* 2008) und primäre genetische Veränderungen, die die Suture und ihre Signalsysteme beeinflussen.

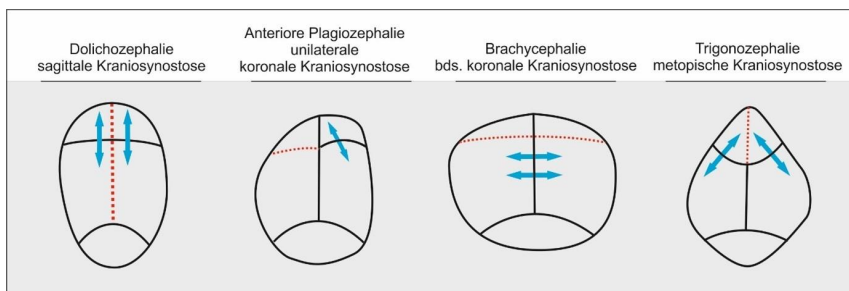


Abbildung 20: typische Schädelformen bei Kraniosynostosen. Die obliterierte Suture wird in Rot dargestellt, die Pfeile symbolisieren das kompensatorische Wachstum. Modifiziert nach Freudlsperger *et al.* (2013).

Auch wenn die externen Faktoren in der Entstehung der Kraniosynostose eine wichtige Rolle spielen, sind doch in vielen Fällen genetische Veränderung ursächlich für diese Anomalie.

Treten neben der Kraniosynostose noch weitere Defekte anderer Organsysteme, wie Malformationen der Hände oder Füße, Herz- oder Skelettmissbildungen auf, handelt es sich um eine sogenannte syndromische Form der Kraniosynostose. Demgegenüber steht die isolierte (nicht syndromische) Form der Kraniosynostose, ohne Beteiligung weiterer Organsysteme. Eine genetische Veranlagung ist insbesondere dann sehr wahrscheinlich, wenn mehr als eine Sutura betroffen ist, es sich um eine syndromische Form der Kraniosynostosen handelt, oder die Familienanamnese positiv ausfällt (Twigg *et al.* 2015b). Wenn eine genetische Ursache der Grund für die Kraniosynostose ist, so ist am häufigsten die koronale Sutura davon betroffen. Durch ihre Lage zwischen zwei Geweben unterschiedlichen Ursprungs, dem Os parietale mit mesodermaler Herkunft und dem Os frontale mit seinem Ursprung aus der Neuralleiste, weist sie die komplexeste Biogenese unter den Schädelnähten auf (Wilkie *et al.* 2010).

### **2.5.1 Kausale Genmutationen für Kraniosynostosen**

Mutationen in Genen, die bereits identifiziert wurden, Kraniosynostosen zu begünstigen, codieren Proteine, die während der einzelnen Entstehungsphasen der Sutura beteiligt sind (Abbildung 21). Soweit bekannt, ist im folgenden Text jeweils der Erbgang und die Nummer, unter welcher die Erkrankung in Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) gelistet ist, in Klammern aufgeführt. Ganz zu Beginn der Entwicklung der Sutura, während der Spezifizierung und Migration der Stammzellen, scheint SHH eine Schlüsselrolle zu spielen. Das Protein RAB23 ist ein negativer Regulator von SHH (Eggenschwiler *et al.* 2001). Mutationen innerhalb des *RAB23*-Gens, die zu dessen Funktionsverlust führen, sind beim Menschen mit dem Carpenter-Syndrom (AR, MIM: 201000) assoziiert und gehen mit den Kardinalsymptomen Kraniosynostose, Polysyndactyly, Übergewicht und Herzmissbildungen einher (Jenkins *et al.* 2007). Während der Formierung der koronalen Sutura oberhalb der Augen, in einem Bereich welcher „supraorbitales Regulationszentrum“ genannt wird, sind „Gain-of-Function“-Mutationen im *ZIC1*-Gen beim Menschen ursächlich für die Entstehung einer koronalen Kraniosynostose (Twigg *et al.* 2015a). Der Transkriptionsfaktor *ZIC1* wiederum ist ein Aktivator des Wnt-Signalweges (Merzdorf *et al.* 2006). Nachdem sich die Zellen formiert haben, muss die Grenze zwischen den beiden Ursprungsgeweben (Mesoderm/Neuralleiste), die in der koronalen Sutura aufeinandertreffen, aufrechterhalten werden. Für Bildung und den Bestand dieser Grenzlinie sind die Transkriptionsfaktoren *TWIST1*, *MSX2*, *TCF12*, sowie

Mitglieder der Jagged/Notch-Familie essentiell (Yen *et al.* 2010). Bekannt sind derzeit Mutationen, die zu einer Haploinsuffizienz von TWIST1 oder seinem Interaktionspartner TCF12, beziehungsweise zu einer gesteigerten Aktivität von MSX2 führen und dadurch einen verfrühten Fugenschluss begünstigen. Bei einer Haploinsuffizienz von TWIST1, wie sie beim Saethre-Chotzen-Syndrom (AD, MIM: 101400) auftritt (Howard *et al.* 1997), konnten Merrill *et al.* (2006) eine abnorme Wanderung der Zellen aus der Neuralleiste in das Gebiet des mesodermalen Parietalknochens zeigen. Die Haploinsuffizienz von TCF12 zeigt sich vor allem in einer uni- oder bilateralen koronalen Kraniosynostose (AD, MIM: 615314). Liegt zusätzlich ein heterozygoter Funktionsverlust von TWIST1 vor, bildet sich eine schwerere Form der koronalen Kraniosynostose aus. Allerdings zeigen nicht alle Probanden, bei denen die Mutation im *TCF12*-Gen nachgewiesen werden konnte, eine phänotypische Ausprägung der Merkmale. In der Studie von Sharma *et al.* (2013) lag die Nicht-Penetranz der Mutation bei ca. 46 %. Die Veränderung im *MSX2*-Gen führt zu einer erhöhten Affinität des Transkriptionsfaktors MSX2 für einige seiner Zielsequenzen und klinisch zur Ausprägung der Boston-Typ Kraniosynostose (AD, MIM: 604757) (Ma 1996). Wie bereits oben erwähnt, sind auch die Signale des Notch-Weges in diesem Stadium sehr wichtig. Allerdings konnten innerhalb der letzten Jahre noch keine Genmutationen innerhalb des Signalweges identifiziert werden, die mit dem klinischen Erscheinungsbild der Kraniosynostose in Zusammenhang stehen (Twigg *et al.* 2015b). Während des Wachstums und der Neubildung der Knochen nimmt der FGF/FGFR-Signalweg eine Schlüsselrolle ein. Die mit Kraniosynostose assoziierten Mutationen innerhalb der FGF-Rezeptoren führen allesamt zu einer erhöhten Aktivität (z.B. erhöhte Liganden-Affinität, Expression von Isoformen) oder einer verminderten Spezifität der Rezeptoren. Das wiederum hat eine vermehrte Aktivierung des RAS/MAPK-Weges zur Folge. Eine Vielzahl an Syndromen gehen mit Mutationen innerhalb dieser Rezeptoren einher. Veränderungen im FGFR1-Rezeptor führen zum Pfeiffer- (AD, MIM: 136350) und zum Jackson-Weiss-Syndrom (AD, MIM 136350), welche beide allerdings auch durch Mutationen innerhalb des *FGFR2*-Genes (AD, MIM 176943) induziert werden können (Muenke *et al.* 1994). Weiterhin zählen auch das Apert- (AD, MIM: 101200), das Antley-Bixler- (AD, MIM: 207410) und das Crouzon-Syndrom (AD, MIM: 123500) zu den Kraniosynostosen, die durch Veränderungen im FGFR2-Rezeptor hervorgerufen werden. Mutationen im *FGFR3-Rezeptor*-Gen sind ursächlich für das Muenke-Syndrom (AD, MIM: 602849) (Passos-Bueno *et al.* 1999; Bellus *et al.* 1996). Eine Duplikation des *RUNX2*-Genes führt zur Ausbildung einer Kraniosynostose (Mefford *et al.* 2010), während eine Haploinsuffizienz mit pathologisch verbreiterten Schädelnähten einhergeht. Aus bislang ungeklärten Gründen benötigen Knochen, die eine desmale

## Literaturübersicht

Ossifikation durchlaufen, wozu ein Großteil der Schädelknochen zählt, höhere Spiegel an RUNX2, als Knochen, die sich über eine enchondrale Ossifikation entwickeln (Mundlos *et al.* 1997). Mikroduplikationen im Bereich des IHH-Locus führen zur Kraniosynostose vom Philadelphia-Typ (AD, MIM: 185900), die zumeist die sagittale Sutur betrifft und mit einer Syndaktylie vergesellschaftet ist (Klopocki *et al.* 2011). Die Konstellation aus Genmutationen und die phänotypische Ausprägung sind bei der Kraniosynostose sehr individuell (idiosynkratisch). Ein kompletter Genverlust liegt nur in den seltensten Fällen vor (Ausnahme *RAB23*). Es wird angenommen, dass ein vollständiger Ausfall der Schlüsselgene für die Schädel- und Suturenentwicklung bereits durch hochgradige Entwicklungsstörungen anderer Organe zum embryonalen Tod führen würde, noch bevor es zur Ausbildung der Kraniosynostose kommen kann (Twigg *et al.* 2015b).

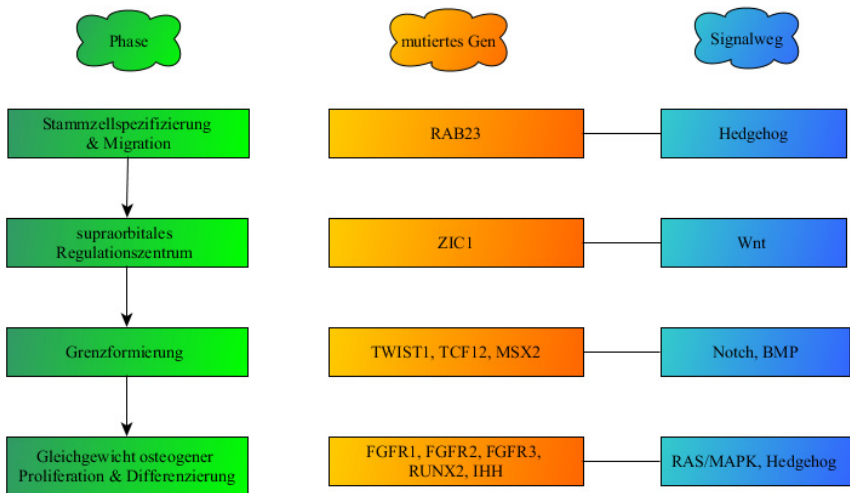


Abbildung 21: Übersicht über die Stadien der koronalen Nahtentwicklung, der jeweiligen mutierten Gene und dem betreffenden Signalweg modifiziert nach Twigg *et al.* (2015b). In der linken Spalte sind die Phasen der Suturenentwicklung chronologisch aufgetragen, in der mittleren Spalte folgen die jeweiligen mutierten Gene, die in dieser Phase zu einer Kraniosynostose führen, sowie, in der rechten Spalte, der jeweilige Signalweg, über welchen die Gene in dieser Phase hauptsächlich agieren.

### 2.5.2 Kraniosynostose beim Menschen

Beim Menschen tritt die Kraniosynostose bei Neugeborenen mit einer Prävalenz von 1 zu 2.250 auf und ist somit, nach orofazialen Spalten, die zweithäufigste kraniofaziale Missbildung (Lajeunie *et al.* 1995; Boulet *et al.* 2008). Dabei handelt es sich bei ungefähr 85 % der Fälle um nicht syndromische Kraniosynostosen, wobei mit 40–55 % die sagittale Sutur am häufigsten betroffen ist, gefolgt von der koronalen Naht mit 20–25 % und den eher selten auftretenden metopischen (5–15 %) und lambdoiden (bis 5 %) Synostosen (Cohen 2000). Die restlichen 15 % werden zu einem der mittlerweile ca. 180 beschriebenen syndromischen Formen gezählt, wovon wiederum ca. 50 % einer mendelschen Vererbung unterliegen (Kimonis *et al.* 2007; Winter *et al.* 1987). Die erste Mutation innerhalb eines Gens, die ursächlich für die Entstehung einer Kraniosynostose bei betroffenen Familienmitgliedern war, wurde 1993 im Gen des Transkriptionsfaktors MSX2 identifiziert (Jabs *et al.* 1993). Viele weitere folgten, sodass heute bereits 57 Gene identifiziert sind, in denen Mutationen die Ursache für die Entwicklung einer Kraniosynostose sind (Twiggy *et al.* 2015b) (Kap. 2.5.1). Allerdings kann derzeit noch bei  $\frac{1}{4}$  der Erkrankten die Ätiologie der Kraniosynostose nicht geklärt werden. Deshalb sind weitere Forschungen nötig, um Gene zu identifizieren die mit der Entstehung eines verfrühten Fugenschlusses in Zusammenhang stehen (Heuzé *et al.* 2014).

Die vorzeitige Ossifikation von Suturen führt zu einer Reihe von morphologischen Abnormalitäten. Durch die Fehlbildungen des Neurokraniums kommt es nicht selten zu einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks (IKD). Insbesondere Patienten mit multiplen Kraniosynostosen sind hiervon häufig betroffen. In vorangegangenen Studien wurde hier bei 47–67 % der Patienten ein erhöhter IKD dokumentiert (Blount *et al.* 2007; Cinalli *et al.* 1998; Hayward *et al.* 2005; Renier *et al.* 1982). Auch wenn das Risiko bei Einzel-Naht-Synostosen deutlich geringer ist, konnten Thompson *et al.* (1995) mittels subduralen Hirndruckmessungen, mit einer Inzidenz von bis zu 33 % je nach betroffener Sutur, eine Erhöhung des Schädelinnendrucks feststellen (Thompson *et al.* 1995; Gault *et al.* 1992). Ein Papillenödem als indirektes Hirndruckzeichen konnte bei bis zu 18 % der Betroffenen mittels einer ophthalmologischen Untersuchung diagnostiziert werden (Tuite *et al.* 1996; Cohen *et al.* 1998; Florisson *et al.* 2010). Durch die Erhöhung des Hirndrucks kann es unter anderem zu Schäden am *Nervus opticus* kommen, was wiederum Sehstörungen bis hin zur Erblindung als Folge haben kann. Weiterhin gehen mit den Kraniosynostosen häufig Hörprobleme, eine Verengung der oberen Atemwege bis hin zur Chonalatresie, ein veränderter zerebraler Blutfluss und Zahnfehlstellungen einher (Lajeunie *et al.* 1995; Gonzalez *et al.* 1997; David *et al.* 1996; Grabb *et al.* 1997). Überdies kann bei einigen Patienten eine psychomotorische Entwicklungsstörung

festgestellt werden. Es ist allerdings noch nicht hinreichend geklärt, ob es sich dabei um eine Folge des verfrühten Fugenschlusses oder eine mit ihr assoziierte gestörte zerebrale Entwicklung handelt (Speltz *et al.* 2004). Bei syndromischen Kraniosynostosen tritt neben den Veränderungen der Extremitäten verbreitet auch ein Hydrozephalus auf (Collmann *et al.* 2005).

Eine kausale Therapie der Kraniosynostose ist bis heute nicht möglich (Shukla *et al.* 2007; Wang *et al.* 2012). Obwohl anhand von Tiermodellen verschiedenste pharmakologische Therapieoptionen erforscht werden, ist eine chirurgische Intervention heutzutage noch immer die einzige Möglichkeit, die negativen Folgen der Kraniosynostose möglichst gering zu halten. Das Hauptziel der Operationen liegt darin, die verschlossene Naht zu öffnen, um so eine normale Ausdehnung der Calvarien zu ermöglichen. Das intrakranielle Volumen soll dadurch vergrößert und somit potentiellen Gefahren durch einen steigenden intrakranielle Druck vorgebeugt werden (Panchal *et al.* 2003).

### **2.5.3 Tiermodelle für Kraniosynostosen**

Tiermodelle liefern einen wertvollen Beitrag zum Verständnis der multifaktoriellen Ursachen und der Heterogenität der Kraniosynostose beim Menschen. Am umfangreichsten wird der Einfluss der unterschiedlichen molekularen Faktoren auf das normale und abnormale Schädelwachstum an Mäusen, Ratten und Kaninchen erforscht (Slater *et al.* 2008). So züchteten Mooney *et al.* (1994b) einen Stamm der Kaninchenrasse „weiße Neuseeländer“ mit familiärer kongenitaler bilateraler koronaler Kraniosynostose (Mooney *et al.* 1994b; Mooney *et al.* 1994a). Innerhalb dieser Linie zeigt sich eine autosomal dominante Vererbung dieses Merkmals mit unvollständiger Penetranz und variabler Expression (Mooney *et al.* 1996). Die phänotypischen Varianten reichen von einer normalen koronalen Fugenentwicklung über den verfrühten postnatalen Verschluss bis hin zur frühen koronalen Synostose mit kraniofazialen Malformationen (Mooney *et al.* 1994a; Mooney *et al.* 1994b). In einer weiterführenden Studie konnten Gilbert *et al.* (2017) zeigen, dass die Schwere der phänotypischen Ausprägung signifikant mit einer steigenden Homozygotie durch Inzucht innerhalb dieser Kaninchenlinie korreliert. Die zugrundeliegende(n) Mutation(en) innerhalb dieser Linie ist/sind unbekannt (Gilbert *et al.* 2017). Kaninchen sind bis zum heutigen Tag die einzige Tierart, bei welcher die Kraniosynostose als vererbbarer Defekt in der Datenbank Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA) (OMIA ID 001224-9986) gelistet ist. Maus, Mensch und Ratte sind von dieser Datenbank ausgenommen, da sie jeweils in einer separaten aufgeführt sind (OMIM, MGI-Mouse Genome Informatics, RGD). Marongiu *et al.* (2015) untersuchten den Einfluss von



FOXL2 auf die Skelettentwicklung von Mäusen. Phänotypisch zeigen die *FOXL2*-Knockout-Mäuse neben einem Minderwuchs, Fehlentwicklungen der Knochen und Knorpel auch eine sagittale und koronale Kraniosynostose. Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich eine vermehrte Expression der Gene *DNER* und *DTX1*, Gene des nicht-kanonischen Notch-Signalweges, was vermuten lässt, dass FOXL2 über diesen Signalweg die Knochenentwicklung beeinflusst.

### **2.6 Brachycephalie bei Hund und Katze**

Einige Zuchtrichtungen der Hunde und Katzen ähneln in ihrer Morphologie dem Bild der humanen Kraniosynostose vom Brachycephalie-Typ. Wie bereits im Kapitel 2.5. beschrieben führt eine koronale Kraniosynostose zur Ausbildung der brachycephalen Kopfform.

Diese Kopfform wurde bei Hunden und Katzen mehr und mehr züchterisch forciert, da sich das kindliche Aussehen der Tiere mit großen Augen und kleiner Stupsnase bei den späteren Besitzern großer Beliebtheit erfreut (Lauruschkus 1942). Allerdings gehen auch beim Tier mit der Kurzköpfigkeit schwere Folgeerkrankungen einher. Es kann zum brachycephalen Atemwegssyndrom (Harvey 1989), der Hypoplasie der Kaumuskulatur, bedingt durch den verkürzten Oberkiefer zu Kiefer- und Zahnanomalien (Mestrinho *et al.* 2018) und durch die weit hervorstehenden Augen zu Verletzungen der Cornea kommen (Willer 1992). Außerdem neigen die Tiere während der Geburten durch die runden großen Köpfe der Feten zu Schweregeburten (Prescott 1973). Brachycephale Rassen haben eine Disposition für einen Hydrozephalus (Chew-Lim 1976) und die Perserkatze zeigt eine Neigung für eine Atresie der tränenableitenden Wege (Lutz *et al.* 2015; Schlueter *et al.* 2009). In ihrer Arbeit untersuchten Schlueter *et al.* (2009) die Schädelformen der Katzen und teilten sie dann anhand ihrer Morphologie in vier Klassen der Brachycephalie ein. Diese reichen von eins (leicht brachycephal) bis vier (schwer brachycephal) und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Einteilung der Brachycephalie bei der Katze nach Schlueter *et al.* (2009).

Kategorie	Zahnstellung Oberkiefercanini	Dorsorotation Kiefer	Stopp	Schädelknochen
<b>Mild</b>	Nahezu vertikal	Keine	Undeutlich	Deutlich entwickelt
<b>Moderat</b>	Dorsal rotiert	Ja	Deutlich	Reduziertes Os nasale Neurokranium abgerundet
<b>Ausgeprägt</b>	Dorsorotation deutlich sichtbar	Deutlich, Nasenspitze über unterem Augenlid	Deutlich	Reduziertes Os nasale Knochen des Neurokraniums unterentwickelt
<b>Schwer</b>	Nahezu horizontal	Hochgradig	Stark ausgeprägt	Gesichtsknochen unterentwickelt Neurokranium abgerundet

Schmidt *et al.* (2017) führten Mikro-CT Aufnahmen an fünf 4–5 Wochen alten *peke-face* Perserkatzen durch. Die koronale Suture ist bei allen Kitten bereits verschlossen (Abbildung 22), während alle anderen Suturen der Calvarien und die Synchronosen der Schädelbasis deutlich sichtbar sind. Die sagittale Suture erscheinen im Vergleich mit Aufnahmen gleichaltriger mesozephaler Katzen erweitert. Diese Ergebnisse sprechen für das Vorliegen einer koronalen Kraniosynostose bei den *peke-face* Perserkatzen mit einer daraus resultierenden brachycephalen Schädelform. Diese Annahme deckt sich auch mit den neusten Ergebnissen von Schmidt *et al.* (2022). Bei dieser Studie wurde der Schluss der Suturen und Synchronosen des Neurokraniums an über 80 Katzen (*peke-face*, *doll-face* Perserkatzen und EKH) in Abhängigkeit von ihrem Alter untersucht. In einer vergleichenden 3D-Rekonstruktion der Schädel von Europäisch Kurzhaar Katzen (EKH), *doll-face* und *peke-face* Perserkatzen fällt deutlich die reduzierte Länge und erweiterte Breite des Schädels der *peke-face* Perserkatze auf. Weiterhin zeigt sich eine nahezu runde, kuppelförmige Aufwölbung des Schädels und eine ausgeprägte über die Gesichtsebene vorragende Stirn (*frontal bossing*). Der mittlere kraniale Index der *peke-face* Perserkatze ist signifikant höher als bei der *doll-face* und EKH. Zwischen *doll-face* und EKH gibt es unterdessen keinen signifikanten Unterschied bezogen auf den kranialen Index (Abbildung 23) (Schmidt *et al.* 2017; Schmidt *et al.* 2022).

## Literaturübersicht

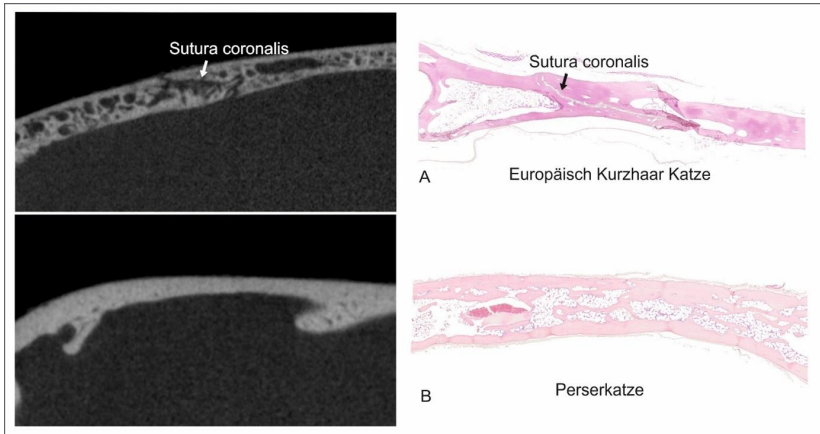


Abbildung 22: Micro-CT Aufnahmen und korrespondierende histologische Schnitte der koronalen Sutura. A: patente Sutura einer 6 Monate alten EKH. B: verschlossene Sutura einer 12 Wochen alten *peke-face* Perserkatze (Schmidt *et al.* 2022).

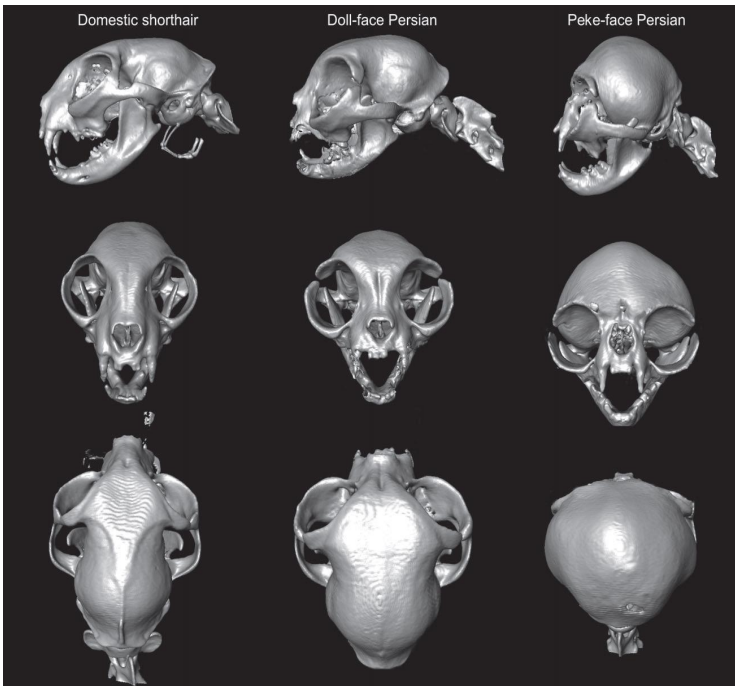


Abbildung 23: 3D-Rekonstruktionen des Schädels einer EKH, *doll-face* und *peke-face* Perserkatze (von links) in der Seiten-, Frontalansicht und Aufsicht (Schmidt *et al.* 2017). Der Vergleich zeigt die massive Gestaltveränderung des Schädels bei der *peke-face* Perserkatze, die auf die koronale Kraniosynostose zurückzuführen ist.

Beim Hund konnten bis heute Mutationen in zwei Genen identifiziert werden, die an der Entstehung einer Kurzköpfigkeit beteiligt sind. Schoenebeck *et al.* (2012) konnten eine Missense-Mutation im hochkonservierten Bereich von *BMP3* nachweisen, welche zu einem Phenylalanin zu Leucin Austausch führt. Die Funktion von *BMP3* ist noch weitgehend unerforscht, es wird allerdings vermutet, dass *BMP3* den TGF- $\beta$ -Signalweg inhibiert, was wiederum zur Unterdrückung der Osteogenese führt (Bahamonde *et al.* 2001). Bei den Vertretern kleiner und mittlerer brachycephaler Rassen tritt diese Mutation nahezu fixiert auf, konnte allerdings bei mittelgroßen bis großen kurzköpfigen Rassen (Boxer, Bullmastiff, Bordeaux Dogge) nicht verifiziert werden. Stattdessen konnte diese Mutation entgegen der Erwartungen bei einer dolichocephalen Rasse, dem Scottish Terrier, nachgewiesen werden (Schoenebeck *et al.* 2013). Dies wiederum bekräftigt die bereits 1941 von Stockard veröffentlichte Theorie, dass es sich bei der Brachycephalie um ein sehr komplexes genetisches Geschehen handelt (Stockard 1941). Im *SMOC2*-Gen konnte bei Vertretern brachycephaler Hunderassen eine Insertion eines Retrotransposons zwischen Exon 8 und 9 aufgezeigt werden, welches zu einer Störung des Spleiß-Vorganges führt. Allerdings konnte auch diese Mutation, wie schon die im *BMP3*-Gen, nicht bei allen untersuchten kurzköpfigen Rassen nachgewiesen werden (Marchant *et al.* 2017). Die Auswirkungen vom Ausfall des *SMOC2*-Gens zeigen sich in *SMOC2*-Knockdown-Zebrafischen. Diese entwickeln eine schwere kraniofaziale Hypoplasie (Melvin *et al.* 2013), welche vermutlich durch die Unterdrückung von Zielgenen des BMP-Signalweges ausgelöst wird (Mommaerts *et al.* 2014) (Kap. 2.4.3.).

Bei Katzen konnte bisher nur innerhalb einer Linie der Burma Katze, der sogenannten Burma vom *contemporary type*, eine für Kurzköpfigkeit ursächliche Mutation festgestellt werden. Eine Deletion im *ALX1*-Gen führt bei heterozygoten Tieren zu einer extremen Brachycephalie, während homozygote Träger mit einem kraniofazialen Defekt geboren werden, der als mit dem Leben nicht vereinbar gilt und aus diesem Grund zur Euthanasie der Tiere führt. Diese Deletion kann nur bei der Burma Katze vom *contemporary type* gefunden werden und gilt als ursächlich für die ko-dominante Vererbung dieses Merkmals (Lyons *et al.* 2016). Bertolini *et al.* (2016) genotypisierten insgesamt über 800 Katzen von 13 unterschiedlichen Rassen, um der genetischen Ursache der brachycephalen Schädelform der Perserkatze näher zu kommen. Nach Auswertung der Studienergebnisse sind insbesondere die Gene der Adhäsionsmoleküle *CHLI* und *CNTN6* als Kandidatengene für die Kopfform der Perserkatze anzuführen, wobei in der Studie nicht zwischen *doll-face* und *peke-face* Perserkatzen unterschieden wurde (Bertolini *et al.* 2016). Bei dem von *CNTN6* kodierten Protein handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, welches über den nicht-kanonischen Notch-Signalweg agieren kann (Cui *et al.* 2004).

### **2.6.1 Brachycephalie der Perserkatze und damit einhergehende gesundheitliche Probleme**

Auch wenn die mit der Kurzköpfigkeit einhergehenden Erkrankungen und Einschränkungen bei der Katze noch nicht so umfassend erforscht worden sind, wie bei brachycephalen Hunderassen, sind in den letzten Jahren doch einige Studien zu diesem Thema durchgeführt worden (Pratschke 2014). Farnworth *et al.* (2016) untersuchten respiratorische Abnormalitäten im Hinblick auf das Brachycephalen-Syndrom bei normozephalen und brachycephalen Katzen. Sie kamen zu dem Schluss, dass insbesondere Tiere mit einer kaudodorsalen Position der Nase ein erhöhtes Risiko haben, an Atemproblemen und/oder einem erheblichen Atemgeräusch zu erkranken. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine kurze, weiter kaudal positionierte Nase (in dieser Studie ca. 20 %) mitunter mit einer Verlagerung der Nasenmuscheln in den Nasopharynx einhergeht (Ginn *et al.* 2008). Außerdem können bei brachycephalen Katzen vermehrtes Weichteilgewebe in der Nase, ein verlängertes Gaumensegel und Pathologien des Kehlkopfes zu einer Verengung der oberen Atemwege führen (Corgozinho *et al.* 2012). Mit steigender Ausprägung der Kurzköpfigkeit engen sich Nasenlöcher, Naseneingang und die Nasenhöhle immer mehr ein, wodurch der Atemwiderstand deutlich ansteigt (Schlueter *et al.* 2009; Nöller 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einer stärker ausgeprägten Brachycephalie auch vermehrt unter Epiphora, dem Auslaufen der Tränenflüssigkeit über die Lidränder (Pschyrembel *et al.* 2007), leiden (Farnworth *et al.* 2016). Durch den Verschluss beziehungsweise die Verengung und den abnormen Verlauf des nasolacrimalen Systems können die Tränen nicht mehr über ihren vorgesehenen Weg in die Nase hin abfließen, sondern laufen stattdessen über das Gesicht hinab (Breit *et al.* 2003; Schlueter *et al.* 2009). Dadurch kommt es einerseits zu einer Verfärbung des Fells, andererseits wird durch die dauernde Feuchtigkeit die Entstehung einer sekundären Dermatitis an diesen Stellen begünstigt (Malik *et al.* 2009). Die brachycephale Schädelform führt außerdem zu einer Prädisposition für ein Entropium, einer Anomalie bei der sich das Lid Richtung Hornhaut einrollt und die Haare diese permanent reizen (Williams *et al.* 2009). Zum anderen führen die flachen Augenhöhlen und die dadurch bedingt, weit hervorstehenden Augen zu einer Begünstigung von Hornhautverletzungen (Hartley 2010) (Abbildung 24). Chronische Irritationen und Ulzerationen scheinen ursächlich für die Entstehung von Hornhautsequestern. Auch diese kommen bei der Perserkatze überproportional häufig vor (Hartley 2010; Morgan 1994).

Durch die Kurzköpfigkeit und die dadurch bedingte Fehlstellung der Zähne zeigen die Perserkatzen eine Prädisposition für dentale Erkrankungen, wie die felines odontoklastischen resorptiven Läsionen (FORL) und Erkrankungen des Parodontalapparates. Des Weiteren zeigen

## Literaturübersicht

sich häufig Malocclusionen (Mestrinho *et al.* 2018), wobei bei den Perserkatzen mit besonders hoher Inzidenz eine Mesioversion der Oberkieferzähne auftritt (Niemiec 2010). Mit einem höheren Grad der Kurzköpfigkeit rotieren diese immer mehr nach dorsal bis sie im extremsten Fall nahezu horizontal liegen (Schlueter *et al.* 2009; Schmidt *et al.* 2017) (Abbildung 25). Häufig müssen die Zahnfehlstellungen kieferorthopädisch oder mittels Kronenamputation und Wurzelkanalbehandlung versorgt werden (Niemiec 2010; Sieslack 2019).



Abbildung 24: *peke-face* Perserkatze mit einem schweren Hornhautulkus des linken Auges (Quelle: eigene Aufnahme).

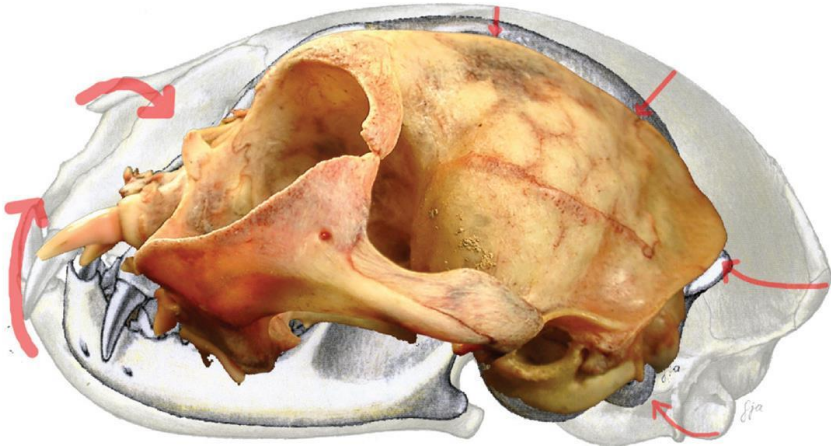


Abbildung 25: Vergleichende Abbildung des Schädels einer mesozephalen und einer brachyzephalen Katze. Im Hintergrund ist der Schädel einer mesozephalen Katze dargestellt. Im Vordergrund der Schädel einer stark brachyzephalen Katze. Deutlich wird die Dorsorotation des Oberkiefers mit nahezu horizontal liegenden Canini des Oberkiefers und die maximale Reduktion der Nase (Schlueter *et al.* 2009).

### 2.6.2 *Hydrocephalus internus*

Neben den bereits beschriebenen Problemen untersuchten Schmidt *et al.* (2017) in einer vergleichenden Studie zwischen Europäisch Kurzhaar Katzen (EKH), *doll-face* (geringerer Brachyzephaliegrad) und *peke-face* Perserkatzen die Schädel und Gehirne der Tiere mittels Computer- und Magnetresonanztomographie (MRT). Die Einteilung der Perserkatzen erfolgte nach den Kriterien der CFA und demnach nach Lage des Stopps in Bezug auf den unteren Augenlidrand. Dabei zeigte sich, dass die *peke-face* im Vergleich zu *doll-face* Perserkatze und EKH signifikant größere Gehirnventrikel aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Verringerung des Gesichtsschädels auch mit einer Abnahme der Schädelkapazität einhergeht. Circa 1/3 der untersuchten *peke-face* Perserkatzen zeigen einen klinischen *Hydrocephalus internus*, weitere, klinisch unauffällige Tiere, eine Ventrikulomegalie.

Der *Hydrocephalus internus* ist charakterisiert durch eine Erweiterung des Ventrikelsystems des Gehirns (Ventrikulomegalie) sowie einer erhöhten Menge an zerebrospinaler Flüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*) (MacGavin *et al.* 2007). Da die Ventrikulomegalie auch bei neurologisch gesunden Tieren beobachtet werden kann (Kii *et al.* 1997), muss für die Diagnose „*Hydrocephalus internus*“ zusätzlich eine spezifische Klinik vorliegen (Estey 2016). Treten

neben der Ventrikulomegalie in der neurologischen Untersuchung Auffälligkeiten wie zum Beispiel *Strabismus* (Schielen), *Ataxie* (Koordinationsstörungen bei Bewegungsabläufen) (Pschyrembel *et al.* 2007) oder Verhaltensänderungen auf (Thomas 2010), oder können im MRT Hinweise auf eine intrakranielle Druckerhöhung gefunden werden, handelt es sich um einen klinisch relevanten *Hydrocephalus internus* (Laubner *et al.* 2015). Dieser entsteht meist infolge einer gestörten Produktion, Zirkulation oder Resorption der zerebrospinalen Flüssigkeit (Pschyrembel *et al.* 2007). Der Liquor wird zum einen aktiv durch den *Plexus choroideus* in den zwei Seiten-, sowie dem dritten und vierten Ventrikel produziert. Zusätzlich entsteht er durch die Bildung von extrazellulärer Flüssigkeit im Parenchym des Rückenmarks und Gehirns (DeLahunta *et al.* 2009). Insgesamt kommt es bei der Katze zu einer Produktion von 0,02 ml Liquor/min (Braund 1994). Durch die Pulsation der intrakraniellen Gefäße kommt es zu einer gerichteten Bewegung des Liquors vom rostralen Ende der Seitenventrikel über das *Foramen interventrikulare* in den III. Ventrikel und über den *Aquaeductus mesenzephalii* in den IV. Ventrikel (Greitz 2004). Über die *Foramina luschkae* des IV. Ventrikels gelangt der Liquor in den Subarachnoidalraum des ZNS, sowie auf Höhe des *Foramen magnum* in den Zentralkanal des Rückenmarks (DeLahunta *et al.* 2009; König *et al.* 2009). Der Großteil der Resorption der zerebrospinalen Flüssigkeit erfolgt über die Kapillarebene sowie die Arachnoidalzotten ins Blut (Dewey *et al.* 2016).

Da bei den *peke-face* Perserkatzen immer nur die lateralen Ventrikel betroffen sind, der *Aquaeductus mesenzephalii* bei allen Tieren aber normal ausgebildet ist und eine Herniation des Kleinhirns nur bei einigen *peke-face* Perserkatzen gefunden werden konnte, bleibt die Ursache für die Entstehung des *Hydrocephalus internus* bei ihnen unbekannt (Schmidt *et al.* 2017). Allerdings kann auch bei Menschen mit Brachyzephalie beziehungsweise koronaler Kraniosynostose bei der syndromischen Form häufig ein idiopathischer *Hydrocephalus internus* beobachtet werden (Collmann *et al.* 2005).



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Probenmaterial

Es wurden Proben von insgesamt 54 Katzen der Rasse Perser eingezogen. Als Material lag jeweils ein ml EDTA-Blut vor. Dieses wurde im Rahmen anderer Untersuchungen oder Behandlungen, wie beispielsweise das präanästhetische Legen eines Venenverweilkatheters, an der Veterinärmedizinischen Kleintierklinik Universität Gießen Abteilung Neurologie gewonnen und im Rahmen der präanästhetischen Untersuchung der Narkosefähigkeit der Tiere untersucht. Die genetischen Untersuchungen erfolgten aus dem Restblut dieser gewonnenen Proben. Bis zu weiteren Analysen wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Unter den 54 Katzen befanden sich Perserkatzen der Zuchttrichtung *peke-face* (N = 41) ebenso wie Vertreter der *doll-face* (N = 6) Zuchttrichtung, sowie Tiere, die eine moderate Brachycephalie (N = 7) aufwiesen. Die untersuchten Katzen stammten von Zuchtlinien aus ganz Deutschland, darunter 28 Tiere aus der gleichen Perserkatzenzucht. Sofern der Stammbaum bekannt war, wurde er in einer Datenbank hinterlegt, sodass die Verwandtschaftsbeziehungen einiger Perserkatzen graphisch dargestellt werden konnten. Aus Gründen des Datenschutzes wurden den Tieren die Nummern 1–54 zugeteilt. Unter den beprobten Perserkatzen befanden sich 24 männliche und 30 weibliche Tiere.

Im Vorfeld der genetischen Analysen wurden unter der Leitung eines Dipl. ECVN an der Klinik für Kleintiere Abteilung Chirurgie der Justus-Liebig-Universität MRT Untersuchungen im Hinblick auf das Vorliegen eines *Hydrocephalus internus* sowie zur Bestimmung des kranialen Index durchgeführt. Diese Daten wurden mit in die Studie einbezogen.

Unter den 54 Katzen waren außerdem die Proben von vier Perserkitten. Diese Tiere waren Vollgeschwister und sind im Alter von drei bis vier Monaten gestorben oder auf Grund hochgradiger neurologischer Befunde euthanasiert worden. Von diesen Perserkatzen wurden in vorangegangenen Studien Micro-CT Aufnahmen des Schädels angefertigt, wobei bei allen eine koronale Kraniosynostose (verfrühter Schluss der Schädelnähte) festgestellt werden konnte (Schmidt *et al.* 2017). Auch diese Daten wurden mit in die Studie eingeschlossen.

Als Voraussetzung, um in die Studie eingeschlossen zu werden, mussten bei den jeweiligen Perserkatzen CT- oder MRT-Aufnahmen des gesamten Schädels vorliegen, welche zur Bestimmung des kranialen Index geeignet waren, sowie eine ausreichende Menge EDTA-Blut für die folgenden genetischen Untersuchungen. Diese Kriterien erfüllten 54 Tiere.

### 3.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

#### Chemikalien

Agarose Serva Wide Range	SERVA Electrophoresis GmbH
Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Konzentration 4 x 25µmol Thermo Fisher Scientific Inc.
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
KCl	Carl Roth, Karlsruhe
NH <sub>4</sub> Cl	Carl Roth, Karlsruhe
HCl 37%	Carl Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Promega GmbH
Mindori Green Advanced DNA-Farbstoff	Biozym Scientific GmbH
EDTA 0,5 M	AppliChem GmbH
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe

#### Puffer und Lösungen

10 % SDS	10 % (w/v) SDS in Wasser
1,5 % Agarose-TBE-Gel	1,5 % (w/v) Agarose in 0,5x TBE
6 M NaCl	6 M Natriumchlorid in Wasser
Ethanol 70 % (v/v)	70 % Ethanol (v/v) in Wasser
TBE Puffer (0,5x)	Verdünnt aus 10x
TBE Puffer (10x)	108 g Tris + 55 g Borsäure + 40 ml 0,5M EDTA <i>ad</i> 1 Liter
TE Puffer (10x)	100 mM Tris HCl, 10 mM EDTA pH 8,0
TE Puffer (1x)	Verdünnt aus 10x
Lysispuffer (Aussalzmethode)	150 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA
Waschlösung (Aussalzmethode)	140 mM NaCl, 0,5 mM KCl, 0,25 mM Tris HCl pH 7,4

### 3.3 Kits, Enzyme und Größenstandards

#### Kits

Kapa Library Quantification Kit	Illumina, Inc.
NucleoSpin® Blood Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Invisorb® Fragment cleanUp Kit	Stratec Molecular GmbH
TruSeq DNA PCR-free sample preparation Kit	Illumina, Inc.

#### Enzyme

GoTaq® Polymerase	Promega GmbH
Proteinase K	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG

#### Größenstandard

GeneRuler 100 bp Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
-------------------------	-------------------------------

### 3.4 Geräte

Elektrophorese-Kammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Gefrierschrank -20 °C	Siemens AG, GS58NAW30
NanoDrop™Mikrovolumen Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Power Supply, peqPower 300 V	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Thermocycler	
- T100	Bio-Rad Laboratories, Inc.
- C1000 mit CFX96 Optisches Modul	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Thermoshaker, TS-100C	Kisker Biotech GmbH & Co. KG
Vortexer Phoenix RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH
Zentrifugen	
- Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific Inc.
- Minispin®	Eppendorf SE, Hamburg

### 3.5 Software und Datenbanken

Zur Analyse, Visualisierung und Veröffentlichung von Daten wurde folgende Software verwendet: Der Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.5.3 (Broad Institute and the Regents of the University of California, verfügbar unter <https://software.broadinstitute.org>), die Internetplattform Primer3web Version 4.1.0 (verfügbar unter <https://primer3.ut.ee/>) sowie ChromasPro Version 2.1.8 (Technelysium Pty Ltd, verfügbar unter <http://technelysium.com.au>) für die Sequenzierung, Visualisierung und Dokumentation der DNA-Sequenzen, das Constraint-based Multiple Alignment Tools der online Plattform NCBI (verfügbar unter [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)) zur Bestimmung des Konservierungsgrades der Proteine, der yED graph Editor Version 3.18.1.1 (yWorks, verfügbar unter <https://www.yworks.com>) zur graphischen Darstellung der Stammbäume und Signalwege, das Programm AMIRA 6.2 (Mercury Computers Systems, Berlin, Deutschland) zur Vermessung des Schädels und Berechnung der kranialen Indices, IBM SPSS Statistics 20 (IBM Deutschland GmbH, verfügbar unter <https://www.ibm.com/de-de/products/spss-statistics>) zur statistischen Auswertung der Ergebnisse, sowie Microsoft office Version 16.29 (einschließlich Excel, PowerPoint und Word, verfügbar unter <https://www.microsoft.com>) für die tägliche Anwendung, einschließlich der generellen Datenanalyse und Dokumentation.

Als Datenbanken wurden NCBI (National Center for Biotechnology Information, verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, verfügbar unter <https://www.omim.org/>), OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals, verfügbar unter <https://www.omia.org>) und MGI, HMDC (Mouse Genome Informatics, Human-Mouse: Disease Connection verfügbar unter <http://www.informatics.jax.org/>) verwendet.

### 3.6 Kranialer Index

Der kraniale Index der Individuen wurde von 33 Tieren bereits im Vorfeld der Arbeit ermittelt (Sieslack 2019). Diese Daten wurden dankenswerterweise von Jana Sieslack in elektronischer Form zur Verfügung gestellt. Um weitere Probanden zu gewinnen, wurden weitere bereits vorhandene MRT-Scans identisch zu der in der Arbeit von Frau Sieslack (2019) etablierten Methodik ausgewertet. Mittels des Programms AMIRA 6.2 (Mercury Computers Systems, Berlin, Deutschland) wurde, wie in 2.2 beschrieben, durch Messung von Nasion zum Inion (kraniale Länge) sowie von rechtem Euryon zum linken Euryon (kraniale Breite) der kraniale Index bestimmt.

$$\text{Kranialer Index} = \frac{\text{kraniale Breite}}{\text{kraniale Länge}} \times 100$$

Anhand des kranialen Index wurden die Probanden in die Gruppe *doll-face* und *peke-face* eingeordnet. Je höher der Wert, desto kürzer und breiter der Hirnschädel, je niedriger der Wert, umso länger und schmaler der Schädel. Die Einordnung erfolgte nach den von Schmidt *et al.* (2017) bestimmten Mittelwerten. Basierend auf diesen wurde der *cut off* Wert von maximal 70,00 für *doll-face* und somit den weniger brachyzephalen Perserkatzen festgelegt. Die *peke-face* Katzen mit ausgeprägter Brachyzephalie mussten mindestens einen kranialen Index von 83,00 aufweisen. Perserkatzen die einen kranialen Index von  $>70 - < 83$  aufwiesen wurden der Gruppe „moderate Brachyzephalie“ zugeordnet.

### 3.7 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation für die Sanger-Sequenzierung erfolgte mit dem NucleoSpin® Blood Kit.

Für die NGS wurden hohe DNA-Konzentrationen von  $>50$  ng/μl benötigt. Um diese Konzentrationen zu erreichen, wurde hierfür die DNA-Isolation aus EDTA-Vollblut mittels der Aussalzmethode durchgeführt.

#### 3.7.1 DNA-Isolation mit dem NucleoSpin® Blood Kit

Die DNA-Extraktion aus dem Vollblut wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Blood Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde für die folgenden Analysen bei  $-20$  °C gelagert.

#### 3.7.2 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut mittels Aussalzmethode

Die Arbeiten zur Isolierung der DNA erstreckten sich über drei Tage. Sämtliche Arbeitsschritte an Tag eins wurden auf Eis bzw. mit auf  $4$  °C gekühlten Zentrifugen durchgeführt. Für die DNA-Isolierung wurden je  $300$  μl EDTA-Vollblut in ein  $1,5$  ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und dieses mit  $1x$  TE bis zum Rand aufgefüllt. Nach gründlichem Durchmischen und Zentrifugation der Proben bei  $7000$  rpm für  $5$  min wurde der Überstand verworfen und das Pellet durch Zugabe von  $1000$  μl  $1x$  TE resuspendiert und gelöst. Als nächstes wurden die Proben  $3$  min lang bei  $10.000$  rpm zentrifugiert und wiederum

resuspendiert. Durch Zugabe von 1000 µl Lysispuffer folgt die Lyse der Zellen. Die Proben wurden gut gemischt, 10 min lang auf Eis inkubiert und anschließend für 3 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet resuspendiert, in 1000 µl Waschlösung gelöst und gründlich gemischt. Nach der Zentrifugation bei 10.000 rpm für 3 min wurde wiederum der Überstand verworfen und die Waschung wiederholt. Nachdem der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert und in 450 µl 1x TE gelöst worden war, wurden zur Lyse der Kernmembran 25 µl 10 % SDS-Lösung und 10 µl Proteinase K zum Abbau denaturierter Proteine zugegeben. Die Proben wurden dann über Nacht bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben durch die Zugabe von je 200 µl 1x TE und 260 µl 6 M NaCl Lösung ausgesalzt und durch Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 13.000 rpm für 5 min getrennt. Der Überstand wurde vorsichtig in neue Eppendorf-Gefäße überführt und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Durch die Zugabe des Alkohols lagerte sich die Nukleinsäure zu Komplexen zusammen und wurde bei -20 °C über Nacht präzipitiert.

Am dritten Tag wurde die Probe bei 13.000 rpm für 30 min in einer auf 5 °C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Um die verbliebenen Isopropanolreste komplett zu entfernen, wurde das Pellet mit je 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, für 10 min auf dem Schüttler gemischt und wiederum bei 5 °C und 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bevor das Pellet, um es von Ethanol Resten zu befreien, angetrocknet wurde. Im letzten Schritt wurde dem Pellet, zur Resuspension und Lagerung der DNA, 150 µl 1x TE Puffer hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C zur vollständigen Lösung gelagert.

### **3.8 Gesamtgenomsequenzierung**

#### **3.8.1 *Library preparation* und Sequenzierung mittels Illumina HiSeq3000**

Die *library preparation* und Sequenzierung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Tosso Leeb am Institut für Genetik, Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern.

Die mit der Aussalzmethode extrahierte DNA von fünf Katzen wurde für die anschließende *library preparation* auf 20–30 ng/µl verdünnt. Diese wurde nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt (TruSeq DNA PCR-free sample preparation Kit). Durch eine mechanische und enzymatische Spaltung wurde die Proben-DNA fragmentiert. Anschließend wurden Sequenzieradapter an die Fragmente ligiert und die so vorbereiteten DNA-Moleküle mittels PCR amplifiziert (Eggermann *et al.* 2018). Die Quantifizierung der Sequenzierbibliotheken wurde mittels qPCR und dem Kapa Library Quantification Kit

durchgeführt. Nach der Qualitätskontrolle der *librarys* wurden diese mit dem Illumina HiSeq 3000 (2x 150bp) (Illumina/USA) mit einer angestrebten durchschnittlich 20-fachen *coverage* sequenziert. Durch die Sequenzierung der kleinen DNA-Fragmente entstanden die sogenannten *reads*.

### 3.8.2 Primärdaten

Die Rohdaten der Sequenzierung (Fastq-Dateien) wurden mittels bereits bestehender Datenverarbeitungs-Pipelines in der Arbeitsgruppe von Prof. Tosso Leeb, weiterverarbeitet. Beim Alignment wurden durch das *mapping* die entstandenen *reads* der passenden Position des Referenzgenoms *Felis\_catus\_9.0* ([GCF\\_000181335.3](#)) zugeordnet. Doppelte *reads* wurden mit dem Kommandozeilenprogramm *MarkDuplicates* aus der PICARD-Tools Programmsammlung identifiziert und markiert (Broad Institute 2021).

### 3.8.3 Variant calling, funktionelle Annotation und Identifizierung von Kandidatengen

In der sekundären Datenanalyse wurden beim sogenannten *variant calling* einzelne Positionen, bei welchen es sich um Single Nukleoid Polymorphismen (SNPs), sowie kleine Insertions- und Deletionspolymorphismen (INDELs) handelt, detektiert. An diesen Positionen unterschied sich die untersuchte Proben-DNA vom Referenzgenom. Für diese Analyse wurden die bestehenden Datenpipelines der Arbeitsgruppe von Prof. Leeb basierend auf dem GATK HaplotypeCaller Version 3.8.1.0 (DePristo *et al.* 2011) genutzt.

Die entstandenen Daten wurden daraufhin in einer tertiären Datenanalyse weiter gefiltert (Abbildung 26). Eine funktionelle Annotation am Referenzgenom erfolgte mit dem Programm SnpEff Version 4.3i (Cingolani *et al.* 2012; Eggermann *et al.* 2018). SnpEff versucht dabei die Relevanz (*impact*) einer Variante einzuordnen und verwendet dabei die Termini HIGH (hoch), MODERATE (moderat), LOW (niedrig) und MODIFIER (Modifizierung). Alle SNPs und INDELs, die von dem Programm SnpEff als *low* klassifiziert wurden, wurden wegen ihres potenziell niedrigen *impacts* ausgeschlossen. Außerdem wurden die SNPs mit weiteren 15 Katzengenomen verglichen, welche nicht der Rasse „Perser“ angehören. Es wurden nur Varianten gefiltert, welche ausschließlich innerhalb der Perser, nicht aber innerhalb der anderen Genome auftraten. Zur weiteren Selektion der Varianten wurde ein *impact* von mindestens moderat bis hoch gefordert. Aus diesen wurden nach Plausibilität Kandidatengene ausgewählt.

Dafür wurden insbesondere SNPs und INDELS betrachtet, welche Gene betreffen, die in der Humanmedizin mit dem Merkmal Kraniosynostose in Zusammenhang gebracht werden, welche bei Hunden oder Katzen in Verdacht stehen, bei der Entstehung der Brachycephalie beteiligt zu sein oder welche bei anderen Tieren mit abnormen Schädelwachstum assoziiert sind. Bei allen anderen SNPs innerhalb von bekannten Genen und einer mindestens moderaten Relevanz (*impact*) wurden mittels der Datenbanken NCBI, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (Amberger *et al.* 2011), Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA) (Nicholas 2003) und Mouse Genome Informatics, Human-Mouse: Disease Connection (MGI, HMDC) (Smith *et al.* 2018) auf eine Relevanz für die Entwicklung einer Kraniosynostose überprüft. Im nächsten Schritt wurden die SNPs und INDELS in den verbliebenen Kandidatengenomen auf den funktionellen Schweregrad der Varianten, sowie deren Rolle in den verschiedenen Signalwegen, die an Schädelentwicklung und -wachstum beteiligt sind, geprüft. Eine weitere Suche nach Kandidatengenomen über die Literaturrecherche erfolgte parallel zur NGS. Die Ergebnisse dieser wurden, ebenso wie die Kandidatengene, welche sich aus der Sequenzierung ergaben, mit Hilfe des Programmes Integrative Genomics Viewer (IGV) graphisch überprüft.



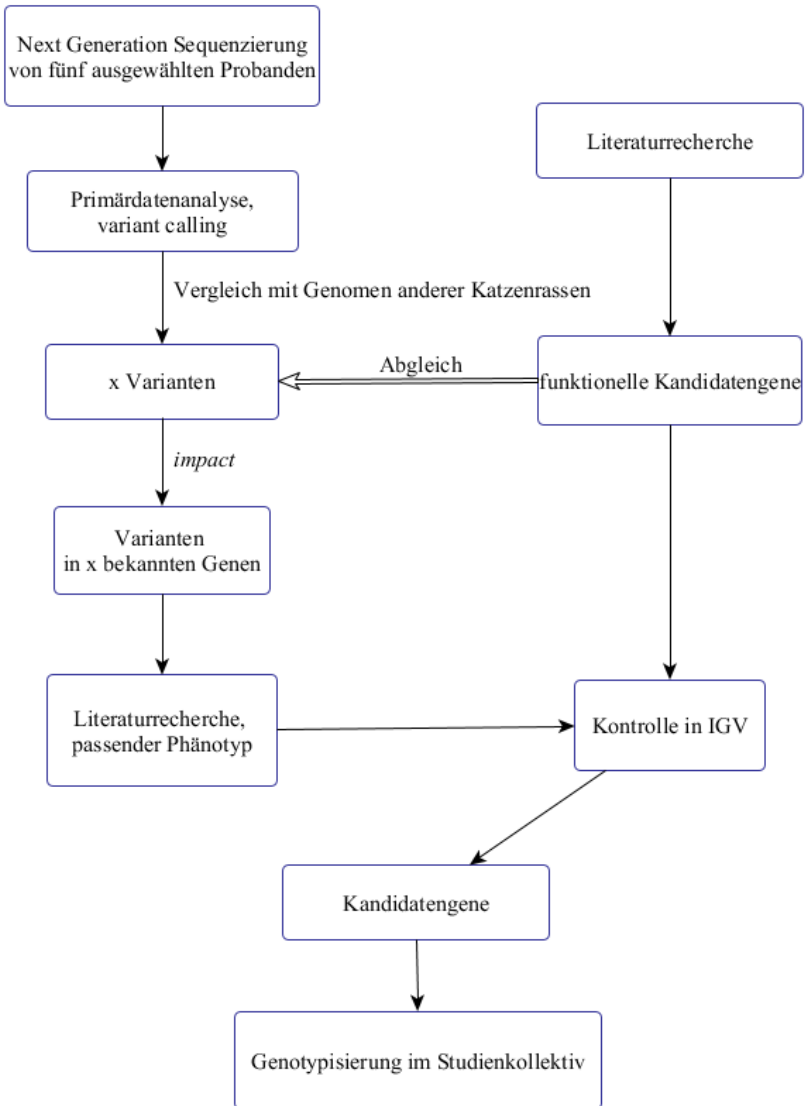


Abbildung 26: Duale Herangehensweise zur Identifizierung der Kandidatengene. Die Ergebnisse der Probanden aus der Genomsequenzierung werden durch die Primärdatenanalyse, das *variant calling* und dem Vergleich mit 15 weiteren Katzengenomen eingegrenzt. Durch Anforderungen an den *impact* der einzelnen SNPs und INDELS können vorläufige Kandidatengene isoliert werden. Diese werden einer Literaturrecherche unterzogen und passende Gene daraufhin in IGV überprüft. Parallel zur NGS erfolgt auch eine anfangs isolierte Literaturrecherche, wobei funktionelle Kandidatengene detektiert wurden. Die Ergebnisse der NGS dieser Gene werden unabhängig von detektierten SNPs und INDELS im Programm IGV untersucht.

### 3.9 Visuelle Auswertung der Genomsequenzen im Bereich von Kandidatengen

Die im Zuge der Datenauswertung erstellten bam-Dateien wurden zudem mit dem Programm Integrative Genomics Viewer (IGV)\_2.5.3 (Thorvaldsdóttir *et al.* 2013) visualisiert und ausgewertet. IGV ermöglicht es, die gemappten Sequenzierdaten untereinander und mit dem Referenzgenom (*Felis\_catus\_9.0*) zu vergleichen. Dabei werden die einzelnen *reads* angezeigt, was wiederum eine Abschätzung der Sequenzierqualität innerhalb eines bestimmten Sequenzabschnittes ermöglicht (Thorvaldsdóttir *et al.* 2013). Das *variant calling* innerhalb von Sequenzierbereichen mit einer höheren Anzahl an *reads* ist als qualitativ hochwertiger zu betrachten als in Bereichen mit einer niedrigen *coverage*. Liegen die detektierten SNPs inmitten der *reads*, ist die Gefahr von falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen geringer, da die Sequenzierqualität zum 3' Ende der *reads* abnimmt (Abbildung 27). Eingeschlossen in die Auswertung wurden alle SNPs und INDELS, welche Exons der Kandidatengene betreffen und in mindestens 30 % der *reads* an der jeweiligen Position eine Variante aufwiesen.

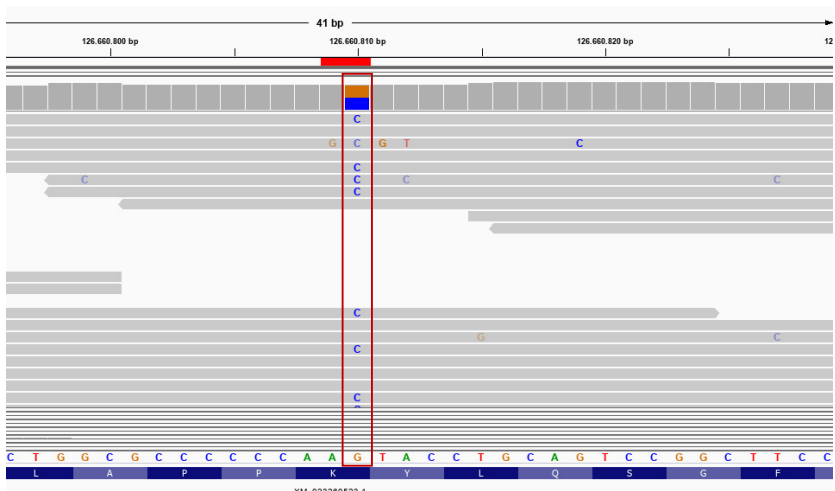


Abbildung 27: beispielhafte Darstellung eines heterozygoten SNPs eines Individuums in IGV. Das Bildschirmaufnahme beinhaltet verschiedene Tracks. Von oben nach unten sind dies eine Positionsangabe, ein *coverage* Track, eine Darstellung der einzelnen ca. 120 bp langen *reads*, die Referenzsequenz sowie eine Übersetzung in die korrespondierenden Aminosäuren. Positionen, die systematisch von der Referenzsequenz abweichen, werden im *coverage* Track farblich hervorgehoben. Der Anteil der Farbgebung entspricht dabei der prozentualen Verteilung der Abweichung von der Referenzsequenz. In diesem Fall stimmen ca. 50 % der *reads* mit dem Guanin (G, braun) der Referenzsequenz überein und 50 % der *reads* weisen ein Cytosin (C, blau) auf.

### 3.10 Sanger-Sequenzierung von Kandidatengen-Bereichen

Zur Genotypisierung von Varianten in den Genen *CNTN6* und *FOXL2* wurden die entsprechenden Genbereiche mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt und im Anschluss mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert.

#### 3.10.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Primer der jeweiligen Genabschnitte wurden über die Internetplattform Primer 3 generiert. Die jeweiligen Primersequenzen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode, bestimmte Nucleinsäuren exponentiell zu vervielfältigen und *in vitro* nachzuweisen. Bei der PCR kann man insgesamt drei Phasen unterscheiden. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Abschnitte, welche die DNA-Doppelhelix zusammenhalten, durch eine Erhitzung des Ansatzes getrennt, sodass die DNA am Ende der ersten Phase in Einzelsträngen vorliegt. In der nächsten Phase, dem sogenannten Annealing, kommt es zur Anlagerung der Primer. Bei Primern handelt es sich um spezifische Oligonucleotide, welche den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Zur korrekten Anlagerung dieser wird je nach Primer eine spezifische Temperatur benötigt, die sich meist zwischen 55 und 65 °C befindet. Im letzten Schritt, der Elongation, werden durch die DNA-Polymerase die dem Ansatz beigemischten freien Nucleotide entlang der DNA angelagert und zu einem komplementären Strang verknüpft. Die Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt, um im Endeffekt die gewünschten DNA-Abschnitte exponentiell zu amplifizieren (Buselmaier *et al.* 2007).

Die jeweiligen PCR-Ansätze wurden nach den folgenden Protokollen zusammengesetzt (Tabelle 5, Tabelle 7, Tabelle 8). Je Ansatz wurden 3 µl der Test-DNA hinzugefügt. Als DNA-Polymerase wurde die *GoTaq*® Polymerase benutzt. Sie wurde gemeinsam mit dem *GoTaq* Flexi Puffer, den Desoxynucleosid-Triphosphaten (dNTPs), einer für den jeweiligen Ansatz optimierten MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und den jeweiligen Vorwärts-/Rückwärtsprimern, welche eine Konzentration von 10 pmol/µl aufwiesen, zusammengefügt und mit autoklaviertem Wasser auf eine Menge von 50 µl pro Ansatz aufgefüllt. Die jeweiligen Ansätze wurden dann im Thermocycler nach den jeweiligen optimierten Zyklus Parametern inkubiert (Tabelle 4, Tabelle 6).

**Tabelle 3: Verwendete Primersequenzen für die PCR.**

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
<i>FOXL2</i>	1	5'-	5'-
c.588G>C		AACCTCAGCCTCAACGAGTG- 3'	CAGGAGTTGTTGAGGAAGC C-3'
<i>CNTN6</i>	9	5'-	5'-
c.910A>C		ATCCTGCTGTCGTAAAGGCT- 3'	AAGCCTTCATCTTCTCTGTTG A-3'
<i>CNTN6</i>	22	5'-	5'-
c.2992T> C		GTGTCTGGACCTTAAAAGAG CA-3'	AGCGATGGTGATTCAACTT AC T-3'

**Tabelle 4: PCR-Profil zum Nachweis der Variante *FOXL2* c.588G>C.**

Phase	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
<b>I</b>	1	95 °C	1,30 min
<b>II</b>	35	95 °C	0,15 min
		62 °C	0,30 min
		72 °C	0,30 min
<b>III</b>	1	72 °C	5,00 min
<b>IV</b>		20 °C	∞

**Tabelle 5: PCR-Ansatz für die Variante *FOXL2* c.588G>C. Erwartete Produktgröße ca. 300bp, MgCl<sub>2</sub> Konzentration 1mM.**

Material	Mengen in µl
5x GoTaq Flexi Puffer	10
2 mM dNTP	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2
Primer FC_ <i>FOXL2</i> _Ex1_forward (10 pmol/µl)	3
Primer FC_ <i>FOXL2</i> _Ex1_reverse (10 pmol/µl)	3
GoTaq-Polymerase (5 U/µl)	0,3
autoklaviertes Wasser	ad 50
3,0 µl Proben-DNA	3
<b>Gesamt</b>	<b>50</b>

Tabelle 6: PCR-Profil zum Nachweis der Varianten *CNTN6* c.910 A>C und *CNTN6* c.2992 T>C.

Phase	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
<b>I</b>	1	95 °C	1,30 min
<b>II</b>	35	95 °C	0,15 min
		57 °C	0,30 min
		72 °C	0,30 min
<b>III</b>	1	72 °C	5 min
<b>IV</b>		20 °C	∞

Tabelle 7: PCR-Ansatz für die Variante *CNTN6* c910 A>C. Erwartete Produktgröße ca. 200bp, MgCl<sub>2</sub> Konzentration 2mM.

Material	Menge in µl
5x GoTaq Flexi Puffer	10
2 mM dNTP	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4
Primer FC_ <i>CNTN6</i> _In8_forward (10 pmol/µl)	3
Primer FC_ <i>CNTN6</i> _Ex9_reverse (10 pmol/µl)	3
Go Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,3
autoklaviertes Wasser	ad 50
3,0 µl Proben-DNA	3
<b>Gesamt</b>	<b>50</b>

**Tabelle 8: PCR-Ansatz für die Variante *CNTN6* c.2992T >C. Erwartete Produktgröße ca. 300bp, MgCl<sub>2</sub> Konzentration 1mM.**

<b>Material</b>	<b>Mengen in µl</b>
5x GoTaq Flexi Puffer	10
2 mM dNTP	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2
Primer FC_ <i>CNTN6</i> _In22_forward (10pmol/µl)	3
Primer FC_ <i>CNTN6</i> _In23_reverse (10pmol/µl)	3
Go Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,3
autoklaviertes Wasser	<i>ad 50</i>
3,0 µl Proben-DNA	3
<b>Gesamt</b>	<b>50</b>

### 3.10.2 Kontrolle der Amplifikation

Die Kontrolle der Amplifikation wurde mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 1,5 % Agarosegele hergestellt, um die zu erwartenden PCR-Produkte mit der Länge von 200–300 Basenpaare ausreichend gut aufzutrennen. In einem Erlenmeyer Kolben wurden 4,2 g Agarose abgewogen und mit 280 ml 0,5x TBE Puffer versetzt. Die Suspension wurde so lange aufgeköcht, bis die Lösung vollständig klar wurde und dann unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer bis ca. 60 °C abgekühlt. Sobald die 60 °C erreicht waren, wurden der Lösung 14 µl Mindori Green Advanced DNA-Farbstoff als Alternative zu Ethidiumbromid hinzugefügt und alles noch einmal auf dem Magnetrührer vermischt. Als letzter Schritt wurde die gelartige Lösung in den horizontalen Gelschlitten, welcher sich im Gießstand befand, gegossen und der Kamm eingesetzt. Bis das Gel vollständig abgekühlt und polymerisiert war, wurde es in dem Gelschlitten belassen, danach wurde der Kamm entfernt, das Gel aus dem Gießstand entfernt und beladen. Hierfür wurde das vorbereitete 1,5 % Agarose-Gel in eine Elektrophorese-Kammer gelegt und die Kammer mit 0,5x TBE Puffer gefüllt, bis es mit ca. 2 mm Puffer bedeckt war. Je 5 µl der PCR-Produkte wurden mit 2 µl Loading dye, welcher die drei DNA-Farbstoffe Bromphenolblau, Xylenanol und Orange G enthielt, gemischt und dann damit jeweils die Kammern geladen. Bei einer angelegten Spannung von 160 V wurden die PCR-Produkte dann für ca. 60 min elektrophoretisch ihrer Länge nach aufgetrennt. Aufgrund der negativen Gesamtladung der PCR-Produkte, die durch die Phosphatreste bedingt ist, wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld von der Kathode

zur Anode. Anschließend wurden durch das Interkalieren des DNA-Farbstoffs mit der DNA die PCR-Banden unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Hatte sich eine Bande im Bereich der erwarteten Basenlänge 200–300 bp gebildet, wurde die PCR als erfolgreich angesehen. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert.

### **3.10.3 Reinigung der PCR-Produkte**

Zur Sequenzierung mussten die PCR-Produkte frei von Reaktionspuffern, überschüssigen Nucleotiden und Primern sein. Um dies zu erreichen, wurde die Reinigung der PCR-Produkte mit dem stratec molecular Invisorb® Fragment cleanUp Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde in den Auffangröhrchen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

### **3.10.4 Vorbereitungen der PCR Produkte für die Sanger-Sequenzierung**

Die Konzentration der PCR-Produkte wurde mittels NanoDrop™ Mikrovolumen Spektralphotometer bestimmt. Nach der Referenzmessung mit reinem Wasser wurde eine weitere Referenzmessung mit dem Elutionspuffer aus der Reinigung der PCR-Produkte durchgeführt. Danach folgte die Messung der DNA aus der jeweiligen PCR. Hierfür wurden 1–2 µl der PCR-Produkte auf die Messlinse pipettiert und die Messung gestartet. Die Konzentrationen der DNA wurden notiert.

Um optimale Bedingungen für die Sanger-Sequenzierungen zu schaffen, wurden die DNA-Konzentrationen auf einheitliche 10 ng/µl verdünnt. Zur Verdünnung wurde autoklaviertes Wasser genutzt. Außerdem wurden je 2 µl des jeweiligen 10 M Primers (Tabelle 9) zugegeben. Das Endvolumen pro Probe betrug 14 µl.

### **3.10.5 Automatische Sequenzierung mittels Sanger, Genotypisierung der Varianten**

Für die Sequenzierung der Varianten wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Primer verwendet.

**Tabelle 9: Verwendete Primer-Sequenzen für die Sanger-Sequenzierung.**

<b>Gen</b>	<b>Exon</b>	<b>Primer</b>
<i>CNTN6</i>	Exon 9	5'-ATCCTGCTGTCGTAAAGGCT-3'
<i>CNTN6</i>	Exon 22	5'-GTGTCTGGACTTAAAAGAGCA-3'
<i>FOXL2</i>	Exon 1	5'-AACCTCAGCCTCAACGAGTG-3'

Die Sequenzierung der 54 Katzenproben wurde durch die Firma LGC sequencing services, Biosearch Technologies, Berlin über den Standard Ready2 Run durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine Sanger-Sequenzierung.

Bei der Sanger-Sequenzierung, die auch Kettenabbruch-Synthese genannt wird, werden neben den normalen dNTPs auch Didesoxynukleosidtriphosphate, also ddNTPs eingesetzt. Diese ddNTPs sind zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und führen nach dem Einbau durch die DNA-Polymerase zum Kettenabbruch des neu sequenzierten Stranges. Außerdem wird nur ein Primer eingesetzt, sodass der gewünschte DNA-Abschnitt nur in eine Richtung amplifiziert wird. Die dadurch entstehenden, unterschiedlich langen PCR-Produkte, werden durch eine Kapillarelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und mittels Laser zur Fluoreszenz angeregt. Dadurch wird die Basenabfolge des sequenzierten Stranges sichtbar und kann durch einen Detektor abgelesen werden (Murken *et al.* 2006).

### **3.11 Computergestützte Datenauswertung**

#### **3.11.1 Auswertung von Chromatogrammen**

Mit den Ergebnissen aus der Sanger-Sequenzierung der je 54 Katzenproben wurde mit dem Programm ChromasPro Version 2.1.8 ein Alignment mit der Referenzsequenz *Felis\_catus\_9.0* (GCF\_000181335.3) durchgeführt (Abbildung 28).



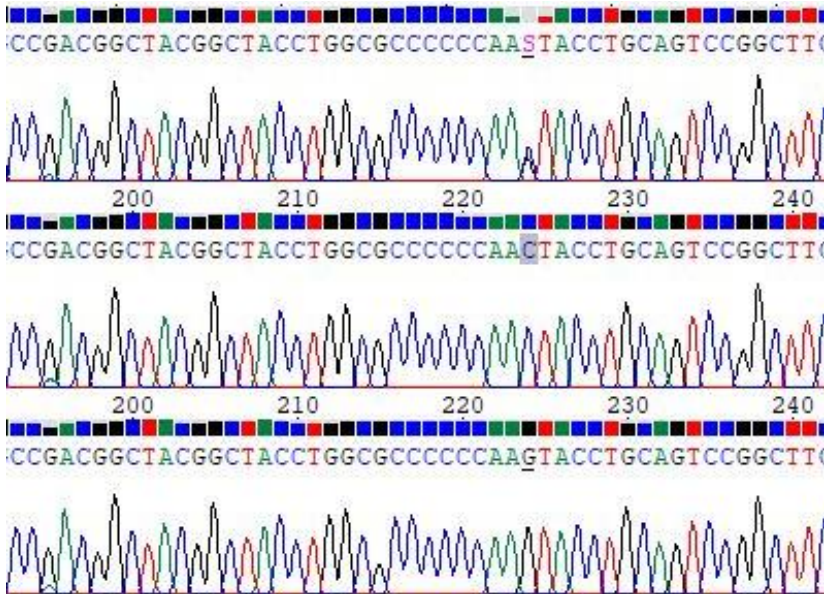


Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung eines Alignments der Sequenzierungsergebnisse von drei Individuen mit Hilfe des Programms ChromasPro. Das Bildschirmfoto beinhaltet, aufgetragen von oben nach unten, die Sequenzierungsergebnisse von drei Individuen. Dabei ist pro Individuum ein Säulen- und ein Wellendiagramm abgebildet. Den einzelnen Basen sind verschiedene Farben zugeordnet. Heterozygote Positionen sind mit zwei halbhohe sich überlappenden Wellenbergen dargestellt. Für die Angabe der Basen wird der IUPAC-Nukleotid-Code verwendet.

### 3.11.2 Konservierungsgrad der Proteine

Zur Erhebung des Konservierungsgrades innerhalb der Regionen des jeweiligen Aminosäureaustausches wurde mit Hilfe der Constraint-based Multiple Alignment Tools der online Plattform NCBI (Papadopoulos *et al.* 2007) ein Alignment der Proteinsequenzen der untersuchten Proteine verschiedener Spezies durchgeführt. Als Referenzgenome wurden zum einen nahe Verwandte der Hauskatze, wie der Leopard und der Hund, zum anderen aber auch phylogenetisch sehr ferne Arten wie das Haushuhn, eine Schildkrötenart, sowie das Schnabeltier verwendet. Insgesamt wurde ein Alignment von zwölf Arten (Hauskatze, Leopard, Fuchs oder Gepard, Haushund, Pferd, Kuh, Mensch, Wanderratte, Maus, Schnabeltier, westliche Zierschildkröte und Haushuhn) durchgeführt.

### 3.11.3 Statistische Auswertung durch das kommerzielle Statistikprogramm SPSS

Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 20. Für die allgemeine Datenbeschreibung wurden vom Alter, Gewicht und kranialen Index der Probanden die arithmetischen Mittelwerte, Maximal- und Minimalwerte, sowie die Standardabweichungen berechnet. Durch das Programm wurden die Daten des kranialen Index auf Normalverteilung überprüft. Hierfür wurde, wegen seiner erhöhten statistischen Power gegenüber dem Kolmogorow-Smirnow-Test, der Shapiro Wilk Test und ein Q-Q Diagramm gewählt (Shapiro *et al.* 1965). Für die Untersuchung des Zusammenhangs der Variablen im *CNTN6*- und *FOXL2*-Gens und dem kranialen Index wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman herangezogen. Für die Analyse des Zusammenhangs zwischen kranialem Index und dem Auftreten eines *Hydrocephalus internus* wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zur Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede im Auftreten der Varianten *CNTN6* c.910A>C, *CNTN6* c.2992T>C und *FOXL2* c.588G>C in Abhängigkeit zum kranialen Index wurde eine einfaktorische *analysis of variance* (ANOVA) durchgeführt. Die einfaktorische ANOVA, auch einfaktorische Varianzanalyse genannt, ähnelt dem t-Test, lässt allerdings den Vergleich mit mehr als zwei Gruppen zu. Im Anschluss erfolgte eine Kontrastanalyse, um zu prüfen, zwischen welchen Gruppen eine statistisch signifikante Differenz auftritt. Die einfaktorische ANOVA setzt eine Normalverteilung sowie Varianzhomogenität voraus. Konnte die Varianzgleichheit nicht erfüllt werden, wie dies beim kombinierten Vergleich der Varianten der Fall war, wurde die demgegenüber robuste Welch ANOVA angewendet (Schmider *et al.* 2010; Lix *et al.* 1996). Als Gruppeneinteilung wurden die Ergebnisse der Genotypisierung benutzt, daher ergab sich pro Gen eine Gruppengröße von drei (Wildtyp, heterozygot, homozygot), für die kombinierten Vergleiche eine von fünf (Tabelle 18). Inwieweit die Faktoren Variable *CNTN6*, Variable *FOXL2*, Kranialer Index und Geschlecht Einfluss auf die Entwicklung eines *Hydrocephalus internus* haben, wurde mit der binär logistischen Regression berechnet. Sie ist eine Form der multiplen Regression, bei welcher die abhängige Variable (*Hydrocephalus internus*) dichotom ist. Mit Hilfe der binomialen Regression wurde überprüft, ob sich die oben genannten Variablen dazu eignen, eine Vorhersage zu treffen, ob die Tiere statistisch wahrscheinlicher an einem *Hydrocephalus internus* erkranken. Außerdem wurde eine *Odds* berechnet, welche die Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis eintritt, angibt.

Für die Auswertung der statistischen Ergebnisse wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt, was bedeutet, dass für die Annahme als statistisch signifikantes Ergebnis die Bedingung  $p < \alpha$  und demnach  $p < 0,05$  erfüllt sein musste.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientendaten im Studienkollektiv

54 Perserkatzen erfüllten die Kriterien der Studie. Bei ihnen wurde der kraniale Index bestimmt und genetische Untersuchungen durchgeführt. 24 waren männlich, 30 weiblich. Das durchschnittliche Alter belief sich auf 3,8 Jahre wobei das jüngste Tier 4 Wochen und die älteste Perserkatze 18 Jahre alt war ( $SD = 4,41$ ). Das Gewicht der Tiere lag zwischen 0,3 kg und 6,2 kg ( $M = 3,00$  kg,  $SD = 1,18$ ). Die Einzeltierdaten finden sich im Anhang in Tabelle 23.

### 4.2 Kranialer Index der untersuchten Perserkatzen

Der kraniale Index lag im Mittel bei 91,82 ( $SD = 14,19$ ) mit einem Minimalwert von 62,00 und einem Maximum von 123,00. Sechs Perserkatzen wiesen einen kranialen Index von unter 70,00 auf und wurden somit den *doll-face* Perserkatzen zugeordnet. Im Mittel zeigten sie einen kranialen Index von 67,02 ( $SD = 2,74$ ). Dabei wurden Werte zwischen 62,00 und 69,88 gemessen. In diese Gruppe fielen vier männliche und zwei weibliche Tiere. Sieben Katzen, darunter zwei männliche und fünf weibliche, fielen mit Messungen zwischen 71,19 und 82,00 in die Gruppe der moderat brachyzephalen Tiere ( $M = 76,83$ ,  $SD = 3,76$ ). 41 Individuen hatten Messwerte zwischen 85,41 und 123,00 und wurden der *peke-face* Gruppe zugeordnet ( $M = 98,00$ ,  $SD = 9,65$ ). 18 Tiere dieser Gruppe waren männlich, 23 weiblich (Abbildung 29).

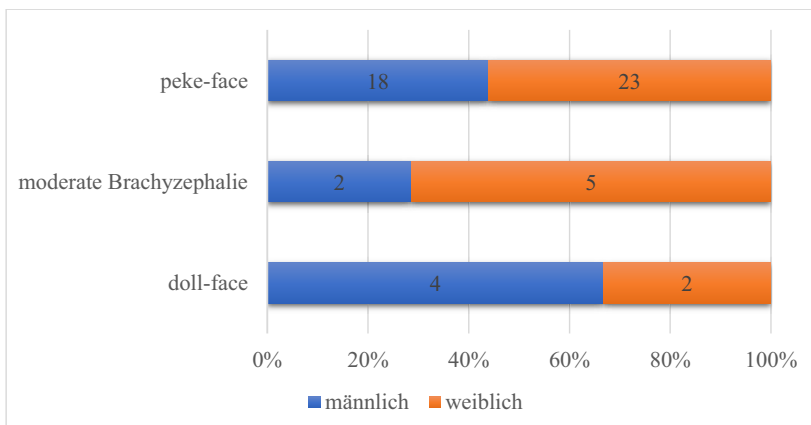


Abbildung 29: Absolute und relative Häufigkeit der Geschlechtsverteilung in Abhängigkeit vom kranialen Index.

### 4.3 Auftreten eines *Hydrocephalus internus* innerhalb der Studiengruppe

Bei 41 Tieren lag zusätzlich zu den oben genannten ein Befund über das Vorliegen eines *Hydrocephalus internus* vor. Diese Diagnose wurde von Prof. Dr. med. vet. Martin Schmidt (Dipl. ECVN) anhand der angefertigten MRT-Scans gestellt und retrospektiv in die Studie einbezogen.

Von diesen 41 Perserkatzen waren 19 männlich und 22 weiblich. Achtzehn Perserkatzen wiesen die krankhafte Erweiterung der Ventrikel auf, 23 waren in Bezug auf dieses Merkmal gesund. Die genaue Geschlechtsverteilung ist der Abbildung 30 zu entnehmen. Die Tiere waren im Mittel 3,26 Jahre alt, das jüngste Tier war 4 Wochen, das älteste 18 Jahre alt (SD = 4,15). Das Gewicht der Probanden lag zwischen 0,3 kg und 5,4 kg (M = 2,83, SD = 1,20). Die Messwerte des kranialen Index beliefen sich zwischen 62,00 und 123,00 (M = 91,17, SD = 15,70). Die negativ auf den *Hydrocephalus internus* getesteten Tiere waren zwischen 0,5 und 14 Jahren alt (M = 3,48, SD= 3,76) und wogen 1,8 bis 4,4 kg (M = 2,95, SD = 0,70). Der kraniale Index der nicht vom *Hydrocephalus internus* betroffenen Tiere lag im Mittel bei 81,69 (SD = 11,99). Die auf das Merkmal positiv getesteten Tiere waren zwischen einem Monat und 18 Jahren alt (M = 2,97, SD = 4,70) und wogen 0,3–5,4 kg (M = 2,68, SD = 1,65). Bei den an einem *Hydrocephalus internus* erkrankten Tieren wies der kraniale Index einen Mittelwert von 103,28 und eine Standardabweichung von 10,82 auf.

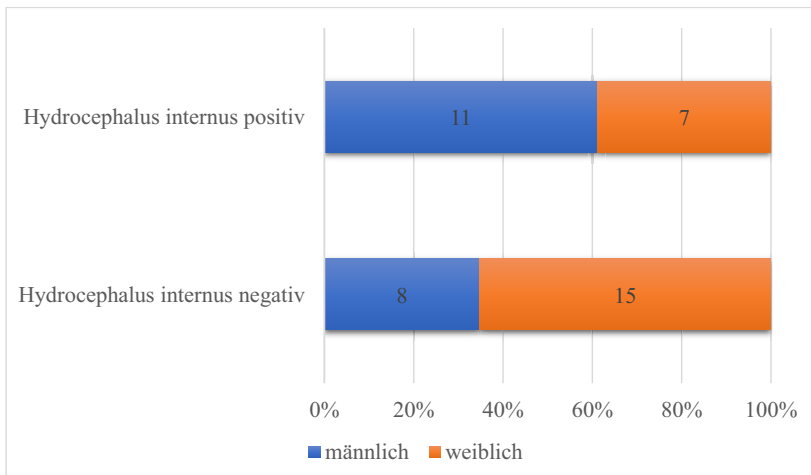


Abbildung 30: Absolute und relative Häufigkeit der Geschlechtsverteilung in Abhängigkeit zur Diagnose *Hydrocephalus internus*.

#### 4.4 Stammbaumrekonstruktion des Studienkollektivs

Zu Beginn der Studie wurde ein Stammbaum der Perserkatzen aus der gemeinsamen Zucht angefertigt. Nach Überprüfung der Daten konnte für insgesamt 23 der 54 Katzenproben ein familiärer Zusammenhang hergestellt werden. Der Stammbaum ist in Abbildung 31 dargestellt. Die jeweilige Datenlage zu den Individuen ist farblich hervorgehoben. Bei den meisten Tieren handelt es sich aufgrund ihrer kranialen Indices um Vertreter der *peke-face* Perserkatzen, lediglich der grün gekennzeichnete Kater fällt mit einem kranialen Index von 76,79 nicht eindeutig in die Gruppe der *peke-face* Katzen (*cut off* Wert min. 83,00). Der gleiche Stammbaum wie bereits in Abbildung 31 wird in Abbildung 32 mit den Daten zur Morphologie der Hirnventrikel dargestellt.

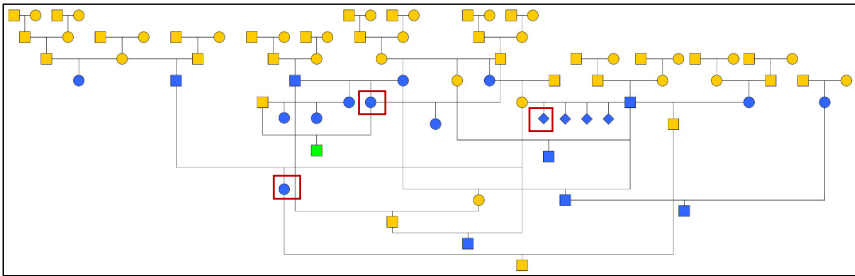


Abbildung 31: Stammbaum von 23 Perserkatzen aus einer gemeinsamen Zucht. Bei den blau markierten Tieren liegen MRT-Scans und EDTA-Blutproben vor und es handelt sich um *peke-face* Perser. Die Symbole der Tiere, bei welchen weder DNA-Proben noch MRT-Aufnahmen vorliegen, sind gelb eingefärbt. Der mit einem grünen Quadrat gekennzeichnete Kater fällt in die Gruppe der Katzen mit moderater Brachycephalie. Rot umrandet sind Individuen, deren Genom mittels NGS sequenziert wurde. Die vier in Rautenform gekennzeichneten Vollgeschwister symbolisieren die Kitten, bei welchen Schmidt et al. (2017) eine koronale Kraniosynostose diagnostizieren konnten.

□ männliches Tier      ○ weibliches Tier      ◇ Geschlecht unbekannt

## Ergebnisse

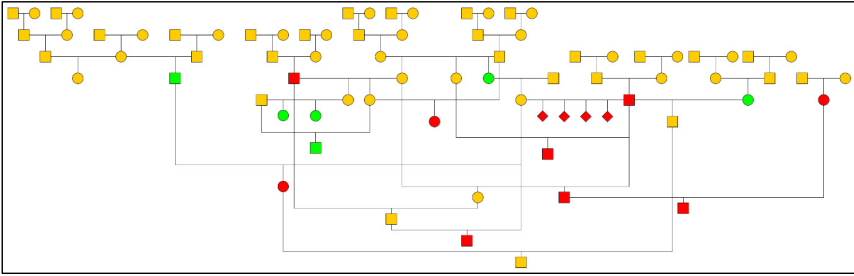


Abbildung 32: Stammbaum der an einem Hydrozephalus erkrankten Tiere und ihrer gesunden Verwandten. Mit Abbildung 31 identischer Stammbaum, wobei hier die an einem *Hydrocephalus internus* erkrankten Individuen in Rot, Tiere mit normalen Hirnventrikeln in Grün gekennzeichnet sind. Bei den in der Farbe Gelb markierten Individuen liegt kein MRT oder kein eindeutiger Befund (Ventrikulomegalie) vor. Die vier in Rautenform gekennzeichneten Vollgeschwister symbolisieren die Kitten, bei welchen Schmidt et al. (2017) eine koronale Kraniosynostose diagnostizieren konnten.

□ männliches Tier      ○ weibliches Tier      ◇ Geschlecht unbekannt

### 4.5 Gesamtgenom-Analyse und Identifikation potenziell kausaler Varianten

Zur Untersuchung der genetischen Grundlagen der koronalen Kraniosynostose der Perserkatze, erfolgte eine Gesamtgenomsequenzierung (*whole genome sequencing*) mit anschließender Variantendetektion (*variant calling*) von drei *peke-face* Perserkatzen, einer Perserkatze mit moderater Brachycephalie sowie einer *doll-face* Perserkatze.

Nach dem *variant calling* und der funktionellen Annotation erfolgte der Abgleich der SNPs und INDELs mit den Genomen 15 weiterer Katzen welche anderen Rassen angehörten, um die Vielzahl an detektierten Varianten einzugrenzen. Die Bedingung, dass sie ausschließlich bei den fünf sequenzierten Perserkatzen auftraten, nicht aber bei den 15 Katzen der anderen Rassen oder dem Referenzgenom *Felis\_catus\_9.0* (GCF\_000181335.3), erfüllten 124.668 Varianten. Diese konnten durch einen geforderten *impact* von mindestens moderat bis hoch auf SNPs und INDELs in 72 bekannten Genen eingegrenzt werden. Eine Liste dieser 72 Gene und ihrer Varianten befindet sich im Anhang (Tabelle 22). Eine weitere Suche nach Kandidatengenen über die Literaturrecherche erfolgte parallel zur NGS. Die Ergebnisse dieser wurden, ebenso wie die Kandidatengene, welche sich aus der Sequenzierung ergaben, mit Hilfe des Programmes Integrative Genomics Viewer (IGV) graphisch überprüft (Abbildung 26).

## Ergebnisse

Dies war nötig, um eine Fehleinschätzung durch die getroffenen Einstellungen (Anforderung an den *impact*), Sequenzierfehler, eine ausreichende *coverage*, oder die Limitierung des Programmes GATK HaplotypeCaller, Strukturvarianten zu erkennen, auszuschließen. Insgesamt wurden 16 potenzielle Kandidatengene spezifisch mittels IGV untersucht. Diese 16 Gene sind in Tabelle 10 aufgeführt. Dabei ist zu bemerken, dass die Liste der Kandidatengene sehr heterogen ausfällt. Dennoch lassen sie sich in vier verschiedene Gruppen einteilen. Bei Gruppe eins handelt es sich um Gene, die beim Menschen bekannterweise eine Kraniosynostose begünstigen oder auslösen. In Gruppe zwei fallen Gene, die bei Hund und Katze bei der Entstehung der Brachycephalie beteiligt sind. Gruppe drei spiegelt zwei Gene wieder, die insbesondere bei der Perserkatze als Kandidatengene für die Brachycephalie gelten (Bertolini *et al.* 2016). In Gruppe vier fällt ein Gen, welches in der Literaturrecherche durch einen entsprechenden Phänotyp mit einer koronalen und sagittalen Kraniosynostose bei der Maus auffiel (Marongiu *et al.* 2015).

**Tabelle 10: Mittels IGV überprüfte Kandidatengene.**

	<b>Kandidatengene (siehe 2.5 und 2.6)</b>	<b>Gene</b>
1	Bekannte Gene für die Entstehung einer Kraniosynostose beim Menschen	<i>FGFR1, FGFR2, FGFR3, IHH, MSX2, RAB23, RUNX2, TCF12, TWIST1, ZIC1</i>
2	Bekannte Gene für die Brachycephalie bei Hund und Katze	<i>ALX1, BMP3, SMOC2</i>
3	Kandidatengene für die Schädelform der Perserkatze	<i>CHL1, CNTN6</i>
4	Brachycephalie und Kraniosynostose bei der Maus	<i>FOXL2</i>

## Ergebnisse

Nach der Auswertung mit IGV stellte sich heraus, dass keines der in der Humanmedizin relevanten Gene aus Gruppe 1 (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *IHH*, *MSX2*, *RAB23*, *RUNX2*, *TCF12*, *TWIST1*, *ZIC1*) bei den fünf genomsequenzierten Katzen eine Mutation mit vorhersagbarer funktioneller Relevanz aufwies. Ebenso verhielt es sich mit den Genen aus Gruppe 2 (*ALX1*, *BMP3*, *SMOC2*), welche die beteiligten Gene der Brachycephalie von Hund und Katze enthielten. Von den zwei von Bertolini *et al.* (2016) in seiner Arbeit als Kandidatengene für die Kurzköpfigkeit der Perserkatze genannten Gene (Gruppe 3: *CHLI*, *CNTN6*) zeigte allerdings das Gen *CNTN6* zwei SNPs, die einen Aminosäureaustausch zur Folge haben. Auch im *FOXL2*-Gen (Gruppe 4) konnte eine solche Mutation nachgewiesen werden.

Die drei Mutationen, welche nach der Kontrolle mit IGV als mögliche Ursache der Kraniosynostose identifiziert wurden, werden in Tabelle 11 aufgeführt. In Abbildung 33 ist als Beispiel der SNP des *CNTN6*-Gens dargestellt. Dabei sind die Ergebnisse der NGS der fünf Perserkatzenprobanden untereinander aufgetragen. Zur besseren Übersicht sind dabei nicht die einzelnen *reads* wie in Abbildung 27, sondern nur der *coverage*-Track zu sehen. Bei Probe K515 (Zeile eins) liegt in 100 % der *reads* ein Basenaustausch von Adenin zu Cytosin vor, ebenso bei Probe K529, dargestellt in Zeile drei. Die in Zeile zwei aufgezeigten Ergebnisse von Probe K528 zeigen eine heterozygote Variante, die ausgelesenen *reads* tragen an dieser Position zu ca. 50 % ein Adenin und zu ca. 50 % ein Cytosin. Die in den zwei unteren Spalten dargestellten Proben stimmen mit der Referenzsequenz überein (gekennzeichnet mit Pfeil und *Sequence*) und sind farblich daher nicht hervorgehoben.

**Tabelle 11: Überblick über die Kandidatengene mit entsprechender Mutation und Aminosäure-Austausch.**

<b>Chromosom</b>	<b>Position</b>	<b>Gen</b>	<b>Exon</b>	<b>Mutation</b>	<b>Aminosäureaustausch</b>
A2	43281469	<i>CNTN6</i>	9	c.910A>C	p. Lys304Gln
A2	43363296	<i>CNTN6</i>	22	c.2992T>C	p.Phe998Leu
C2	126660810	<i>FOXL2</i>	1	c.588G>C	p.Lys196Asn



## Ergebnisse

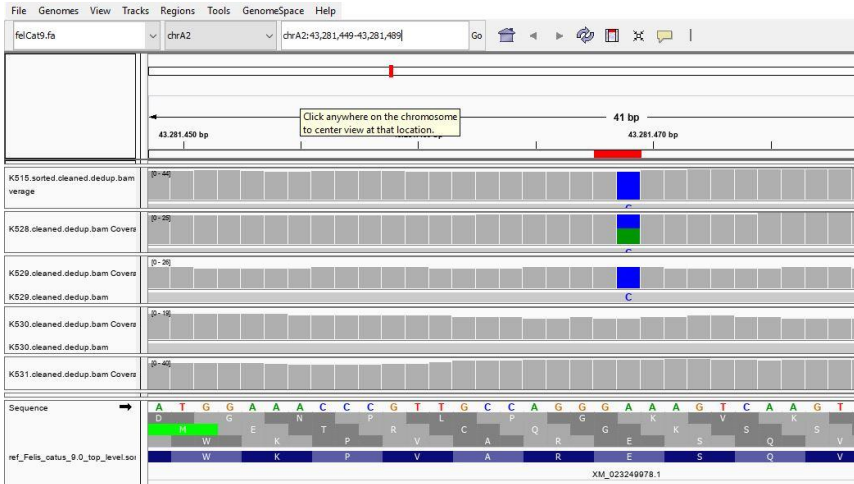


Abbildung 33: Bildschirmfoto des SNP im *CNTN6*-Gen des 43281469 Basenpaars (Chromosom A2) dargestellt im Programm IGV. Die Ergebnisse der Tiere sind untereinander aufgetragen. Es werden nicht die einzelnen *reads* sondern nur der *coverage* Track angezeigt. Katze eins und drei tragen den Basenaustausch im homozygoten (einfarbiger Balken), Tier zwei im heterozygoten Zustand (zweifarbiger Balken). Tier vier und fünf entsprechen der Referenzsequenz.

Bei der Missense-Mutation im *CNTN6*-Gen Exon 9 c.910A>C wurde bei den Probanden an dieser Position eine *coverage* von 12–38 erzielt und lag bei 60 % über der angestrebten *coverage* von 20. Eine weitere Missense-Mutation fand sich im *CNTN6*-Gen Exon 22 c.2992T>C. Hier wurde bei den Probanden eine *coverage* von 12–31 erzielt. Sie lag bei 80 % der Probanden über 20. Zwei Tiere entsprechen dem Referenzgenom, eines ist heterozygoter und zwei sind homozygote Träger der untersuchten Varianten im *CNTN6*-Gen. Die Heterozygotie war in IGV bei Proband 4 an der Position c.2992T>C nicht erkennbar (Abbildung 40 C), bestätigte sich dann aber in der Sanger-Sequenzierung (Abbildung 39). Bei dem Basenaustausch im *FOXL2*-Gen Exon 1 c.588G>C wurde bei den einzelnen Probanden eine *coverage* von 17–34 erzielt, diese lag bei 60 % der Tiere bei 20 oder höher. Vier Tiere sind heterozygote Träger der Variante, ein Tier entspricht dem Referenzgenom.

Im nächsten Schritt wurde das Auftreten der SNPs mit dem Phänotyp der fünf genomsequenzierten Katzen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 aufgeführt.

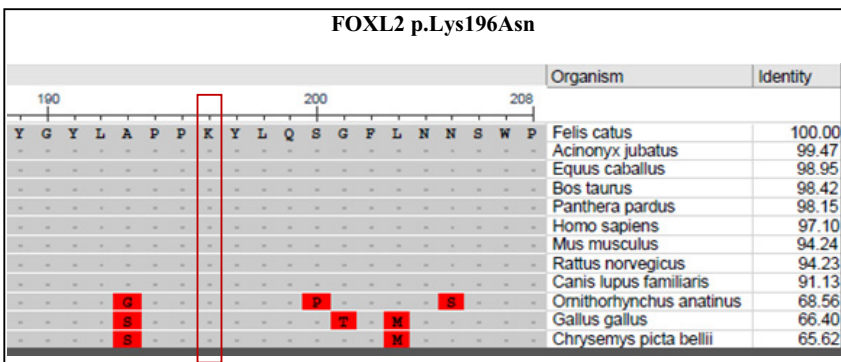
## Ergebnisse

**Tabelle 12: Überblick über Phänotyp und Genotyp der fünf genomsequenzierten Tiere, aufsteigend anhand des Werts des kranialen Index. 0/0: Sequenz entspricht dem Wildtyp, 0/1: heterozygoter Träger der Mutation, 1/1: homozygoter Träger der Mutation.**

	Kranialer Index	<i>Hydrocephalus internus</i>	<i>CNTN6</i>		<i>FOXL2</i>
			c.910A>C	c.2992T>C	c.588G>C
1	68,05	Nein	0/0	0/0	0/0
2	87,22	Nein	0/0	0/0	0/1
3	94,68	Ja	1/1	1/1	0/1
4	96,00	Ventrikulomegalie	0/1	0/1	0/1
5	120,39	Ja	1/1	1/1	0/1

### 4.6 Phylogenetischer Konservierungsgrad der Proteine CNTN6 und FOXL2

Der Konservierungsgrad der Proteine FOXL2 und CNTN6 an den durch den Aminosäureaustausch betroffenen Positionen sind in Abbildung 34 sowie Abbildung 35 abgebildet. Dabei zeigt sich, dass die Aminosäuren an den untersuchten Positionen über die verschiedenen Spezies hinweg identisch sind und demnach an allen Positionen ein hoher Konservierungsgrad vorliegt.



**Abbildung 34: Konservierungsgrad des FOXL2-Proteins um den Aminosäureaustausch Lys196Asn. Die Position des Austausches ist rot umrandet. Aminosäuren, die mit der Referenz (hier: Felis catus) übereinstimmen, sind mit einem Punkt markiert.**

## Ergebnisse

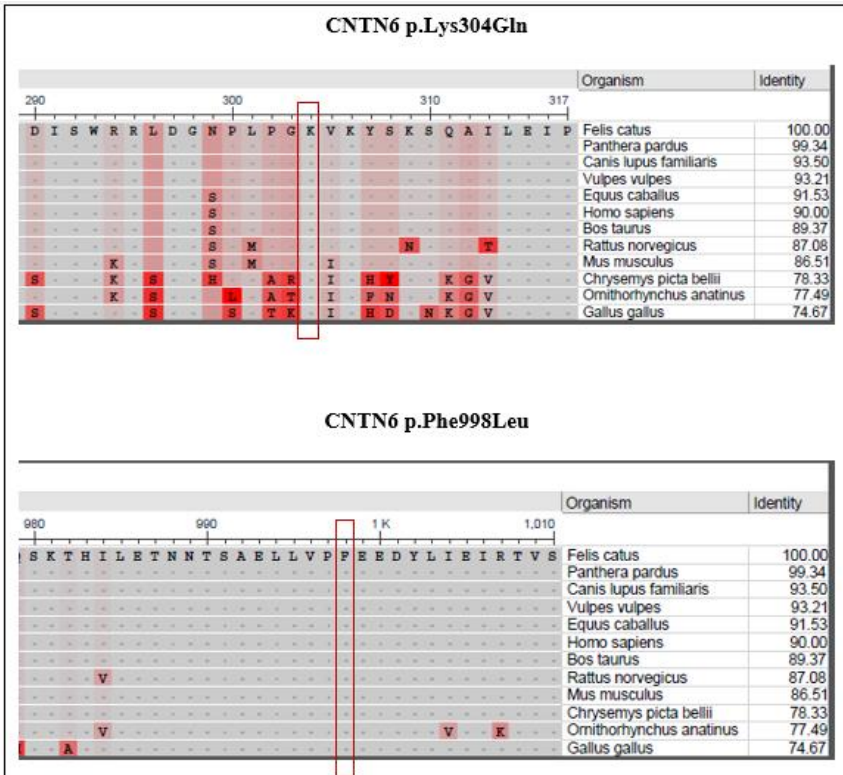


Abbildung 35: Konservierungsgrad des CNTN6-Proteins um die vom Aminosäureaustausch Lys304Gln und Phe998Leu betroffenen Positionen. Der Austausch ist jeweils rot umrandet. Aminosäuren, die mit der Referenz (hier: *Felis catus*) übereinstimmen, sind mit einem Punkt markiert.

### 4.7 Genotypisierung der Varianten der Gene *CNTN6* und *FOXL2* im Studienkollektiv

Die drei Mutationen innerhalb der zwei Gene *CNTN6* und *FOXL2* wurden mittels Sanger-Sequenzierung im Patientenkollektiv der 54 Perserkatzen genotypisiert. Anschließend erfolgte ein Alignment der Sequenzen mit dem Programm ChromasPro. In Abbildung 36 ist als Beispiel ein Ausschnitt des Alignments des SNPs c.588G>C in *FOXL2*-Gen, Exon 1 dargestellt. Es wurden drei verschiedene Genotypen detektiert: homozygot G (Wildtyp), homozygot C und heterozygot G/C.

Tabelle 13: Überblick über die genotypisierten Varianten.

Chromosom	Position	Gen	Exon	Basenaustausch
A2	43281469	<i>CNTN6</i>	Exon 9	A zu C
A2	43363296	<i>CNTN6</i>	Exon 22	T zu C
C2	126660810	<i>FOXL2</i>	Exon 1	G zu C

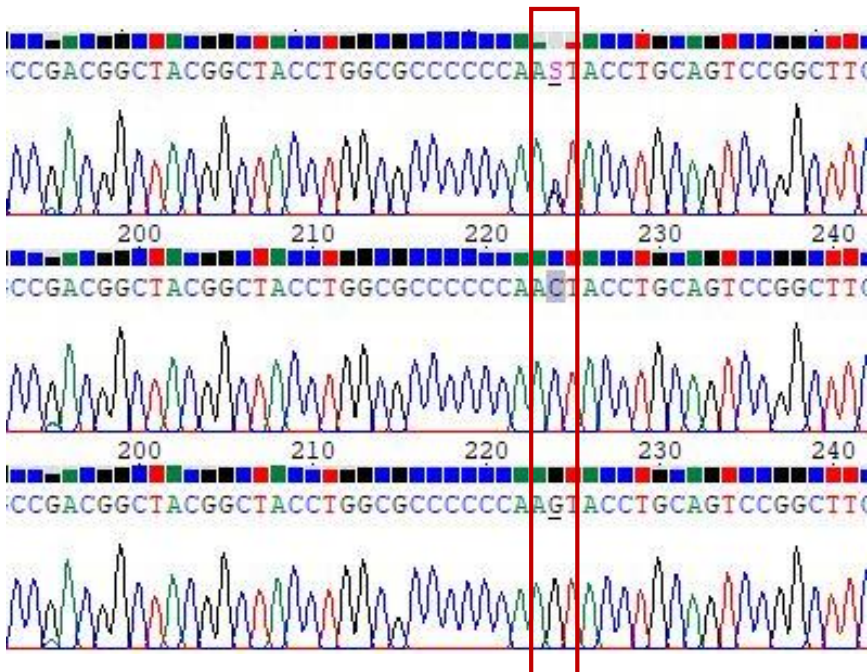


Abbildung 36: Ausschnitt aus dem Alignment *FOXL2* c.588G>C. Die Basenabfolge und das darunter folgende Chromatogramm gehören jeweils zu einer Probe. In der ersten Reihe handelt es sich um einen heterozygoten Träger für den Basenaustausch G (Wildtyp) zu C. In der Reihe der Basenabfolge ist dies mit einem S (IUPAC-Code) und in der Grafik durch zwei überlappende Wellenberge mit nur halber Höhe der angrenzenden Wellen dargestellt. Darunter befindet sich ein homozygoter Träger für den Basenaustausch zu C und in der letzten Reihe ein homozygoter Träger der Base G (Wildtyp).

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der 54 Katzenproben sind in Tabelle 14 abgebildet.

**Tabelle 14: Übersicht über die Sanger-Sequenzierungsergebnisse der einzelnen Perserkatzen aufsteigend nach dem Wert des kranialen Index. 0/0: Sequenz entspricht dem Wildtyp, 0/1: heterozygoter Träger der Mutation, 1/1: homozygoter Träger der Mutation. Die Schwellenwerte des kranialen Index bei 70 und 83 sind durch eine Trennlinie hervorgehoben.**

<b>Proband</b>	<b>kranialer Index</b>	<b><i>CNTN6</i> c.910A&gt;C</b>	<b><i>CNTN6</i> c.2992T&gt;C</b>	<b><i>FOXL2</i> c.588G&gt;C</b>
1	62,00	0/0	0/0	0/0
2	66,54	0/0	0/0	0/0
3	66,97	0/0	0/0	0/0
4	68,05	0/0	0/0	0/0
5	68,71	0/0	0/0	0/0
6	69,88	0/0	0/0	0/0
7	71,19	0/0	0/0	0/0
8	73,73	0/0	0/0	0/0
9	76,11	0/0	0/0	0/0
10	76,79	0/0	0/0	0/0
11	77,12	0/0	0/0	0/0
12	80,86	0/0	0/0	0/0
13	82,00	0/0	0/0	0/0
14	85,41	0/1	0/1	0/0
15	86,11	0/0	0/0	1/1
16	87,22	0/0	0/0	0/1
17	87,35	0/0	0/0	0/0
18	88,16	0/1	0/1	0/0
19	88,53	0/0	0/0	0/0
20	89,18	0/0	0/0	1/1
21	90,06	0/0	0/0	0/0
22	90,46	0/0	0/0	0/0
23	90,67	0/1	0/1	0/1
24	90,98	0/0	0/0	0/0
25	92,40	0/0	0/0	0/0
26	92,60	0/0	0/0	0/0
27	93,04	0/0	0/0	0/0
29	93,93	0/0	0/0	0/0
30	94,24	0/0	0/0	0/0
30	94,57	0/0	0/0	0/0
31	94,68	1/1	1/1	0/1
32	95,24	0/0	0/0	1/1
33	96,00	0/1	0/1	0/1
34	96,09	0/0	0/0	0/0
35	96,84	0/1	0/1	0/0
36	96,88	0/1	0/1	0/1
37	96,89	0/0	0/0	0/0
38	98,25	0/1	0/1	0/1
39	98,26	0/1	0/1	0/1

Fortsetzung Tabelle 14

Proband	kranialer Index	<i>CNTN6</i> c.910A>C	<i>CNTN6</i> c.2992T>C	<i>FOXL2</i> c.588G>C
40	98,67	0/0	0/0	0/0
41	99,17	0/0	0/0	0/0
42	99,33	0/1	0/1	1/1
43	99,51	0/0	0/0	0/0
44	100,16	0/0	0/0	0/1
45	101,00	0/1	0/1	0/1
46	101,20	0/0	0/0	0/0
47	102,24	0/0	0/0	0/1
48	106,94	0/1	0/1	0/1
49	111,45	0/0	0/0	0/0
50	113,09	0/0	0/1	1/1
51	118,00	0/0	0/0	0/0
54	120,00	0/1	0/1	1/1
53	120,39	1/1	1/1	0/1
54	123,00	0/0	0/0	0/0

Bei der Auswertung der Varianten zeigte sich, dass die Mutationen im *CNTN6*-Gen c.910A>C und c.2992T>C bei 53 der 54 Probanden in der identischen Ausprägung vorlagen. Lediglich bei der Perserkatze Nummer 50 liegt der Genotyp AA an c.910 des *CNTN6*-Gens und TC an c.2992 des *CNTN6*-Gens vor. Die zwei untersuchten Varianten innerhalb des *CNTN6*-Gens lagen im Studienkollektiv bei 98,1 % in der gleichen Ausprägung vor und werden daher anscheinend gekoppelt vererbt.

#### 4.7.1 Rekonstruktion von Mutationen im *CNTN6*- & *FOXL2*-Gen innerhalb des Stammbaumes des Studienkollektivs

Bei dem im Kapitel 4.4 bereits erläuterten Stammbaum der 23 Katzen wurden die Genotypen der untersuchten Varianten innerhalb des *CNTN6*-Gens sowie des *FOXL2*-Gens eingetragen. 40,9 % der Katzen innerhalb dieser Population tragen mindestens eine heterozygote oder sogar eine homozygote Form der Varianten im *CNTN6*-Gen (Genotyp A/C und T/C oder C/C und C/C), dabei wurde das Tier Nummer 50, welches keinen gekoppelten Erbgang der zwei untersuchten Varianten aufweist, nicht einbezogen. 52,2 % der Katzen tragen mindestens ein oder zwei mutierte Allele des *FOXL2*-Gens (Genotyp G/C oder C/C). Anhand des Stammbaumes lässt sich zeigen, dass die Varianten im *CNTN6*- und *FOXL2*-Gen in mindestens zwei (*FOXL2*) beziehungsweise drei (*CNTN6*) Familienstämmen getrennt voneinander auftreten. Die Familienstämme weisen in mindestens drei Generationen keine gemeinsamen Vorfahren auf (Abbildung 37).

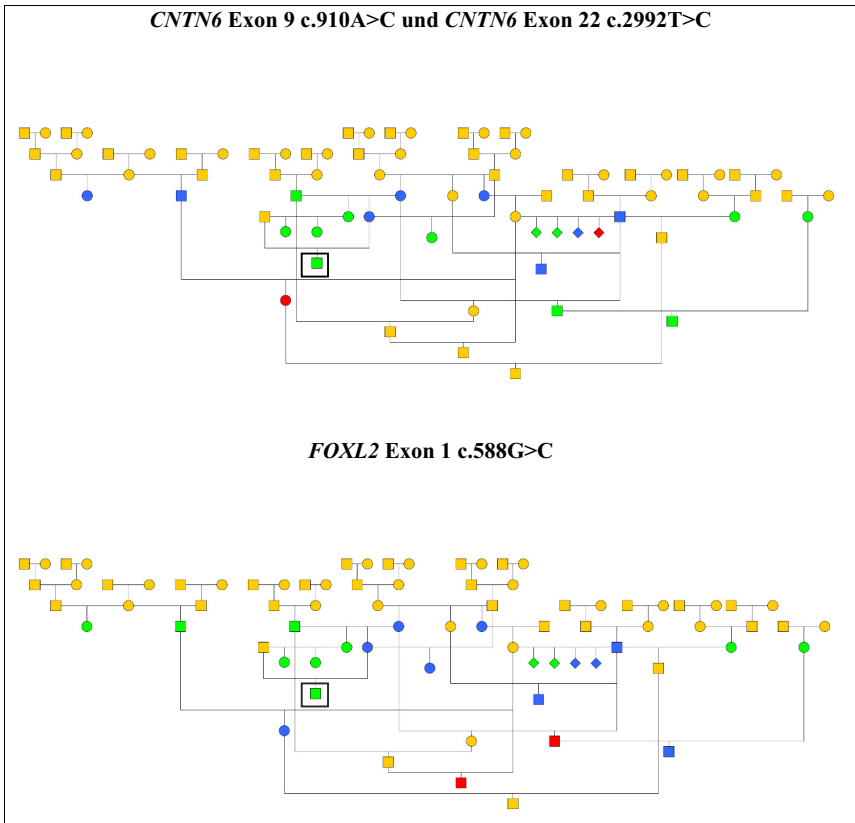


Abbildung 37: Auftreten der Mutationen im *FOXL2*- und *CNTN6*-Gen innerhalb des Stammbaumes. Bei allen ausgewerteten Tieren mit Ausnahme des schwarz umrandeten Katers handelt es sich um Vertreter der *peke-face* Perserkatzen (Kap. 4.4). Rot sind homozygote und blau heterozygote Träger der Mutation gekennzeichnet. Tiere, bei denen die Variante im Wildtyp vorliegt, sind grün markiert. Über die in Gelb markierten Individuen liegen keine Daten vor. Die vier in Rautenform gekennzeichneten Vollgeschwister symbolisieren die Kitten, bei welchen Schmidt et al. (2017) eine koronale Kraniosynostose diagnostizieren konnten.

□ männliches Tier      ○ weibliches Tier      ◇ Geschlecht unbekannt

#### 4.7.2 Verteilung der Mutationen bezogen auf den kranialen Index

Die überprüften Varianten innerhalb der Gene *CNTN6* und *FOXL2* traten im Studienkollektiv ausschließlich bei Tieren mit einem kranialen Index von > 83,00 und somit den *peke-face* Perserkatzen auf. Innerhalb der Gruppe der *doll-face* Perserkatzen, sowie der Perserkatzen mit einer moderaten Brachycephalie (kranialer Index zwischen 70,00 und 83,00) entsprechen die Basensequenzen an den genotypisierten Positionen bei 100 % der Probanden der Referenzsequenz. Die Variante *CNTN6* c.910A>C liegt im Studienkollektiv bei 74,1 % im Genotyp A/A (Wildtyp) vor, 22,2 % weisen den Genotyp A/C auf (heterozygote Mutation) und bei 3,7 % konnte mit dem Genotyp C/C eine homozygote Mutation der Variante gefunden werden. Betrachtet man ausschließlich die *peke-face* Perserkatzen so kam bei 65,85 % der Genotyp A/A, bei 29,27 % der Genotyp A/C und bei 4,88 % der Genotyp C/C vor. Ähnlich verhält es sich bei der Variante *CNTN6* c.2992T>C. Der Genotyp T/T (Wildtyp) konnte innerhalb des Studienkollektivs bei 72,22 %, der Genotyp T/C bei 24,07 % und der Genotyp C/C bei 3,7 % der Perserkatzen gefunden werden. Innerhalb der Gruppe der *peke-face* Perserkatzen konnte der Genotyp T/T bei 63,41 %, der Genotyp T/C bei 31,71 % und der Genotyp C/C bei 4,88 % nachgewiesen werden. Der SNP c.588G>C im *FOXL2*-Gen konnte ebenso nur innerhalb der *peke-face* Perserkatzen Gruppe gefunden werden. Bezogen auf das gesamte Studienkollektiv wiesen 66,67 % den Genotyp G/G (Wildtyp), 22,22 % den Genotyp G/C und 11,11 % den Genotyp C/C auf. Bei den *peke-face* Perserkatzen konnte der Genotyp G/G bei 56,1 %, der Genotyp G/C bei 29,27 % und der Genotyp C/C bei 14,63% der Tiere gefunden werden.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Missense-Mutationen innerhalb der Gene *CNTN6* und *FOXL2* erfolgt in Abbildung 38, Abbildung 40, Abbildung 41. Dabei wird jeweils ein Bildschirmausschnitt des Alignments der Genotypisierung gezeigt. Diese wurden mit dem Programm ChromasPro erstellt. In der obersten Reihe wird die Basenabfolge des Referenzgenoms abgebildet, danach folgen die Basensequenzen der Individuen (A). Des Weiteren wird jeweils die Verteilung der Varianten innerhalb des Studienkollektivs nach ihrem Auftreten in Abhängigkeit zum Brachycephaliegrad der Katzen abgebildet (B). Dann folgen die Ergebnisse der NGS visualisiert mit dem Programm IGV. Aufgezeigt sind untereinander die Basenabfolgen der fünf sequenzierten Tiere. Dabei sind Basen, welche der Referenz entsprechen grau markiert. Weichen die Basen von der Referenzsequenz ab sind sie farblich dargestellt. Darunter folgen die Basenabfolge des Referenzgenoms *Felis\_catus\_9.0* (GCF\_000181335.3) und die Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins.



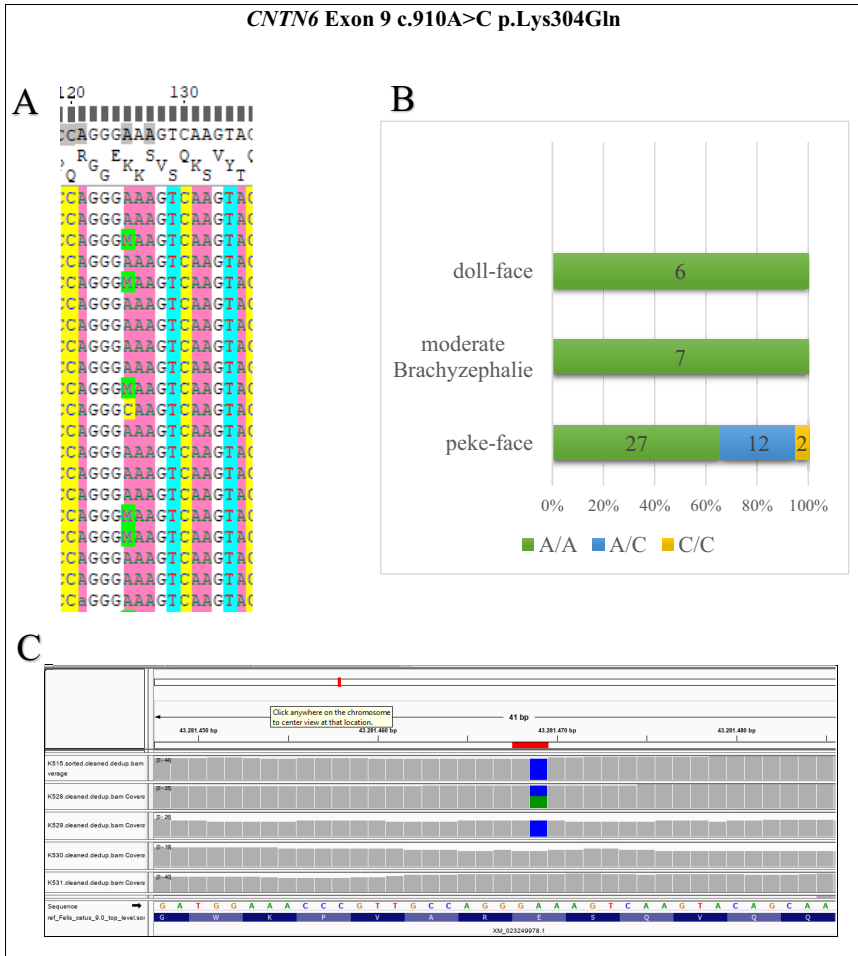


Abbildung 38: Überblick über die Variante c.910A>C des *CNTN6*-Gens. A: Ausschnitt aus dem Alignment der Genotypisierung mittels ChromasPro. Im Wildtyp liegt die hier in rosa gekennzeichnete Base Arginin (A) vor. Trägt ein Allel Cytosin (C) und das zweite A, ist die Stelle grün und nach dem IUPAC Code mit M markiert. Liegen beide Allele als C vor, ist die Position gelb und mit C gekennzeichnet. B: Verteilung der Variante c.910A>C im Exon 9 des *CNTN6*-Gens innerhalb des Studienkollektivs. C: Ergebnisse der NGS der Variante dargestellt im IGV. Blau steht für die Detektion der Base C, grün für A. Beim ersten und dritten Probanden wird in nahezu 100% der reads C detektiert. In der zweiten Sequenz wird in ca. 50% der reads je ein A oder ein C detektiert. Bei den Probanden vier und fünf entsprechen ca. 100% der reads der Referenzsequenz.

## Ergebnisse

Analog zur Abbildung 38 wird in der Abbildung 40 die Mutation *CNTN6* Exon 22 c.2992T>C p.Phe998Leu aufgezeigt. Vor der Missense-Mutation T>C tritt hier noch eine weitere Mutation G>A auf. Diese ist sowohl in A, dem Alignment der Genotypisierung wie auch in C, der Darstellung der Sequenzierungsergebnisse der NGS mittels IGV, sichtbar. Sowohl das Basentriplet CCG als auch das Triplet CCA kodiert die Aminosäure Prolin. Bei der Mutation handelt es sich um eine stille Mutation ohne Aminosäureaustausch im Protein, daher wurde sie nicht in die weiteren Analysen einbezogen. Die nach der Auswertung der NGS-Dateien heterozygote Variante bei Proband K528 konnte in IGV nicht nachvollzogen werden (Abbildung 40 C zweite Sequenz von oben). Nur 17 % der reads wiesen an der untersuchten Position ein C auf. In der Genotypisierung des Individuums mittels Sanger-Sequenzierung konnte die heterozygote Ausprägung der Variante bei diesem Tier allerdings nachvollzogen werden (Abbildung 39).

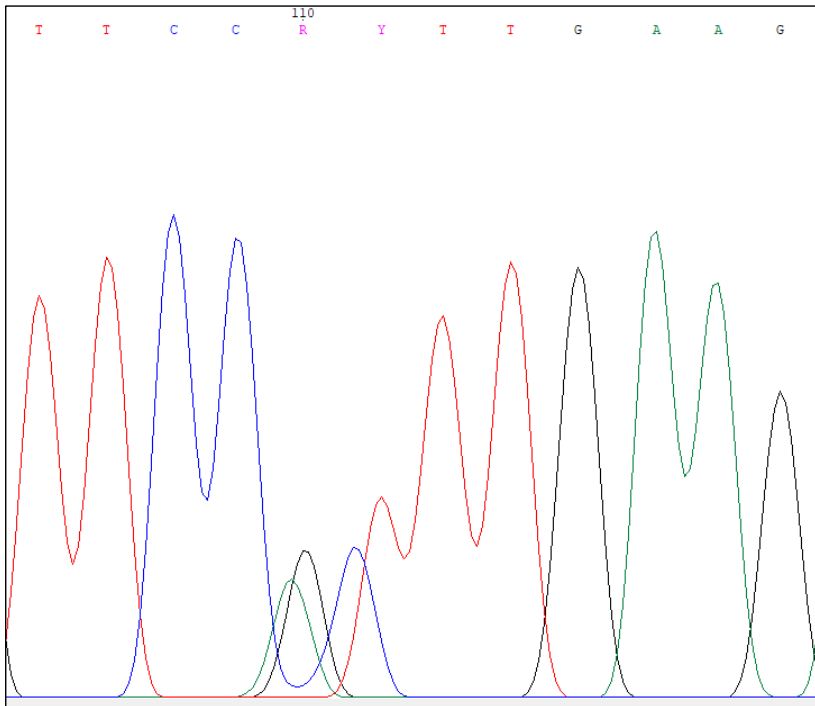


Abbildung 39: Ausschnitt der Genotypisierung der Variante *CNTN6* Exon 22 c.2992T>C des Probanden K528. Heterozygote Ausprägung der Mutation, gekennzeichnet durch die sich überschneidenden Wellenberge mit halber Höhe. Vor der Missense-Mutation Exon 22 c.2992T>C liegt die stille Mutation G>A.

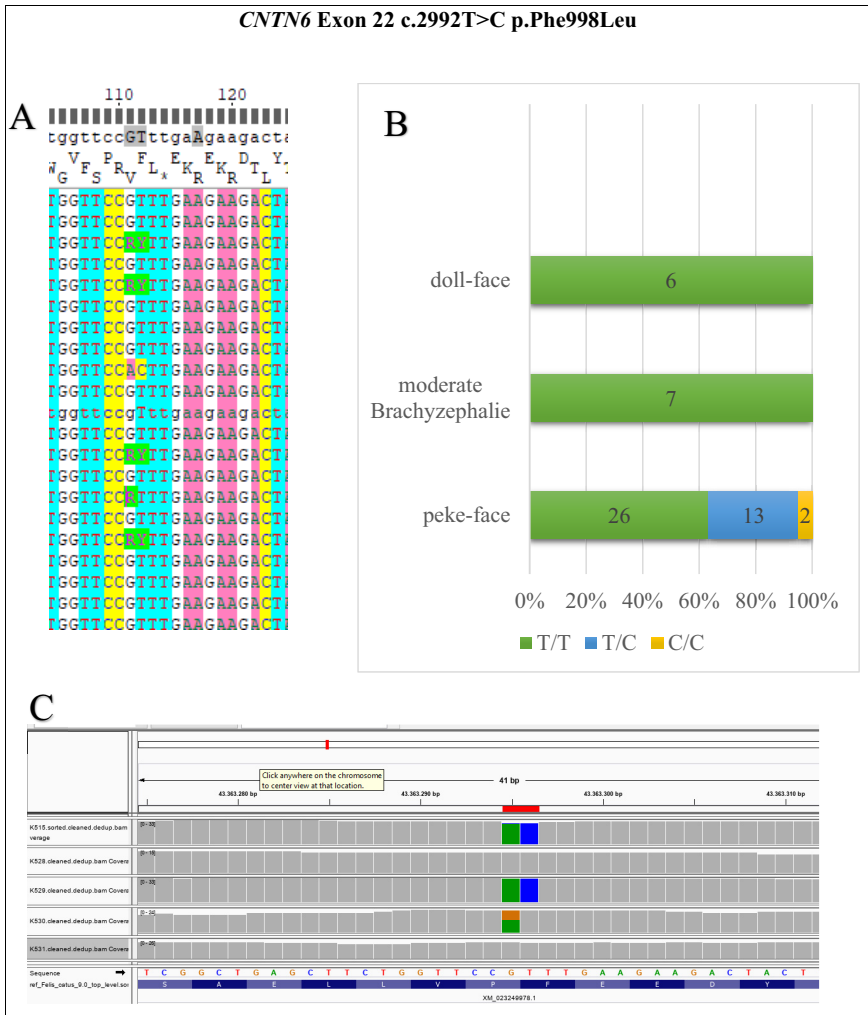


Abbildung 40: Überblick über die Variante c2992T>C des *CNTN6*-Gens. A: Ausschnitt aus dem Alignment der Genotypisierung mittels ChromasPro. Im Wildtyp liegt die hier in blau gekennzeichnete Base Thymin (T) vor. Trägt ein Allel Cytosin (C) und das zweite T, wird die Position grün und nach dem IUPAC Code mit Y markiert. Liegt eine homozygote Mutation vor (C), wird die Stelle gelb eingefärbt. B: Verteilung der Variante c2992T>C des *CNTN6*-Gens innerhalb des Studienkollektivs. C: Ergebnisse der NGS der Variante dargestellt im IGV. Blau steht für die Detektion der Base C. Beim ersten und dritten Probanden wird in ca. 100 % der reads C detektiert. Bei den Probanden zwei, vier und fünf entsprechen ca. 100 % der reads der Referenzsequenz.

**FOXL2 Exon 1 c.588G>C p.Lys196Asn**

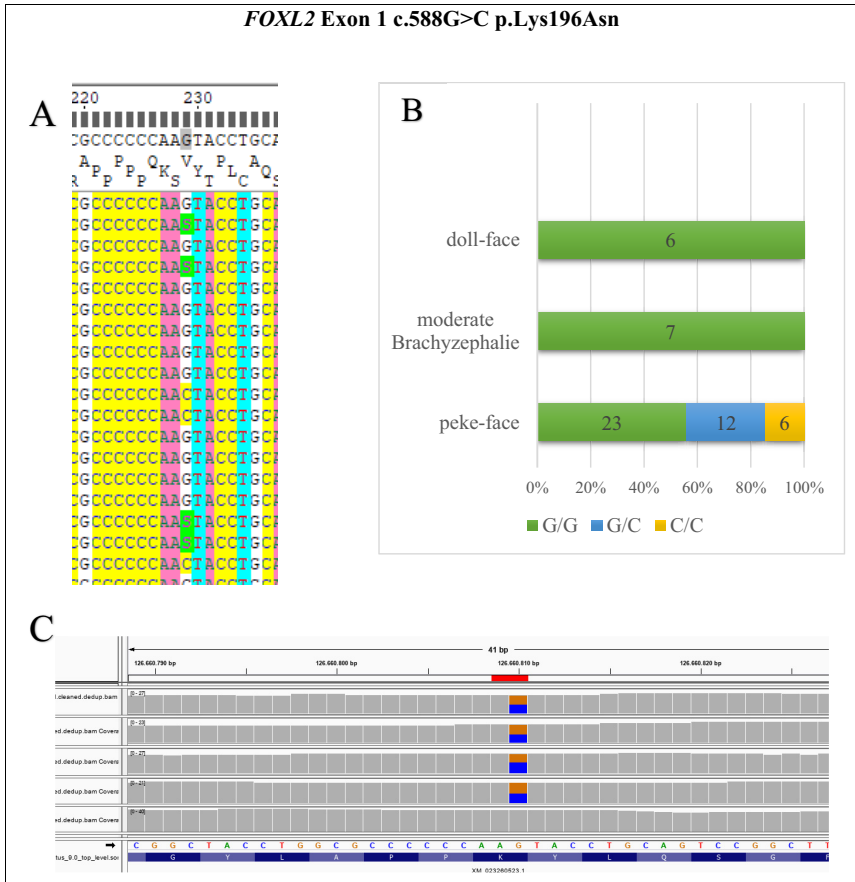


Abbildung 41: Überblick über die Variante c.588G>C des *FOXL2*-Gens. A: Ausschnitt aus dem Alignment der Genotypisierung mittels ChromasPro. Im Wildtyp liegt die hier weiß markierte Base Guanin (G) vor. „S“ steht im IUPAC Code für das heterozyote Vorliegen der Basen G und Cytosin (C), C für das homozyote Auftreten von C. B: Verteilung der Variante *FOXL2* c.588 G>C im Studienkollektiv. C: Darstellung der Ergebnisse der NGS mit IGV. In den Zeilen sind untereinander die Sequenzierungsergebnisse der 5 Individuen aufgetragen. Die Farbe braun steht hierbei für die Detektion eines G, welches dem Referenzgenom entspricht, blau symbolisiert ein C. Die oberen vier Probanden weisen in ca 50 % der *reads* je ein G oder ein C auf. Der fünfte Proband entspricht in den meisten *reads* dem Referenzgenom.

#### 4.8 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Daten der Katze Nummer 50 wurden in der folgenden statistischen Auswertung aufgrund des Kopplungsbuchs innerhalb der Varianten des *CNTN6*-Gens nicht einbezogen. Da die Ergebnisse der Genotypisierung der Varianten Exon 9 c.910A>C und Exon 22 c.2992T>C des *CNTN6*-Gens bei den restlichen Probanden übereinstimmen, werden sie im folgenden Text unter Varianten im *CNTN6*-Gen zusammengefasst.

##### 4.8.1 Korrelation der Variablen untereinander und mit dem kranialen Index

Die Korrelationen der Variablen „Varianten *CNTN6*-Gen“, „Varianten *FOXL2*-Gen“ und „kranialer Index“ wurden mittels Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten bestimmt. Zwischen dem kranialen Index und den SNPs im *CNTN6*-Gen c.910A>C und c.2992T>C ( $p = 0,361$ ,  $p = 0,008$ ) und dem SNP im *FOXL2*-Gen c.588G>C ( $p = 0,381$ ,  $p = 0,005$ ) liegt eine mittlere Korrelation vor (Cohen 2013). Alle berechneten Korrelationen und Signifikanzen können der folgenden Tabelle 15 entnommen werden.

**Tabelle 15: Zusammenhänge der Varianten und dem kranialen Index in einer Spearman's rho Korrelationstabelle.**

		Varianten <i>CNTN6</i> -Gen	Variante <i>FOXL2</i> -Gen	kranialer Index
Varianten	Korrelationskoeffizient	1	0,556**	0,361**
<i>CNTN6</i> - Gen	Signifikanz (2-seitig)	.	0	0,008
	N	53	53	53
Variante	Korrelationskoeffizient	0,556**	1	0,381**
<i>FOXL2</i> -Gen	Signifikanz (2-seitig)	0	.	0,005
	N	53	53	53
kranialer Index	Korrelationskoeffizient	0,361**	0,381**	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,008	0,005	.
	N	53	53	53

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Für die Berechnung der Korrelation des kranialen Index mit dem Auftreten eines Hydrozephalus wurde die punktbiseriale Korrelation verwendet. Es zeigt sich eine starke positive Korrelation des kranialen Index mit der Diagnose eines *Hydrocephalus internus*, Pearsons  $r = 0,69$ ,  $p < 0,001$ .

### 4.8.2 Wirkung verschiedener Variablen auf den kranialen Index

Es wurden einfaktorielle ANOVAs berechnet, um festzustellen, ob es in Abhängigkeit vom Auftreten der Variablen zu einer Veränderung im Wert des kranialen Indexes kommt. Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand des Genotyps. Für die Varianten im *CNTN6*-Gen ergab sich die in Tabelle 16 dargestellte Einteilung. Analog zum Auftreten der untersuchten Variante innerhalb des *CNTN6*-Gens ergaben sich für die Variante im *FOXL2*-Gen die folgenden Kriterien (Tabelle 17). Bei einer weiteren einfaktoriellen ANOVA wurde nicht nur isoliert der Genotyp der Varianten innerhalb der jeweiligen Gene betrachtet, sondern die ANOVA für die Kombination der Varianten berechnet. Dafür ergab sich die in Tabelle 18 dargestellte Einteilung. Die Mittelwerte (M) des kranialen Index sind in Abhängigkeit des jeweiligen Genotyps in Abbildung 42 dargestellt. Zur besseren Visualisierung wird eine lineare Trendlinie angegeben. Der kraniale Index war innerhalb der verschiedenen Gruppen normalverteilt, was eine Überprüfung mittels Shapiro-Wilk-Test ergab ( $p > 0,05$ ). Nur in der Gruppe „Variante Genotyp *CNTN6* c.910A>C & c.2992T>C *CNTN6* 0/1 & 1/1“ war ein Normalverteilungstest nicht möglich, da hierfür die Gruppenstärke  $N = 2$  zu klein war (Tabelle 16). Eine Varianzhomogenität konnte für die Gruppen von *CNTN6* und *FOXL2* anhand des Levene-Tests bestätigt werden ( $p > 0,05$ ). Für die Gruppe der kombinierten Varianten lag keine Gleichheit der Varianzen vor, weswegen die gegenüber diesem Kriterium robustere Welch-ANOVA verwendet wurde. Anhand der Box-Plot-Diagramme konnte gezeigt werden, dass innerhalb der einzelnen Gruppen keine starken Ausreißer enthalten waren (Abbildung 43).

## Ergebnisse

**Tabelle 16: Kriterien zur Unterteilung des Studienkollektivs anhand der Genotypen der Varianten im *CNTN6*-Gen.**

<b>Genotyp <i>CNTN6</i> c.910A&gt;C und c.2992T&gt;C</b>	<b>Definition</b>	<b>Gruppenstärke N</b>	<b>kranialer Index: Mittelwert &amp; Standardabweichung</b>
0/0 & 0/0	kein mutiertes Allel „Wildtyp“	39	M = 88,52, SD = 14,14
0/1 & 0/1	zwei mutierte Allele „heterozygot“	12	M = 98,14, SD = 9,00
1/1 & 1/1	vier mutierte Allele „homozygot“	2	M = 107,54, SD = 18,18

**Tabelle 17: Kriterien zur Unterteilung des Studienkollektivs anhand des Genotyps der Variante c.588G>C im *FOXL2*-Gen.**

<b>Genotyp <i>FOXL2</i> c.588G&gt;C</b>	<b>Definition</b>	<b>Gruppenstärke N</b>	<b>Anzahl, kranialer Index: Mittelwert und Standardabweichung</b>
0/0	kein mutiertes Allel „Wildtyp“	36	M = 87,85, SD = 14,43
0/1	ein mutiertes Allel „heterozygot“	12	M = 99,39, SD = 8,40
1/1	zwei mutierte Allele „homozygot“	5	M = 97,97, SD = 13,35

Tabelle 18: Kriterien zur Unterteilung des Studienkollektivs anhand der Kombinationen der Varianten innerhalb des *CNTN6*- und *FOXL2*-Gens.

Gruppe	<i>FOXL2</i> c.588G>C	<i>CNTN6</i> c.910A>C & c.2992T>C	Definition	Gruppenstärke N	kranialer Index: Mittelwert & Standardabweichung
1	0/0	0/0	Beide Gene im Wildtyp	33	M = 87,64, SD = 15,00
2	0/0 0/1	0/1 0/0	Ein SNP im <i>FOXL2</i> - oder <i>CNTN6</i> -Gen heterozygot	6	M = 93,34, SD = 7,29
3	0/0 1/1	1/1 0/0	Ein SNP ( <i>FOXL2</i> - oder <i>CNTN6</i> -Gen) homozygot, anderer SNP Wildtyp	3	M = 90,17, SD = 4,65
4	0/1	0/1	Beide SNPs heterozygot	7	M = 98,29, SD = 4,96
5	1/1 0/1	0/1 1/1	Ein SNP homozygot eines heterozygot	4	M = 108,60, SD = 13,52
6	1/1	1/1	Beide SNPs homozygot	0	



## Ergebnisse

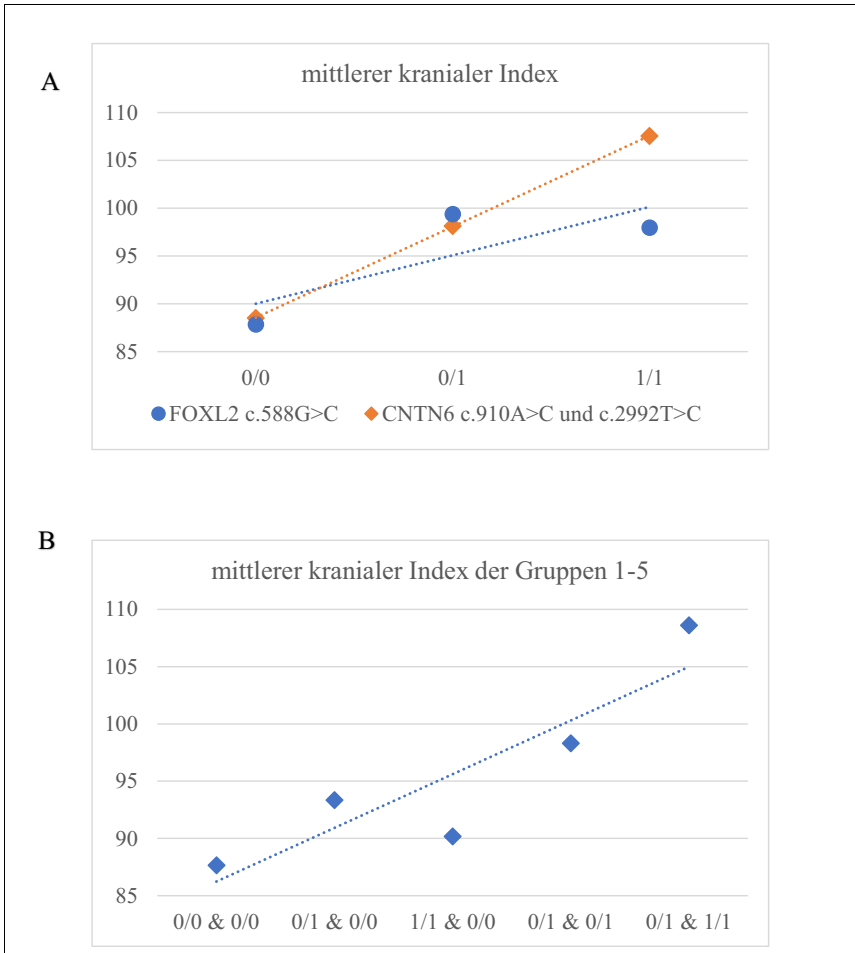


Abbildung 42: Mittlerer kranialer Index (M) der Studienpopulation in Abhängigkeit zum Genotyp mit Angabe einer linearen Trendlinie. A: Varianten des CNTN6-Gens (orange) und FOXL2-Gens (blau). B: Kombination der Genotypen innerhalb der Gene CNTN6 und FOXL2 (blau).

# Ergebnisse

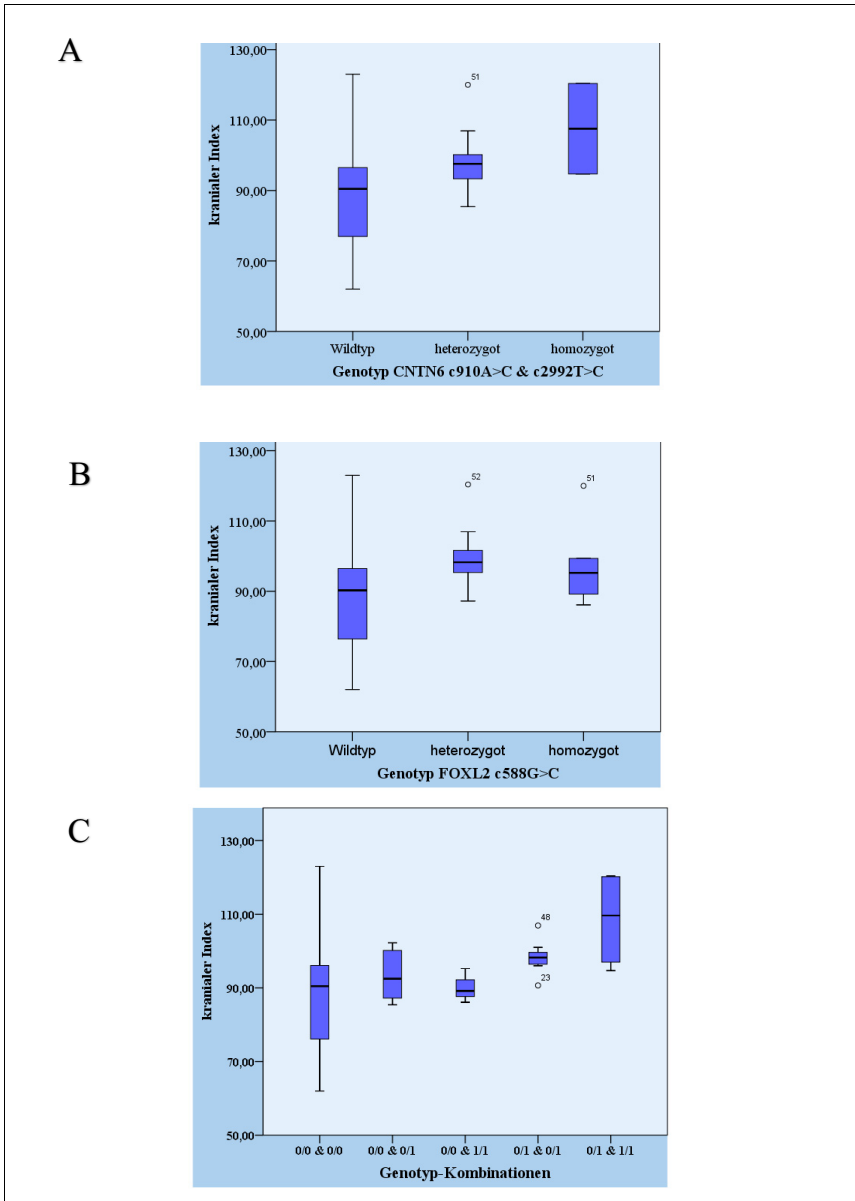


Abbildung 43: Verteilung der Werte des kranialen Index mit Angabe des Medians innerhalb der Gruppen aufgeteilt nach Genotyp. A: Genotyp *CNTN6*, B: Genotyp *FOXL2* und C: Genotyp-Kombinationen analog zu Tabelle 18.

## Ergebnisse

Die einfaktorielle ANOVA zeigte einen statistisch schwach signifikanten Unterschied des Wertes des kranialen Index in Abhängigkeit zu den Variablen des *CNTN6*-Gens  $p = 0,04$ ,  $F(2, 51) = 3,42$ ,  $\eta^2 = 0,12$ . Nach Cohen (2013) liegt bei einem Eta Quadrat von über 0,06 ein mittlerer und bei über 0,14 ein großer Effekt vor. Hier liegt demnach eine mittlere Effektstärke vor. Es gab eine statistisch signifikante Differenz der Werte des kranialen Index der Gruppe „Wildtyp“ ( $M = 88,52$ ,  $SD = 14,14$ ) und „heterozygot“ ( $M = 98,14$ ,  $SD = 9,00$ ) von 9,63 ( $SE = 4,39$ )  $p = 0,033$ . Die Werte des kranialen Index der Gruppe ohne mutiertes Allel „Wildtyp“ ( $M = 88,52$ ,  $SD = 14,14$ ) waren statistisch signifikant niedriger als in der Gruppe „heterozygot“ ( $M = 98,14$ ,  $SD = 9,00$ ) und „homozygot“ ( $M = 107,54$ ,  $SD = 18,18$ ), mit einer durchschnittlichen Differenz von 14,32 ( $SE = 5,50$ ),  $p = 0,012$ . Die Kontrastanalyse der Gruppen „Wildtyp“ und „homozygot“ sowie „heterozygot“ und „homozygot“ zeigte keine signifikante Differenz der Werte des kranialen Index.

Der Wert des kranialen Index unterschied sich statistisch signifikant für Katzen mit unterschiedlichen Genotypen der Variante im *FOXL2*-Gen  $p = 0,012$ ,  $F(2, 51) = 4,86$ . Mit einem  $\eta^2 = 0,16$  liegt hier ein großer Effekt der ANOVA vor (Cohen 2013). Durch die Kontrastanalyse zeigte sich eine statistisch signifikante Abweichung der Mittelwerte des kranialen Index zwischen der Gruppe „Wildtyp“ ( $M = 87,85$ ,  $SD = 14,43$ ) und „heterozygot“ ( $M = 99,39$ ,  $SD = 8,40$ ) von 11,55 ( $SE = 4,42$ ),  $p = 0,012$ . Zwischen den Werten der kranialen Indices der Gruppen Wildtyp ( $M = 87,85$ ,  $SD = 14,43$ ) und den heterozygoten ( $M = 99,39$ ,  $SD = 8,40$ ) beziehungsweise homozygoten ( $M = 97,97$ ,  $SD = 13,35$ ) Trägern der Variante zeigte sich eine statistisch signifikante Differenz von 10,84 ( $SE = 4,16$ ),  $p = 0,012$ . Analog zu den Ergebnissen der Kontrastanalyse der Varianten im *CNTN6*-Gen konnte auch bei der Analyse der Variable des *FOXL2*-Gens zwischen den Gruppen „Wildtyp“ und „homozygot“ sowie „heterozygot“ und „homozygot“ keine signifikante Differenz der Werte des kranialen Index nachgewiesen werden.

Die gegenüber fehlender Varianzhomogenität robuste Welch-ANOVA zeigte einen schwach signifikanten Unterschied des kranialen Index in Abhängigkeit vom Auftreten der kombinierten Varianten, Welch-Test  $p = 0,046$ ,  $F(4, 9,35) = 3,69$ . In der Kontrastanalyse zeigten sich signifikante höhere Werte des kranialen Index der Gruppe 4 ( $M = 98,29$ ,  $SD = 4,96$ ) im Vergleich zur Gruppe 1 ohne mutiertes Allel „Wildtyp“ ( $M = 87,64$ ,  $SD = 15,00$ ) von 10,65 ( $SE = 3,21$ ),  $p = 0,002$ . Es gab eine schwach signifikante Differenz der Werte des kranialen Index der Gruppen „Wildtyp“ ( $M = 87,64$ ,  $SD = 15,00$ ) und der Gruppe 5 ( $M = 108,60$ ,  $SD = 13,52$ ) von 20,96 ( $SE = 7,25$ ),  $p = 0,045$ . Die Werte des kranialen Index der Gruppen 2 ( $M = 93,34$ ,  $SD = 7,29$ ), 3 ( $M = 90,17$ ,  $SD = 4,65$ ), 4 ( $M = 98,29$ ,  $SD = 4,96$ ) und 5 ( $M = 108,60$ ,

## Ergebnisse

SD = 13,52) waren statistisch signifikant höher als in der Gruppe ohne mutierte Allele (M = 87,64, SD = 15,00) mit einer durchschnittlichen Differenz von 9,96 (SE = 3,3),  $p = 0,005$ . Die gesamten Ergebnisse der Kontrasttests sind in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19: Kontrastwerte der einfaktoriellen ANOVA der Gruppenvergleiche 1–5 aus den Kombinationen der Varianten der Gene *CNTN6* und *FOXL2*.**

	Kontrast- wert	Standard- fehler (SE)	T	df	Signifikanz (2-seitig)
Gruppe 1:2	5,7009	3,95767	1,440	14,346	0,171
Gruppe 1:3	2,5361	3,74300	0,678	7,185	0,519
Gruppe 1:4	10,6474	3,21345	3,313	30,429	<b>0,002</b>
Gruppe 1:5	20,9636	7,24708	2,893	3,954	<b>0,045</b>
Gruppe 2:3	-3,1648	4,00474	-0,790	6,196	0,459
Gruppe 2:4	4,9465	3,51485	1,407	8,623	0,194
Gruppe 2:5	15,2627	7,38567	2,067	4,180	0,105
Gruppe 3:4	8,1113	3,27125	2,480	4,102	0,067
Gruppe 3:5	18,4275	7,27289	2,534	3,875	0,066
Gruppe 4:5	10,3162	7,01507	1,471	3,468	0,226
Gruppe 1:2–5	9,9620	3,30086	3,018	27,339	<b>0,005</b>

#### 4.8.3 Vorkommen der untersuchten Genvarianten in Assoziation mit dem Auftreten eines *Hydrocephalus internus*

Bei 41 Perserkatzen konnte eine Diagnose bezüglich des Vorliegens eines *Hydrocephalus internus* getroffen werden. Lag ein Hydrozephalus vor, wurden sie als „positiv“ bezeichnet. Wiesen die Ventrikel normale Dimensionen auf, wurde die Diagnose *Hydrocephalus internus* „negativ“ gestellt. Nach Diagnosestellung wurde im Folgenden das Auftreten der Mutationen *CNTN6* c.910A>C und c.2992T>C, sowie *FOXL2* c.588G>C daraufhin überprüft, ob eine etwaige Assoziation der untersuchten Genvarianten mit einem *Hydrocephalus internus* bestand (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Übersicht über die Genotypen der untersuchten Varianten in aufsteigender Reihenfolge anhand des kranialen Index im Zusammenhang mit dem Befund über das Vorliegen eines *Hydrocephalus internus* (positiv). Die Schwellenwerte des kranialen Index bei 70 und 83 sind mit einer Trennlinie gekennzeichnet.**

Proband	kranialer Index	<i>CNTN6</i> c.910A>C	<i>CNTN6</i> c.2992T>C	<i>FOXL2</i> c.588G>C	<i>Hydrocephalus internus</i>
1	62,00	0/0	0/0	0/0	negativ
2	66,54	0/0	0/0	0/0	negativ
3	66,97	0/0	0/0	0/0	negativ
4	68,05	0/0	0/0	0/0	negativ
5	68,71	0/0	0/0	0/0	negativ
6	69,88	0/0	0/0	0/0	negativ
7	71,19	0/0	0/0	0/0	negativ
8	73,73	0/0	0/0	0/0	negativ
9	76,11	0/0	0/0	0/0	negativ
10	76,79	0/0	0/0	0/0	negativ
11	77,12	0/0	0/0	0/0	negativ
12	80,86	0/0	0/0	0/0	negativ
13	85,41	0/1	0/1	0/0	negativ
14	87,22	0/0	0/0	0/1	negativ
15	88,53	0/0	0/0	0/0	negativ
16	89,18	0/0	0/0	1/1	positiv
17	90,46	0/0	0/0	0/0	positiv
18	90,67	0/1	0/1	0/1	negativ
19	90,98	0/0	0/0	0/0	negativ
20	92,40	0/0	0/0	0/0	negativ
21	92,60	0/0	0/0	0/0	positiv
22	94,57	0/0	0/0	0/0	negativ
23	94,68	1/1	1/1	0/1	positiv
24	95,24	0/0	0/0	1/1	positiv
25	96,09	0/0	0/0	0/0	negativ
26	96,84	0/1	0/1	0/0	negativ
27	96,88	0/1	0/1	0/1	positiv

Fortsetzung Tabelle 20

Proband	kranialer Index	<i>CNTN6</i> c.910A>C	<i>CNTN6</i> c.2992T>C	<i>FOXL2</i> c.588G>C	<i>Hydrocephalus internus</i>
28	98,26	0/1	0/1	0/1	positiv
29	98,67	0/0	0/0	0/0	negativ
30	99,17	0/0	0/0	0/0	positiv
31	99,33	0/1	0/1	1/1	positiv
32	99,51	0/0	0/0	0/0	negativ
33	100,16	0/0	0/0	0/1	positiv
34	101,00	0/1	0/1	0/1	positiv
35	102,24	0/0	0/0	0/1	positiv
36	106,94	0/1	0/1	0/1	positiv
37	111,45	0/0	0/0	0/0	positiv
38	118,00	0/0	0/0	0/0	positiv
39	120,00	0/1	0/1	1/1	positiv
40	120,39	1/1	1/1	0/1	positiv
41	123,00	0/0	0/0	0/0	positiv

Bei den *Hydrocephalus internus* negativ befundenen Katzen konnte die Mutation c.588G>C des *FOXL2*-Gens bei 21 (91,3 %) Tieren nicht gefunden werden (Abbildung 44). Zwei der „gesunden“ Katzen (8,7 %) zeigten eine heterozygote Anlage der Mutation. Die Mutationen *CNTN6* c.910A>C und c.2992T>C konnten bei 20 (87 %) der „gesunden“ Perserkatzen nicht gefunden werden, bei drei (13 %) Individuen konnte die Mutation heterozygot nachgewiesen werden.

Bei den *Hydrocephalus internus* positiv befundenen Perserkatzen konnte die Mutation c.588G>C des *FOXL2*-Gens bei sechs (33,3 %) der erkrankten Tiere nicht nachgewiesen werden. Acht (44,4 %) trugen eine heterozygote und vier (22,2 %) eine homozygote Form der Mutation. Die *CNTN6* Mutationen *CNTN6* c.910A>C und c.2992T>C waren bei den an *Hydrocephalus internus* erkrankten Perserkatzen wie folgt verteilt: Bei zehn (55,6 %) Individuen konnte keine Mutation nachgewiesen werden, eine Heterozygotie konnte bei sechs (33,3 %) erkrankten Tieren und eine Homozygotie bei zwei (11,1 %) Perserkatzen gezeigt werden.

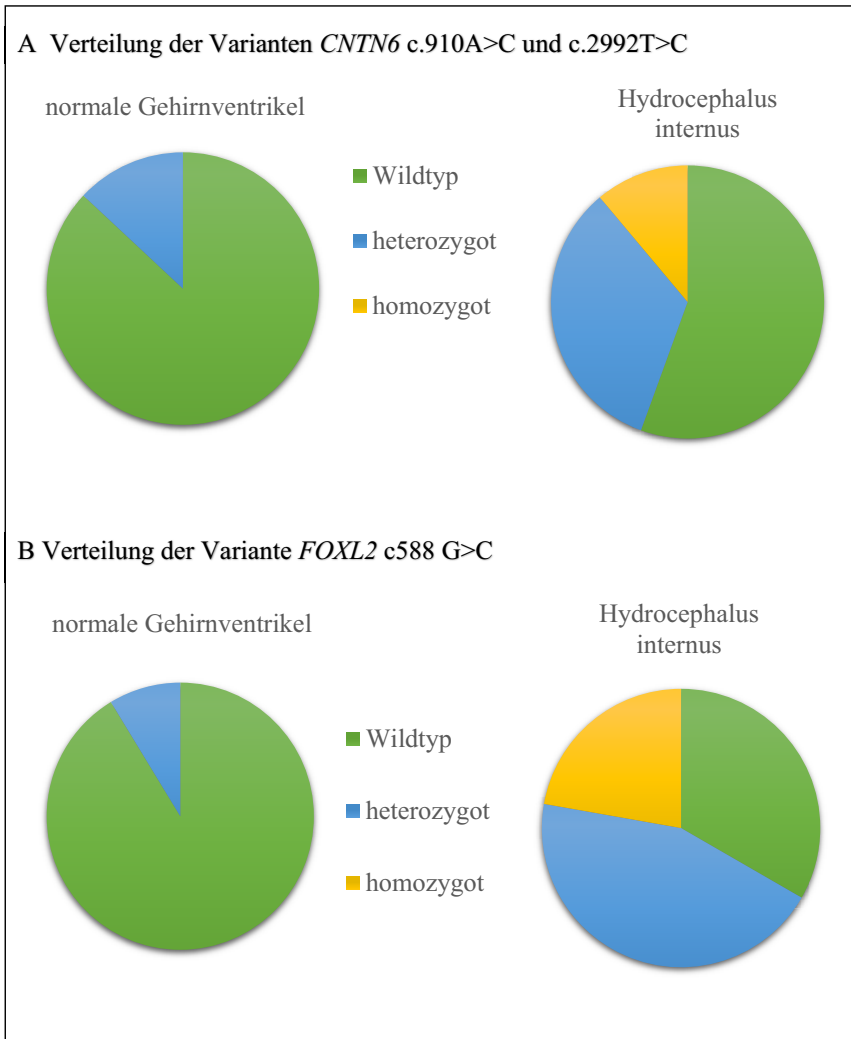


Abbildung 44: Verteilung der Mutationen in Abhängigkeit vom Auftreten eines *Hydrocephalus internus*. Links die relative Häufigkeit der SNPs bei Tieren mit normalen Hirnventrikeln, rechts bei Tieren mit *Hydrocephalus internus*. A: Verteilung der Varianten im *CNTN6*-Gen. B: Verteilung der Variante c.588G>C im *FOXL2*-Gen.

#### 4.8.4 Analyse der Assoziation zwischen den Variablen und der Entwicklung eines *Hydrocephalus internus*

Für 41 Tiere des Studienkollektivs lag eine Diagnose bezüglich der Morphologie der Hirnventrikel vor (Abbildung 45). 23 Tiere haben normale Ventrikel, 18 Tiere sind an einem *Hydrocephalus internus* erkrankt. Der kraniale Index der gesunden Tiere lag im Mittel bei 81,69 (SD = 11,99). Bei den an einem *Hydrocephalus internus* erkrankten Tieren wies er einen Mittelwert von 103,28 und eine Standardabweichung von 10,82 auf. Zur Überprüfung, ob sich der kraniale Index zwischen den gesunden Tieren und den am *Hydrocephalus internus* erkrankten Katzen unterschied wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die für die Interpretation nötige gleiche Gruppenverteilung der beiden Gruppen war gegeben, Kolmogorov-Smirnov  $p > 0,05$ . Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Mediane des Wertes des kranialen Index zwischen den gesunden Katzen ( $Mdn = 80,86$ ) und den am *Hydrocephalus internus* erkrankten Tieren ( $Mdn = 99,75$ ),  $U = 35,00$ ,  $Z = -4,518$ ,  $r = -0,71$ ,  $p < 0,001$  mit Verwendung der exakten Stichprobenverteilung von U (Dinneen *et al.* 1973).

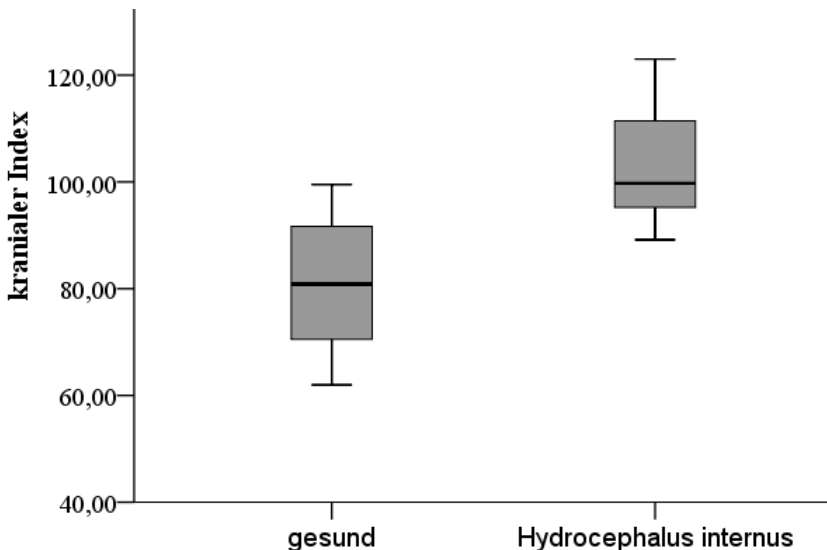


Abbildung 45: Verteilung der kranialen Indices in Abhängigkeit vom Auftreten eines *Hydrocephalus internus*. Die auf der x-Achse aufgetragenen „gesunden“ Tiere zeigten normale Hirnventrikel, die anderen Individuen weisen einen *Hydrocephalus internus* auf.



## Ergebnisse

Zur Abschätzung in welchem Maß die Faktoren Geschlecht, kranialer Index, Mutationen *CNTN6* c.910A>C & c.2992T>C, sowie die Mutation innerhalb des Gens *FOXL2* c.588G>C in einem Zusammenhang mit der Erkrankung an einem *Hydrocephalus internus* stehen wurde eine binär logistische Regression berechnet. Die Linearität der Variablen „kranialer Index“ wurde mit dem Box-Tidwell-Verfahren (Box *et al.* 1962) überprüft und die Bonferroni-Korrektur für alle Terme angewendet (Tabachnick *et al.* 2019). Basierend darauf konnte für die Variable „Kranialer Index“ Linearität angenommen werden. Wie auch in den vorausgegangenen Auswertungen wurden aus Gründen der Multikollinearität die Ergebnisse der Sequenzierungen der zwei SNPs im *CNTN6*-Gen als ein Haplotyp betrachtet. Die SNPs innerhalb von *CNTN6* wurden bei allen Individuen, welche in die Statistik einbezogen wurden, gekoppelt vererbt. Für die inbegriffenen Prädiktoren war die Korrelation ( $r < 0,7$ ) gering, eine Multikollinearität sollte das Modell demnach nicht beeinflusst haben (Dattalo 2013). Durch den Hosmer-Lemeshow-Test konnte eine hohe Anpassungsgüte  $\chi(8) = 3,91$ ,  $p > 0,05$  gezeigt werden.

Das binär logistische Regressionsmodell zeigte insgesamt eine hohe statistische Signifikanz mit  $\chi^2(6) = 40,02$ ,  $p < 0,001$  und mit Nagelkerkes  $R^2 = 0,84$  eine sehr gute Varianzaufklärung (Backhaus *et al.* 2011). Im Gesamtmodell konnten 92,7 % der Stichproben mit dem Modell korrekt zugeordnet werden. Die Sensitivität betrug 88,9 %, die Spezifität 95,7 %. In das Modell wurden vier Variablen aufgenommen. Davon weist der kraniale Index ( $p = 0,031$ ) eine Signifikanz zur Prädiktion des Modells auf. Die Mutationen des *CNTN6*-Gens, des *FOXL2*-Gens, sowie das Geschlecht hatten keinen prädiktiven Wert für das Modell und wiesen keine signifikanten Ergebnisse auf ( $p > 0,05$ ). Der kraniale Index hat eine positive Odds von 1,259 (95%- KI [1,021, 1,552]), was bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, einen *Hydrocephalus internus* zu entwickeln, um 25,9 % steigt, wenn der Wert des kranialen Index um eins ansteigt. Alle Koeffizienten des Modells, sowie deren Odds können der Tabelle 21 entnommen werden.

Tabelle 21: Ergebnisse des binär-logistischen Regressionsmodells.

	Regressions- koeffizient B	SE	Wald	df	Signifikanz	Odds Ratio	95% CI. für Odds Ratio	
							Untere Grenze	Obere Grenze
<i>CNTN6</i> c.910A>C und c.2992T>C 0/0			0,167	2	0,920			
<i>CNTN6</i> c.910A>C und c.2992T>C 0/1	-0,689	1,686	0,167	1	0,683	0,502	0,018	13,682
<i>CNTN6</i> c.910A>C und c.2992T>C 1/1	19,339	24301,53 4	0,000	1	0,999	250630141	0,000	
<i>FOXL2</i> c.588G>C 0/0			2,505	2	0,286			
<i>FOXL2</i> c.588G>C 0/1	2,722	1,720	2,505	1	0,114	15,212	0,523	442,841
<i>FOXL2</i> c.588G>C 1/1	21,036	18086,44 2	0,000	1	0,999	1366781067	0,000	
Geschlecht	-2,065	1,498	1,902	1	0,168	0,127	0,007	2,388
Kranialer Index	0,230	0,107	4,652	1	0,031	1,259	1,021	1,552
Konstante	-21,588	10,214	4,467	1	0,035	0,000		

## 5 Diskussion

Bei der Brachyzephalie handelt es sich beim Menschen, wie auch der Katze, um eine Erkrankung, die mit vielerlei gesundheitlichen Problemen für die betroffenen Individuen einhergeht (Schmidt *et al.* 2017; Niemiec 2010; Harvey 1989; Wastlhuber 1991). Trotzdem erfreut sich die Zucht von extrem brachyzephalen Perserkatzen, den sogenannten *peke-face* Perserkatzen, großer Beliebtheit und wurde innerhalb der letzten Jahrzehnte zum entscheidenden Zuchtziel der Perserkatze (The Cat Fanciers' Association, Inc 2017; Case *et al.* 2003; The Cat Fanciers' Association, Inc 2017; Wastlhuber 1991). Ein brachyzephaler Schädeltyp wird in der Tierzucht in der Regel als ein Merkmal verstanden, das an einem Ende eines Spektrums physiologischer Schädelformen steht. Die Züchtung der *peke-face* Perserkatze wurde allerdings nicht durch schrittweise Modifikation des Gesichtsschädels durch Auswahl von Zuchttieren eines bestimmten Phänotyps erreicht, sondern die *peke-face* Perserkatzen entstanden aus einigen wenigen Nachkommen von *doll-face* Perserkatzen, deren Schädelmorphologie sich massiv von der ihrer Elterntiere unterschied. Dieser spontan aufgetretene Schädeltypus wurde gezielt vermehrt und durch Kreuzung mit anderen Rassen z.B. auch in Linien der British Shorthair etabliert. Es liegt daher nahe, dass das Merkmal „extreme Brachyzephalie“ durch eine oder mehrere spontane Mutationen aufgetreten ist (Morris 2000; Wastlhuber 1991). Die genetischen Untersuchungen dieser Arbeit verfolgten das Ziel, potenzielle kausale Varianten in Kandidatengenomen für die koronale Kraniosynostose und die damit einhergehende Brachyzephalie der Perserkatze im kleineren Kollektiv zu identifizieren und durch eine anschließende Genotypisierung im größeren Studienkollektiv zu evaluieren. Die schweren gesundheitlichen Folgen für die Perserkatze durch die extreme Reduktion der Schädelgröße wurden bereits in einigen aktuellen Studien Gegenstand der Forschung (Farnworth *et al.* 2016; Breit *et al.* 2003; Schmidt *et al.* 2017). Über die genetische Grundlage der Brachyzephalie beim Hund wurden in jüngerer Zeit bereits einige Arbeiten veröffentlicht (Marchant *et al.* 2017; Bahamonde *et al.* 2001; Schoenebeck *et al.* 2012), allerdings gibt es kaum Studien über die zugrunde liegende Genetik der Brachyzephalie bei der Perserkatze. Auch bei der Katze im Allgemeinen ist die Studienlage zu diesem Thema eher rar. So konnte bis dato nur bei der Burma vom *contemporary type* eine zugrunde liegende Mutation der Brachyzephalie identifiziert werden (Lyons *et al.* 2016). Das Auftreten eines *Hydrocephalus internus* bei 33,3 % der Studienteilnehmer unterstreicht die schweren gesundheitlichen Probleme, welche mitunter bei brachyzephalen Katzen auftreten können. Im Hinblick auf die Vielzahl der gesundheitlichen Probleme dieser Tiere sollte insbesondere bei einer weiter forcierten züchterischen Reduktion des Gesichtsschädels ein Widerspruch zum §11b des

Tierschutzgesetzes überprüft werden. Über das Tierschutzgesetz soll abgesichert werden, dass durch die Zucht, auch durch die Umgestaltung bestimmter Körperteile, keine Leiden, Schäden oder Schmerzen für die Nachkommen entstehen dürfen (BMJV Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz). Dieser Grundsatz darf im Sinne der Tiere auf keinen Fall verletzt werden. Diese Arbeit soll somit ein Basiswerk zur Entwicklung gezielter Gentests darstellen, um in Zukunft gesunde Perserkatzen als Elterntiere für die Zucht spezifischer auswählen zu können.

### 5.1 Diskussion der Methoden

Zu Beginn der Studie lagen kaum genetische Informationen über mögliche Kandidatengene in Bezug auf die Schädelform der Perserkatze vor. Einen Hauptteil der Arbeit nahm daher die Identifizierung möglicher Kandidatengene in Anspruch. Durch die NGS war es möglich, das gesamte Genom von fünf Individuen zu sequenzieren. Hierbei wurden Perserkatzen mit unterschiedlichem Phänotyp gewählt; eine *doll-face* Katze mit normalen Hirnventrikeln, eine Perserkatze mit moderater Brachyzephalie und normalen Hirnventrikeln, *peke-face* Katzen mit steigenden kranialen Indices, Ventrikulomegalie, bekanntem Hydrozephalus und ein Individuum mit *Hydrocephalus internus* und bestätigter koronaler Kraniosynostose. Dabei wurde nach der Empfehlung von Gilissen *et al.* (2012) gehandelt und zum einen ein Individuum mit extremem Phänotyp und zum anderen zwei weitere *peke-face* Katzen aus der gleichen Familie gewählt. Die Tiere mit *doll-face* bzw. moderater Brachyzephalie wurden als Referenz bzw. schwach ausgeprägter Phänotyp betrachtet und wiesen zu den anderen drei Katzen keinen familiären Zusammenhang auf.

Die NGS konnte in der Vergangenheit häufiger dafür genutzt werden, zahlreiche kausale Mutationen und an der Entstehung von Krankheiten beteiligte Gene zu identifizieren (Ku *et al.* 2012). Allerdings entsteht durch diese Methode eine enorme Datenmenge und es kann zu falsch positiven wie auch falsch negativen Ergebnissen kommen. Deswegen wurden 16 hochinteressante Kandidatengene zusätzlich mittels IGV visuell überprüft (Tabelle 10). Dabei bestätigte sich allerdings in keinem der 16 untersuchten Gene eine zusätzliche Mutation im codierenden Bereich, welche einen Aminosäureaustausch und somit einen funktionellen Einfluss nach sich ziehen würde. Die Mutationen im Bereich von Exon 9 und 22 des *CNTN6*-Gens sowie im Exon 1 des *FOXL2*-Gens konnten in IGV verifiziert werden. Zwar erschien bei einem Individuum eine heterozygote Mutation im Bereich des *CNTN6*-Gens Exon 22 im IGV nicht eindeutig, diese konnte allerdings bei der späteren Genotypisierung des Tieres doch noch

verifiziert werden. Daher erzielte die NGS im vorliegenden Fall innerhalb der anhand der Literatur ausgewählten Kandidatengene keine falsch positiven oder falsch negativen Ergebnisse. Durch die enorme Zeitersparnis der NGS im Vergleich mit älteren Sequenzierungsverfahren und eine immer besser werdende Kosteneffizienz kommt es zu einer steigenden Bedeutung der NGS innerhalb der Genforschung (Pickrell *et al.* 2012). Allerdings wurde durch die bereits erwähnte sehr große Datenmenge, welche durch die Sequenzierung ganzer Genome entsteht, eine Filterung der Varianten nötig. Als erste Bedingung wurde das ausschließliche Auftreten der Varianten innerhalb der Perserkatzenpopulation gefordert. Trat diese Variante auch innerhalb der 15 Vergleichs-Genome anderer Katzenrassen auf, wurde sie herausgefiltert.

Anschließend wurde im Programm SnpEff der *impact* der jeweiligen Varianten bestimmt. In die Studie eingeschlossen wurden nur Varianten mit einem *impact* von mindestens moderat bis hoch. Die von den verbliebenen Varianten betroffenen Gene wurden dann einer intensiven Literaturrecherche unterzogen. Diese Datenreduktion, die zur Literaturrecherche nötig wurde und eine hohe Fehlerquelle der Studie darstellt, war notwendig, da eine vergleichbare Plattform zu geneTalk (Kamphans *et al.* 2012), polyPhen-2 (Adzhubei *et al.* 2010) oder MutationTaster (Schwarz *et al.* 2010), welche zur Filterung humaner Varianten im Hinblick auf ihr krankheitsverursachendes Potential genutzt werden können, bei der Katze bis dato nicht vorliegt. Daher musste auf die zeitintensive Recherche innerhalb der gängigen Datenbanken zurückgegriffen werden. Eine automatisierte Filterung der Daten durch standardisierte Pipelines könnte hier in Zukunft eine große Zeitersparnis mit sich bringen (Cirulli *et al.* 2010). Nach der Isolierung der Gene *CNTN6* und *FOXL2* als Kandidatengene erfolgte die Genotypisierung der Varianten innerhalb des Studienkollektivs mittels der Sanger-Sequenzierung. Einerseits stellt die klassische Sanger-Sequenzierung im Vergleich zur NGS derzeit noch die finanziell deutlich günstigere Methode dar. Vor allem ist sie heute aber noch immer der Goldstandard zur Detektion von Mutationen und sollte zur Verifizierung der Ergebnisse der NGS herangezogen werden, da die NGS nicht darauf ausgelegt ist, kleine DNA-Abschnitte gezielt zu untersuchen (Gilissen *et al.* 2012). In unserem Fall konnte die heterozygote Variante von Proband K528 nur durch eine zusätzliche Sanger-Sequenzierung bewiesen werden, was wiederum unterstreicht, dass eine Methode allein fehlerbehaftet sein kann.

## 5.2 Stammbaum

Anhand der Stammbaumanalyse konnte gezeigt werden, dass sich die Mutationen innerhalb des *CNTN6*- und *FOXL2*-Gens nicht auf eine isolierte Verpaarung zurückverfolgen lassen. Dies war notwendig, da fast 50 % der Tiere von einem gemeinsamen Züchter stammen. Die Mutationen traten allerdings innerhalb von zwei (*FOXL2*) beziehungsweise drei (*CNTN6*) Linien auf, welche über mindestens drei Generationen keine verwandtschaftlichen Beziehungen aufweisen. Ein reines Auftreten der Mutationen innerhalb einer Linie und eine hierdurch bedingte Verfälschung der Daten konnte daher ausgeschlossen werden. Die überdurchschnittliche Häufung der auftretenden Mutationen innerhalb des Stammbaums (66,6 % der untersuchten Tiere tragen mindestens ein mutiertes Allel) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die extreme Kurzköpfigkeit der Tiere dieser Zucht zurückzuführen. Ein Vererbungsmuster des *Hydrocephalus internus* konnte anhand des Stammbaumes nicht nachvollzogen werden, da hierfür die Daten von einigen Elterntieren fehlten.

## 5.3 Kandidatengene *CNTN6* und *FOXL2*

Nach der NGS der fünf Katzen und dem Abgleich mit den 15 Genomen anderer Katzenrassen verblieben 124.668 Varianten (Abbildung 26), welche durch Anforderungen an den *impact* auf Varianten in 72 bekannten Genen eingegrenzt werden konnten (Anhang Tabelle 22). Nach der visuellen Auswertung von 16 Kandidatengen (Tabelle 10) stellten sich die Mutationen im *FOXL2*- und *CNTN6*-Gen als die vielversprechendsten Kandidaten für die koronale Kraniosynostose und die damit einhergehende Brachyzehalie der Perserkatze dar. Ursächlich hierfür war ein durch Aminosäureaustausch bedingter moderater *impact*, die Verteilung der Varianten innerhalb der fünf genomsequenzierten Individuen (Tabelle 12), dessen Lage in hochkonservierten Bereichen der Proteine, sowie die Ergebnisse aus der Literaturrecherche.

Das *CNTN6*-Gen wurde neben dem *CHLI*-Gen bereits von Bertolini *et al.* (2016) als Kandidatengene für die Schädelform der Perserkatzen aufgeführt. In dieser Studie wurden ca. 800 Katzen unterschiedlicher Rassen genotypisiert. Die höchste Homogenität und die größte Abweichung zu nicht-Perser-Rassen fand man in einer Region des Chromosoms A2. In dieser Region liegen die Gene *CNTN6* und *CHLI*, wodurch sie zu hochinteressanten Kandidaten für die brachyzephale Schädelform wurden (Bertolini *et al.* 2016). Während in unserer Studie keine Varianten innerhalb des *CHLI*-Gens gefunden wurden, die die Einschlusskriterien erfüllten, konnten im *CNTN6*-Gen zwei Varianten isoliert werden. Das *CNTN6*-Gen der Katze liegt auf Chromosom A2 und enthält 24 Exons (Assembly *Felis\_catus\_9.0* (GCF\_000181335.3)). Diese

kodieren das Transmembranprotein CNTN6, welches zur Immunglobulin-Superfamilie gehört und in der neuronalen Entwicklung als Adhäsionsmolekül fungiert (Kashevarova *et al.* 2014). Durch den Basenaustausch im Exon 9 des *CNTN6*-Gens von A zu C kommt es bei der Proteinsynthese an der 304. Position zu einem Austausch der basischen Aminosäure Lysin in Glutamin (neutral) (Taylor 1986). Diese Position liegt in einer Immunglobulin Domäne des Proteins (O'Leary *et al.* 2016). Da der SNP im Exon 22 gekoppelt vererbt wird, kommt es bei betroffenen Tieren auch zu einem Austausch der neutralen Aminosäuren Phenylalanin zu Leucin an der 998. Position des CNTN6-Proteins. Diese Aminosäure liegt in einer Fibronectin Typ 3-Domäne des Proteins. Das gesamte CNTN6-Protein der Katze besteht aus 1062 Aminosäuren. Beim Menschen sind Varianten innerhalb des *CNTN6*-Gens mit motorischen Entwicklungsstörungen, geistigen Behinderungen und Autismus assoziiert. Einige der Betroffenen weisen zusätzlich Veränderungen der Schädelform und des Gehirns auf (Hu *et al.* 2015; Kashevarova *et al.* 2014).

*FOXL2* ist in der aktuellen Literatur in Bezug auf die Kraniosynostose des Menschen und der Brachycephalie von Hund oder Katze noch nicht in Erscheinung getreten. Allerdings beschreiben Marongiu *et al.* (2015) in ihrer Publikation den Phänotyp von *FOXL2*-Knockout-Mäusen. Die Mäuse weisen einen zum Wildtyp insgesamt kürzeren Schädel auf. Der Jochbogen ist komprimiert und es liegt eine koronale und sagittale Kraniosynostose vor. Dieser Phänotyp ähnelt dem der *peke-face* Perserkatze. Das *FOXL2*-Gen der Katze liegt auf Chromosom C2 und enthält ein Exon. Es kodiert den Transkriptionsfaktor Forkhead-box-Protein-L2. Durch den Basenaustausch G zu C kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Lysin (basisch) zur neutralen Aminosäure Asparagin an der 196. Position des Forkhead-box-Proteins-L2 (Taylor 1986). Das gesamte FOXL2-Protein der Katze besteht aus 379 Aminosäuren. Boulanger *et al.* (2014) untersuchte das *polled and intersexuality syndrome* (PIS) der Ziegen. Diese Tiere weisen unter anderem eine Hornlosigkeit auf. Sie kommen zu dem Schluss, dass ein Funktionsverlust des *FOXL2*-Gens zumindest beteiligt oder sogar ursächlich für die Entstehung von PIS der Ziegen ist. Die Pathophysiologie, wie es zur Entstehung der Hornlosigkeit kommt, ist allerdings noch nicht abschließend geklärt (Boulanger *et al.* 2014).

Alle drei Aminosäureaustausche liegen jeweils in einem Bereich von CNTN6 bzw. FOXL2, welcher hoch konserviert ist. Alle überprüften Aminosäuren sind selbst bei entfernten Arten, wie dem Haushuhn oder Schildkröte, an diesem Ort identisch. Das spricht für einen sehr hohen Konservierungsgrad der Proteine an dieser Position. Der Konservierungsgrad verschiedener Abschnitte innerhalb des Proteins beschreibt das Überdauern dieser Bereiche während der Evolution. Hoch konservierte Domänen haben zu einem evolutionären Vorteil geführt, was

wiederum darauf hinweist, dass diese Bereiche der Proteine für ihre Funktionalität essenziell sind. Ein Aminosäureaustausch in einem stark konservierten Bereich der Proteine, wie er hier an allen drei Positionen vorliegt, führt mit einer größeren Wahrscheinlichkeit zu einem veränderten Phänotyp, als Mutationen in weniger konservierten Bereichen. Ferner können die beiden Proteine über den nicht-kanonischen Notch-Signalweg agieren. Neben der klassischen Aktivierung des Notch-Signalweges über Proteine, die eine DSL-Domäne tragen (Abbildung 16), kann dieser auch über Liganden initiiert werden, denen diese Domäne fehlt. Unter diese nicht-kanonischen Liganden des Notch-Signalweges fallen verschiedene strukturell unterschiedliche Proteine, darunter integrale Membranproteine, mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Oberflächenproteine, sowie weitere sekretorische Proteine (D'Souza *et al.* 2010). Zu den integralen Membranproteinen, die den nicht-kanonischen Notch-Signalweg aktivieren können, gehören der Delta-like 1 (Dlk1) Ligand (Bachmann *et al.* 1996), nach den neuesten Erkenntnissen aus der Sequenzdatenanalyse das Jagged und Delta-Protein (Jedi) (Krivtsov *et al.* 2007) und der Delta/Notch-like-EGF-related-Rezeptor (DNER) (Eiraku *et al.* 2002). Eine Hochregulierung von DNER konnte Marongiu *et al.* (2015) bei den *FOXL2*-Knockout-Mäusen feststellen, was wiederum zu einer Aktivierung des nicht-kanonischen Notch-Signalweges geführt hat. Bei DNER handelt es sich um ein Transmembranprotein mit extrazellulären EGF-ähnlichen Wiederholungen (Eiraku *et al.* 2002). Eine veränderte Funktion des *FOXL2*-Proteins der Katze könnte analog dazu ebenso zu einer Hochregulierung von DNER und somit einer Aktivierung des nicht-kanonischen Notch-Signalweges führen.

In die Klasse der GPI verankerten Oberflächenproteine fällt das in dieser Studie untersuchte Contactin 6 (CNTN6), welches auch unter dem Namen NB-3 bekannt ist. Auch dieses kann den nicht-kanonischen Notch-Signalweg anregen (Cui *et al.* 2004; Hu *et al.* 2003). Cui *et al.* (2004) untersuchten an Oligodendrozyten die Signalkaskade, die auf eine Bindung von CNTN6 an den Notch-1-Rezeptor folgt. Nach Cui *et al.* (2004) interagiert das Contactin mit den EGFs distal zu den Bindungsstellen der DSL-Liganden. Während diese im Bereich der 11–12 EGF-ähnlichen Wiederholung binden, interagiert NB-3 mit einer Region des Rezeptors, welche die Wiederholungen 22–34 umfasst (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Durch die Bindung von CNTN6 an den Notch-Rezeptor kommt es auch zu einer  $\gamma$ -Sekretase-abhängigen Abspaltung von NICD, die dann allerdings nicht mit der CSL-Familie, sondern mit dem Transkriptionsfaktor Deltex1 interagiert und schließlich zur Aktivierung der Zielgene führt (Cui *et al.* 2004) (Abbildung 46).



## Diskussion

Da beide Proteine über denselben Signalweg agieren können, wäre eine Synergistenwirkung analog zu dem von Sharma *et al.* (2013) untersuchten Zusammenspiel von TCF12 und TWIST1 denkbar. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sich bei einer Haploinsuffizienz von TCF12 und einem zusätzlichen heterozygoten Funktionsverlust von TWIST1 eine schwerere Form der koronale Kraniosynostose ausbildet, als bei der isolierten Haploinsuffizienz von TCF12. Hierfür reicht der Aufbau dieser Studie allerdings nicht aus und die Theorie sollte in weiteren Versuchen validiert werden.

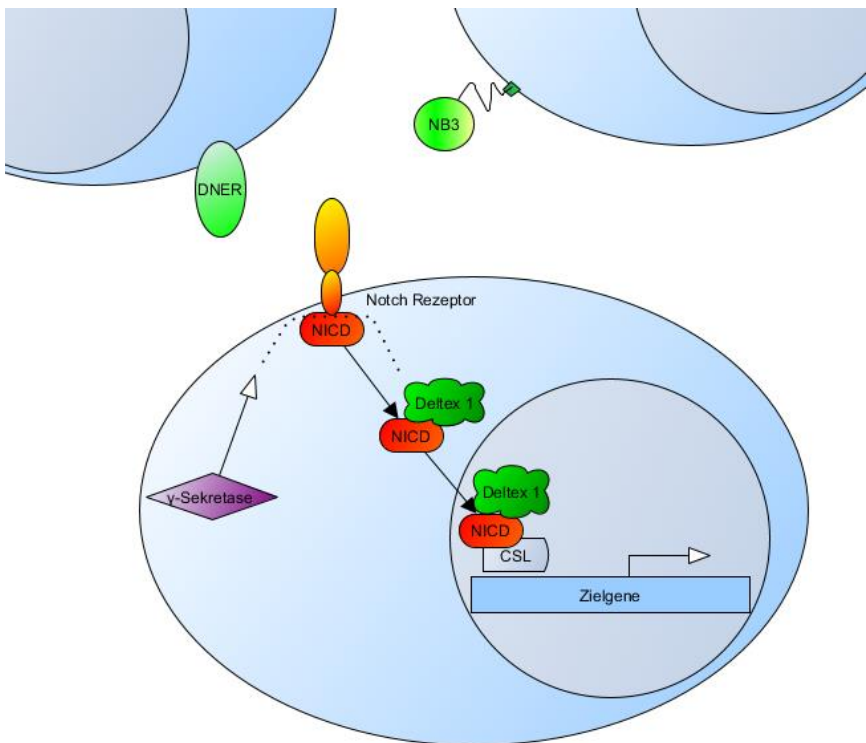


Abbildung 46: Nicht-kanonischer Notch-Signalweg mit DNER und NB3 (CNTN6) als Ligand, modifiziert nach Katoh *et al.* (2007).

## Diskussion

Bei Auswertung der Ergebnisse fiel insbesondere auf, dass Tiere mit einer heterozygoten Mutation im *FOXL2*- und *CNTN6*-Gen einen signifikant kürzeren Schädel (höheren kranialen Index) ( $p = 0,002$ ) als Katzen ohne Mutation aufwiesen. Des Weiteren wiesen auch die Tiere der Gruppe 5, bei welchen in einem der beiden Gene die Mutation homozygot und im anderen heterozygot vorliegt, einen schwach signifikant kürzeren Schädel auf, als Tiere ohne Mutation ( $p = 0,045$ ). Bei Tieren mit einer heterozygoten (Gruppe 2) oder homozygoten (Gruppe 3) Mutation in nur einem der Gene konnte kein signifikanter Effekt auf einen höheren kranialen Index beobachtet werden. Wenn man beachtet, dass beide Proteine denselben Signalweg benutzen können, wäre die veränderte Aktivierung der Zielgene über einen abgewandelten Aufbau des *FOXL2*-Proteins als auch des *CNTN6*-Proteins und die daraus resultierende potenzierende Auswirkung auf die Suturformation eine durchaus plausible Erklärung für dieses Ergebnis. Zu bemerken ist auch, dass alle Gruppen zusammengenommen, in welcher mindestens eine heterozygote Mutation in mindestens einem der Gene vorlag (Gruppe 2-4), einen signifikant größeren kranialen Index aufwiesen ( $p = 0,005$ ), als die Tiere, bei welchen keine Mutation vorlag (Gruppe 1). Die nicht signifikanten Ergebnisse der Gruppe 2 und 3 könnten auch durch die kleinen Gruppengrößen bedingt gewesen sein. Probanden bei denen sowohl das SNP im *FOXL2*- als auch die SNPs im *CNTN6*-Gen homozygot vorlagen, waren leider nicht unter den Studienteilnehmern. Eine Untersuchung dieser wäre aber für die Zukunft höchst interessant.

Insgesamt scheint die Mutation innerhalb des *FOXL2*-Gens in dieser Studie einen deutlicheren Effekt auf die Schädelgröße der Probanden zu haben. Der Einfluss der Mutationen innerhalb des *CNTN6*-Gens, welche nach Auswertung der Ergebnisse gekoppelt vererbt werden, auf die Ausprägung der Schädelform war im Studienkollektiv mit schwach signifikanten Ergebnissen eher klein. Allerdings konnte auch die Mutation im *FOXL2*-Gen nicht bei allen *peke-face* Perserkatzen nachgewiesen werden. So waren im Studienkollektiv auch *peke-face* Perserkatzen mit einem sehr hohen kranialen Index (zum Beispiel Tabelle 14: Patient 49, 51, 54) vertreten, welche weder die Variante im *FOXL2*- noch im *CNTN6*-Gen trugen. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt im multifaktoriellen und vermutlich auch polygenen Ursprung der Brachyzehalie (Stockard 1941). Neben den oben genannten sind an der Schädelentwicklung noch viele weitere Gene beteiligt (Kapitel 2.4), die bei einer veränderten Funktion ebenso zur Entwicklung einer brachyzehalen Kopfform beitragen können. Auch die heterogene Ausprägung der Schädelformen der Perserkatzen, die von Schlueter *et al.* (2009) anhand ihres Brachyzehaliegrades in vier Gruppen eingeteilt werden konnten, unterstützen die Annahme des polygenen Ursprungs der Brachyzehalie der Perserkatze. Die Ergebnisse von

vorangegangenen Studien zur Kurzköpfigkeit beim Hund legen ebenso einen polygenen Ursprung nahe. Die kausalen Mutationen konnten hier bei einigen brachycephalen Rassen nicht nachvollzogen werden. So konnte die Mutation im *BMP3*-Gen bei mittelgroßen und großen brachycephalen Rassen nicht nachgewiesen werden (Schoenebeck *et al.* 2013; Marchant *et al.* 2017). Hingegen sollte hierbei beachtet werden, dass einige kausale monogene Mutationen rassespezifisch auftreten, wie z.B. die progressive Retinaatrophie (PRA) beim Shetland Sheepdog (Sheltie) und daher nicht zwangsläufig eine Polygenie vorliegen muss. Allerdings wird auch bei der PRA des Shelties mindestens eine weitere ursächliche Mutation vermutet, da nicht bei allen PRA-Fällen die Mutation im *CNGA1*-Gen identifiziert werden konnte (Wiik *et al.* 2015). Auch in unserer Studie konnten die Mutationen nicht bei allen *peke-face* Perserkatzen identifiziert werden. 20 Katzen mit einem kranialen Index  $> 83,00$ , und somit 48,8 % der untersuchten Tiere, wiesen kein verändertes Allel auf (Tabelle 14). Das zeigt wiederum, dass die Mutationen innerhalb beider Gene nicht alleinig für die Schädelform der Tiere verantwortlich sein können.

Vertreter der Gruppe *doll-face* oder Perserkatzen mit moderater Brachyzehalie wiesen keine der untersuchten Mutationen auf, was wiederum die Vermutung auf ihren Einfluss auf die Entwicklung einer brachycephalen Kopfform bestärkt. In der Humanmedizin konnten für die Entstehung einer koronalen Kraniosynostose ursächliche Mutationen allerdings auch bei phänotypisch gesunden Kindern nachgewiesen werden. In der Studie von Sharma *et al.* (2013) über Mutationen im *TCF12*-Gen lag die Nicht-Penetranz bei 47 %. Das bedeutet, dass 47 % der positiv auf die Mutation getesteten Personen keine klinischen Symptome bzw. den zu erwartenden Phänotyp aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen von Schoenebeck *et al.* (2013). Sie konnten die im *BMP3*-Gen als kausale Missense-Mutation für die Brachyzehalie beim Hund bekannte Variante auch bei einer dolichocephalen Rasse, dem Scottish Terrier, nachweisen. Diese Nicht-Penetranz der Mutationen, welche auch bei den Perserkatzen auftreten könnte, stärkt wiederum die Vermutung des polygenen Ursprungs der Brachyzehalie und sollte in folgenden Studien unbedingt bedacht werden. Ein Nachweis der Mutation bei gesunden *doll-face* Perserkatzen schließt eine kausale Mutation für die Entwicklung eines brachycephalen Schädels also nicht aus.

Der kraniale Index zeigte in dieser Studie einen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten eines *Hydrocephalus internus* bei Perserkatzen. Dies stimmt unter anderem mit den Ergebnissen von Rusbridge *et al.* (2021) überein, die in ihrer Studie eine Prädisposition von brachycephalen Hunden und Katzen für die Entwicklung eines *Hydrocephalus internus* zeigen konnten. Das gehäufte Auftreten eines kongenitalen Hydrozephalus bei den brachycephalen

Hunderassen Mops, Pekiniese, Lhasa Apso, Boston Terrier und Englische Bulldogge weist ebenso auf eine Prädisposition durch die Schädelform hin (Selby *et al.* 1979). Bei Kindern, die an einer koronalen Kraniosynostose leiden, ist der Hydrozephalus ein häufiger Befund (Cinalli *et al.* 1998). Bei der syndromischen Form der Kraniosynostose zeigen 12–15 % der Erkrankten einen Hydrozephalus, Betroffene des Pfeiffer-Syndroms weisen sogar zu 88 % einen Hydrozephalus auf (Frassanito *et al.* 2021).

Die untersuchten Varianten im *FOXL2*- und *CNTN6*-Gen zeigten stattdessen keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten eines *Hydrocephalus internus*. Allerdings konnten nur bei 8,7 % (*FOXL2*) bzw. 13 % (*CNTN6*) der „gesunden“ Perserkatzen die Mutationen nachgewiesen werden, während 66,7 % (*FOXL2*) bzw. 44,6 % (*CNTN6*) der am *Hydrocephalus internus* erkrankten Tiere die Mutation trugen. Wie schon bei der Brachycephalie wird auch beim Hydrozephalus die Identifikation kausaler Genmutationen durch die Nicht-vollständige-Penetranz der Mutationen und den multifaktoriellen Ursprung des Hydrozephalus erschwert. Neben einer genetischen Ursache können unter anderem auch Infektionen (Schinazi *et al.* 1995; Tsunoda *et al.* 1997) oder eine Exposition mit Röntgenstrahlung während der embryonalen Entwicklung (Aolad *et al.* 2000) zur Ausbildung eines Hydrozephalus führen. Beim Menschen wird bei ca. 40 % der an einem Hydrozephalus erkrankten Personen eine genetische Ursache angenommen (Haverkamp *et al.* 1999). Bei den H-TX Ratten, einem genetischen Modell mit kongenitalem Hydrozephalus, wird ein autosomal rezessiver Erbgang des kausalen Gens mit inkompletter Penetranz vermutet. Das ursächliche Gen konnte allerdings noch nicht identifiziert werden (Cai *et al.* 2000). Lin *et al.* (2013) fanden die genetische Ursache für einen Hydrozephalus bei der Maus in einer Deletion des *RND3*-Gens. Durch den Ausfall des Gens kommt es zur Hochregulation des Notch-Signalweges und dadurch zur Proliferation der Ependymzellen des *Aquaeductus mesencephali*. Die Stenose, die hierdurch entsteht, führt in Folge zur Ausbildung des *Hydrocephalus internus*. Eine Stenose des *Aquaeductus mesencephali* lag bei den Perserkatzen dieser Studie allerdings nicht vor. Weitere Arbeiten zeigen, dass eine Dysregulation des Notch-Signalweges zu schweren Fehlentwicklungen des Gehirns inklusive Hydrozephalus führen kann (Klezovitch *et al.* 2004; Kuo *et al.* 2006). Da beide in dieser Arbeit untersuchten Gene über diesen Signalweg agieren können, sollten sie trotz fehlender signifikanter Ergebnisse in weiteren Studien auf ihren kausalen Einfluss bei der Entwicklung eines Hydrozephalus überprüft werden.

## 6 Zusammenfassung

Die brachycephale Kopfform, die sich zu einem bedeutenden Zuchtziel der Perserkatze herausbildete, zeichnet sich durch eine stark reduzierte Länge und erweiterte Breite des Schädels aus. Durch diese forcierte Zucht entstand aus der klassischen *doll-face* Perserkatze die Zuchtrichtung der *peke-face* Katzen mit einer extremen Brachyzephalie. Diese Kopfform geht mit schweren gesundheitlichen Problemen einher, darunter auch das vermehrte Auftreten eines *Hydrocephalus internus*. Eine koronale Kraniosynostose konnte mit Hilfe von Micro-CT und histologischen Untersuchungen als Ursache für diese Schädelform herausgestellt werden. Ziel dieser Studie war es, Kandidatengene für die koronale Kraniosynostose und die daraus resultierende Brachyzephalie zu identifizieren und im Studienkollektiv zu evaluieren. Hierfür wurde mittels *next generation sequencing* das gesamte Genom von fünf Katzen sequenziert. Darunter befanden sich drei *peke-face* Perserkatzen, eine Perserkatze mit moderater Brachyzephalie und eine *doll-face* Perserkatze. Im Anschluss wurden die Varianten durch Vergleiche mit anderen Katzenrassen, Anforderungen an den *impact* der Varianten und einer intensiven Literaturrecherche gefiltert. Daraufhin wurden 16 Kandidatengene (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *IHH*, *MSX2*, *RAB23*, *RUNX2*, *TCF12*, *TWIST1*, *ZIC1*, *ALX1*, *BMP3*, *SMOC2*, *CHL1*, *CNTN6*, *FOXL2*) weiter untersucht und im Anschluss ausgewählte Varianten innerhalb der vielversprechendsten Kandidatengene *FOXL2* und *CNTN6* im Studienkollektiv der 54 Perserkatzen mittels Sanger-Sequenzierung genotypisiert. Die untersuchten Mutationen im *CNTN6*-Gen sowie auch die Mutation im *FOXL2*-Gen liegen in hochkonservierten Bereichen der Proteine und führen jeweils zu einem Aminosäureaustausch. Des Weiteren können sowohl das *CNTN6*- als auch *FOXL2*-Protein über den nicht-kanonischen Notch-Signalweg agieren. Der Notch-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und dem Verschluss der Schädelsuturen. Durch vorliegende Daten zum kranialen Index und der Morphologie der Gehirnventrikel wurde ein möglicher Zusammenhang der Varianten mit einer Brachyzephalie und dem Auftreten eines *Hydrocephalus internus* analysiert. Unter den untersuchten Perserkatzen waren sechs *doll-face* Perserkatzen (Kontrollgruppe), sieben Perserkatzen mit moderater Brachyzephalie und 41 *peke-face* Perserkatzen. Insbesondere Tiere, bei welchen sowohl die untersuchten Mutationen im *CNTN6*-Gen als auch die Mutation im *FOXL2*-Gen heterozygot vorlagen, hatten einen signifikant kürzeren Schädel (höheren kranialen Index). Isoliert betrachtet hatten die Mutationen nur einen schwach signifikanten Einfluss auf den kranialen Index. Die Mutationen konnten ausschließlich bei den *peke-face* Perserkatzen gefunden werden, während Vertreter der *doll-face* Perserkatzen und moderat betroffene Tiere ausschließlich Träger des Wildtyps waren. Allerdings konnten nicht bei allen *peke-face*

## Zusammenfassung

Perserkatzen die Mutationen identifiziert werden, was an dem vermutlich polygenen Ursprung der Brachycephalie liegen könnte. Zudem wurden die Daten über das Vorliegen von einem *Hydrocephalus internus* bei 41 der Perserkatzen aus der Studiengruppe mit einbezogen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem steigenden kranialen Index und dem Auftreten eines *Hydrocephalus internus*. Das Geschlecht und die Mutationen innerhalb des *CNTN6*- sowie *FOXL2*-Gens hatten stattdessen keinen signifikanten Einfluss.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass die Mutationen im *CNTN6*- und *FOXL2*-Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Brachycephalie der Perserkatze beteiligt sind, allerdings nicht alleinig dafür verantwortlich sein können. Dies passt zu einer wahrscheinlichen polygenen Vererbung. Da mit der Brachycephalie hochgradige gesundheitliche Probleme für die betroffenen Tiere einhergehen, sollte eine weitere forcierte Zucht auf dieses Merkmal dringend unterlassen werden. Ob die in dieser Arbeit gefundenen Genvarianten für eine Selektion dagegen hilfreich sein könnten, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

## 7 Summary

The brachycephalic shape of the head, which has become an important breeding goal for the Persian cat, is characterized by a greatly reduced length and increased width of the skull. This forced breeding resulted in the production of peke-face cats with extreme brachycephaly from the classic doll-face Persian cat. This head shape is associated with serious health problems, including the increased occurrence of internal hydrocephalus. A coronal craniosynostosis was found to be the cause of this skull shape using micro-CT and histological investigations. The aim of this study was to identify candidate genes for coronal craniosynostosis and the resulting brachycephaly and to evaluate them in the study collective. For this purpose, the entire genome of five cats was sequenced using next generation sequencing. These included three peke-face Persians, one Persian with moderate brachycephaly, and one doll-face Persian. The variants were then filtered through comparisons with other cat breeds, impact requirements and an intensive literature search. Subsequently, 16 candidate genes (FGFR1, FGFR2, FGFR3, IHH, MSX2, RAB23, RUNX2, TCF12, TWIST1, ZIC1, ALX1, BMP3, SMOC2, CHL1, CNTN6, FOXL2) were further investigated and subsequently selected variants within the most promising candidate genes FOXL2 and CNTN6 genotyped in the study collective of 54 Persian cats using Sanger sequencing. The investigated mutations in the CNTN6 gene as well as the mutation in the FOXL2 gene are located in highly conserved areas of the proteins and each lead to an amino acid exchange. Furthermore, both the CNTN6 and FOXL2 proteins can act via the non-canonical Notch signaling pathway. The Notch signaling pathway is one of the most important pathways in the development and closure of cranial sutures. Based on available data on the cranial index and the morphology of the cerebral ventricles, a possible connection between the variants and brachycephaly and the occurrence of internal hydrocephalus was analysed. Among the Persians studied there were six doll-face Persians (control group), seven Persians with moderate brachycephaly, and 41 peke-face Persians. In particular, animals in which both the investigated mutations in the CNTN6 gene and the mutation in the FOXL2 gene were heterozygous, had a significantly shorter skull (higher cranial index). Viewed in isolation, the mutations had only a weakly significant effect on the cranial index. The mutations were found exclusively in the peke-face Persian cats, while representatives of the doll-face Persian cats and moderately affected animals were exclusively wild-type carriers. However, the mutations could not be identified in all peke-face Persian cats, which could be due to the presumably polygenic origin of brachycephaly. In addition, data on the presence of internal hydrocephalus in 41 of the Persian cats in the study group were included. There was a significant connection between an increasing cranial index and the occurrence of internal

## Summary

hydrocephalus. Gender and mutations within the CNTN6 and FOXL2 genes had no significant effect. The results of this study suggest that mutations in the CNTN6 and FOXL2 genes are highly likely to be involved in brachycephaly in the peke-face Persian cat, but cannot be solely responsible. This fits a probable polygenic inheritance. Since brachycephaly is associated with severe health problems for the affected animals, further breeding for this trait should be ceased. Further investigations must show whether the gene variants found in this work could be helpful for selection.



## V. Literaturverzeichnis

- Adzhubei, I.**; Schmidt, S.; Peshkin, L.; Ramensky, V.; Gerasimova, A.; Bork, P. et al. (2010): A method and server for predicting damaging missense mutations. In: *Nature methods* 7 (4), S. 248–249.
- Alappat, S.**; Zhang, Z.; Chen, Y. (2003): Msx homeobox gene family and craniofacial development. In: *Cell research* 13 (6), S. 429–442.
- Alliston, T.**; Choy, L.; Ducy, P.; Karsenty, G.; Derynck, R. (2001): TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfal and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. In: *The EMBO journal* 20 (9), S. 2254–2272.
- Amberger, J.**; Bocchini, C.; Hamosh, A. (2011): A new face and new challenges for Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®). In: *Human mutation* 32 (5), S. 564–567.
- Aolad, H.**; Inouye, M.; Darmanto, W.; Hayasaka, S.; Murata, Y. (2000): Hydrocephalus in mice following X-irradiation at early gestational stage. Possibly due to persistent deceleration of cell proliferation. In: *Journal of radiation research* 41 (3), S. 213–226.
- Artavanis-Tsakonas, S.** (1999): Notch Signaling. Cell Fate Control and Signal Integration in Development. In: *Science* 284 (5415), S. 770–776.
- Bächli, H.**; Lütschg, J.; Messing-Jünger, M. (Hg.) (2018): Pädiatrische Neurochirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bachmann, E.**; Krogh, T.; Hojrup, P.; Skjodt, K.; Teisner, B. (1996): Mouse fetal antigen 1 (mFA1), the circulating gene product of mdlk, pref-1 and SCP-1. Isolation, characterization and biology. In: *Reproduction* 107 (2), S. 279–285.
- Backhaus, K.**; Erichson, B.; Plinke, W.; Weiber, R. (2011): Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung;. 13., überarbeitete Auflage. Berlin, Dordrecht, London, New York: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Badve, C.**; K, M.; Iyer, R.; Ishak, G.; Khanna, P. (2013): Craniosynostosis. Imaging review and primer on computed tomography. In: *Pediatric radiology* 43 (6), 728-42; quiz 725-7.
- Baer, M.** (1954): Patterns of growth of the skull as revealed by vital staining. In: *Human biology* 26 (2), S. 80–126.

**Bahamonde, M.;** Lyons, K. (2001): BMP3. To be or not to be a BMP. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 83-A Suppl 1 (Pt 1), S56-62.

**Beenken, A.;** Mohammadi, M. (2009): The FGF family. Biology, pathophysiology and therapy. In: *Nature reviews. Drug discovery* 8 (3), S. 235–253.

**Behr, B.;** Longaker, M.; Quarto, N. (2010): Differential activation of canonical Wnt signaling determines cranial sutures fate. A novel mechanism for sagittal suture craniosynostosis. In: *Developmental biology* 344 (2), S. 922–940.

**Bellus, G.;** Gaudenz, K.; Zackai, E.; Clarke, L.; Szabo, J.; Francomano, C.; Muenke, M. (1996): Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. In: *Nature genetics* 14 (2), S. 174–176.

**Bertolini, F.;** Gandolfi, B.; Kim, E.; Haase, B.; Lyons, L.; Rothschild, M. (2016): Evidence of selection signatures that shape the Persian cat breed. In: *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 27 (3-4), S. 144–155.

**Bialek, P.;** Kern, B.; Yang, X.; Schrock, M.; Sobic, D.; Hong, N. et al. (2004): A Twist Code Determines the Onset of Osteoblast Differentiation. In: *Developmental Cell* 6 (3), S. 423–435.

**Blount, J.;** Louis, R.; Tubbs, R.; Grant, J. (2007): Pansynostosis. A review. In: *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 23 (10), S. 1103–1109.

BMJV Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz: Tierschutzgesetz. TierSchG, vom 18.05.2006. Fundstelle: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>, zuletzt geprüft am 07.03.2021.

**Boulanger, L.;** Pannetier, M.; Gall, L.; Allais-Bonnet, A.; Elzaïat, M.; Le Bourhis, D. et al. (2014): FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. In: *Current biology : CB* 24 (4), S. 404–408.

**Boulet, S.;** Rasmussen, S.; Honein, M. (2008): A population-based study of craniosynostosis in metropolitan Atlanta, 1989-2003. In: *American journal of medical genetics. Part A* 146A (8), S. 984–991.

**Box, G.;** Tidwell, P. (1962): Transformation of the Independent Variables. In: *Technometrics* 4 (4), S. 531–550.

**Braund, K.** (1994): Clinical syndromes in veterinary neurology. 2nd ed. St. Louis: Mosby.

**Breit, S.**; Künzel, W.; Ooppel, M. (2003): The course of the nasolacrimal duct in brachycephalic cats. In: *Anatomia, histologia, embryologia* 32 (4), S. 224–227.

Broad Institute (Hg.) (2021): Picard toolkit, zuletzt aktualisiert am 05.06.2021.

**Buselmaier, W.**; Tariverdian, G. (2007): Humangenetik. 4., neu bearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch).

**Cai, X.**; McGraw, G.; Pattisapu, J.; Kalm, L. von; Willingham, S.; Socci, D.; Gibson, J. (2000): Hydrocephalus in the H-Tx rat. A monogenic disease? In: *Experimental neurology* 163 (1), S. 131–135.

**Case, L.**; Helms, K. (2003): The cat. Its behavior, nutrition and health.

**Celeste, A.**; Iannazzi, J.; Taylor, R.; Hewick, R.; Rosen, V.; Wang, E.; Wozney, J. (1990): Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (24), S. 9843–9847.

**Chew-Lim, M.** (1976): Hydrocephalus and anasarca in a Pekingese litter. In: *Veterinary Record* 99 (21), S. 424–425.

**Chiang, C.**; Litingtung, Y.; Lee, E.; Young, K.; Corden, J.; Westphal, H.; Beachy, P. (1996): Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. In: *Nature* 383 (6599), S. 407–413.

**Cinalli, G.**; Sainte-Rose, C.; Kollar, E.; Zerah, M.; Brunelle, F.; Chumas, P. et al. (1998): Hydrocephalus and craniosynostosis. In: *Journal of neurosurgery* 88 (2), S. 209–214.

**Cingolani, P.**; Platts, A.; Le Wang, L.; Coon, M.; Nguyen, T.; Wang, L. et al. (2012): A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. In: *Fly* 6 (2), S. 80–92.

**Cirulli, E.**; Goldstein, D. (2010): Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. In: *Nature reviews. Genetics* 11 (6), S. 415–425.

**Clevers, H.**; Nusse, R. (2012): Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. In: *Cell* 149 (6), S. 1192–1205.

**Cohen, J.** (2013): Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. 2nd ed. Hoboken: Taylor and Francis.

- Cohen, M.** (Hg.) (2000): *Craniosynostosis. Diagnosis, evaluation, and management*. 2nd ed. New York: Oxford Univ. Press.
- Cohen, S.**; Persing, J. (1998): Intracranial pressure in single-suture craniosynostosis. In: *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association* 35 (3), S. 194–196.
- Collmann, H.**; Sörensen, N.; Krauss, J. (2005): Hydrocephalus in craniosynostosis. A review. In: *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 21 (10), S. 902–912.
- Cordle, J.**; Redfieldz, C.; Stacey, M.; van der Merwe, P.; Willis, A.; Champion, B. et al. (2008): Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (17), S. 11785–11793.
- Corgozinho, K.**; Pereira, A.; Cunha, S.; Damico, C.; Ferreira, A.; Souza, H. de (2012): Recurrent pulmonary edema secondary to elongated soft palate in a cat. In: *Journal of Feline Medicine and Surgery* 14 (6), S. 417–419.
- Coussens, A.**; Wilkinson, C.; Hughes, I.; Morris, C.; van Daal, A.; Anderson, P.; Powell, B. (2007): Unravelling the molecular control of calvarial suture fusion in children with craniosynostosis. In: *BMC genomics* 8, S. 458.
- Cui, X.-Y.**; Hu, Q.-D.; Tekaya, M.; Shimoda, Y.; Ang, B.-T.; Nie, D.-Y. et al. (2004): NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (24), S. 25858–25865.
- D'Souza, B.**; Meloty-Kapella, L.; Weinmaster, G. (2010): Canonical and non-canonical Notch ligands. In: *Current topics in developmental biology* 92, S. 73–129.
- Dailey, L.**; Ambrosetti, D.; Mansukhani, A.; Basilico, C. (2005): Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. In: *Cytokine & growth factor reviews* 16 (2), S. 233–247.
- Dattalo, P.** (2013): *Analysis of multiple dependent variables*. New York: Oxford University Press (Pocket guides to social work research methods).
- David, L.**; Wilson, J.; Watson, N.; Argenta, L. (1996): Cerebral Perfusion Defects Secondary to Simple Craniosynostosis. In: *Journal of Craniofacial Surgery* 7 (3), S. 177–185.
- DeLahunta, A.**; Glass, E. (2009): *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology*. 3rd ed. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier.

- DePristo, M.;** Banks, E.; Poplin, R.; Garimella, K.; Maguire, JR; Hartl, C. et al. (2011): A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. In: *Nature genetics* 43 (5).
- Derynck, R.;** Akhurst, R. (2007): Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. In: *Nature Cell Biology* 9 (9), S. 1000–1004.
- Dewey, C.;** Da Costa, R. (2016): Practical guide to canine and feline neurology. Third edition. Chichester, West Sussex, Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Dijke, P.;** Heldin, C.-H. (Hg.) (2006): Smad Signal Transduction. Smads in Proliferation, Differentiation and Disease. Dordrecht: Springer (Proteins and Cell Regulation, 5).
- Dinneen, L.;** Blakesley, B. (1973): Algorithm AS 62. A Generator for the Sampling Distribution of the Mann-Whitney U Statistic. In: *Applied Statistics* 22 (2), S. 269.
- Dorey, K.;** Amaya, E. (2010): FGF signalling. Diverse roles during early vertebrate embryogenesis. In: *Development (Cambridge, England)* 137 (22), S. 3731–3742.
- Driscoll, C.;** Menotti-Raymond, M.; Roca, A.; Hupe, K.; Johnson, W.; Geffen, E. et al. (2007): The Near Eastern origin of cat domestication. In: *Science (New York, N.Y.)* 317 (5837), S. 519–523.
- Eggenschwiler, J.;** Espinoza, E.; Anderson, K. (2001): Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. In: *Nature* 412 (6843), S. 194–198.
- Eggermann, T.;** Soellner, L.; Kurth, I.; Eggermann, K.; Begemann, M. (2018): Next Generation Sequencing (NGS) von DNA. Mehr Informationen durch mehr Daten? In: *BU praktisch* (1), zuletzt geprüft am 17.12.2020.
- Eiraku, M.;** Hirata, Y.; Takeshima, H.; Hirano, T.; Kengaku, M. (2002): Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (28), S. 25400–25407.
- Estey, C.** (2016): Congenital Hydrocephalus. In: *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 46 (2), S. 217–229.
- Evans, H.;** Lahunta, A. de (2013): Miller's Anatomy of the Dog - E-Book: Elsevier Health Sciences.

- Farnworth, M.;** Chen, R.; Packer, R.; Caney, S.; Gunn-Moore, D. (2016): Flat Feline Faces. Is Brachycephaly Associated with Respiratory Abnormalities in the Domestic Cat (*Felis catus*)? In: *PloS one* 11 (8), e0161777.
- Fei, Y.;** Xiao, L.; Doetschman, T.; Coffin, D.; Hurley, M. (2011): Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (47), S. 40575–40583.
- Florisson, J.;** van Veelen, M.-L.; Bannink, N.; van Adrichem, L.; van der Meulen, J.; Bartels, M.; Mathijssen, I. (2010): Papilledema in isolated single-suture craniosynostosis. Prevalence and predictive factors. In: *The Journal of craniofacial surgery* 21 (1), S. 20–24.
- Frassanito, P.;** Palombi, D.; Tamburrini, G. (2021): Craniosynostosis and hydrocephalus. Relevance and treatment modalities. In: *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*.
- Freudspurger, C.;** Castrillón-Oberndorfer, G.; Hoffmann, J.; Engel, M. (2013): Isolierte, nichtsyndromale Kraniosynostosen. In: *MKG-Chirurg* 6 (4), S. 301–313.
- Fürthauer, M.;** Lin, W.; Ang, S.-L.; Thisse, B.; Thisse, C. (2002): Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. In: *Nature Cell Biology* 4, 170 EP -.
- Gault, D.;** Renier, D.; Marchac, D.; Jones, B. (1992): Intracranial pressure and intracranial volume in children with craniosynostosis. In: *Plastic and Reconstructive Surgery* 90 (3), S. 377–381.
- Gilbert, J.;** Cray, J.; Kreithen, A.; Marazita, M.; Cooper, G.; Losee, J. et al. (2017): Genetic Homozygosity and Phenotypic Variability in Craniosynostotic Rabbits. In: *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association* 54 (1), S. 94–99.
- Gillissen, C.;** Hoischen, A.; Brunner, H.; Veltman, J. (2012): Disease gene identification strategies for exome sequencing. In: *European journal of human genetics : EJHG* 20 (5), S. 490–497.
- Ginn, J.;** Kumar, M.; McKiernan, B.; Powers, B. (2008): Nasopharyngeal turbinates in brachycephalic dogs and cats. In: *Journal of the American Animal Hospital Association* 44 (5), S. 243–249.

- Gonzalez, S.;** Hayward, R.; Jones, B.; Lane, R. (1997): Upper airway obstruction and raised intracranial pressure in children with craniosynostosis. In: *European Respiratory Journal* 10 (2), S. 367–375.
- Grabb, W.;** Smith, J.; Aston, S.; Beasley, R.; Thorne, C. (1997): Grabb and Smith's plastic surgery. Pyo, D., and Persing, J. A. Craniosynostosis. In S. Ashton, Pyo, D., and Persing, J. A. Craniosynostosis. In S. Ashton, Craniosynostosis. 5th ed. Philadelphia: Lippicott-Raven.
- Greitz, D.** (2004): Radiological assessment of hydrocephalus. New theories and implications for therapy. In: *Neurosurgical review* 27 (3), 145-65; discussion 166-7.
- Hacohen, N.;** Kramer, S.; Sutherland, D.; Hiromi, Y.; Krasnow, M. (1998): sprouty Encodes a Novel Antagonist of FGF Signaling that Patterns Apical Branching of the Drosophila Airways. In: *Cell* 92 (2), S. 253–263.
- Hartley, C.** (2010): Aetiology of corneal ulcers assume FHV-1 unless proven otherwise. In: *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12 (1), S. 24–35.
- Harvey, C.** (1989): Inherited and congenital airway conditions. In: *J Small Animal Practice* 30 (3), S. 184–187.
- Haverkamp, F.;** Wölfle, J.; Aretz, M.; Krämer, A.; Höhmann, B.; Fahnenstich, H.; Zerres, K. (1999): Congenital hydrocephalus internus and aqueduct stenosis. Aetiology and implications for genetic counselling. In: *European journal of pediatrics* 158 (6), S. 474–478.
- Hayward, R.;** Gonzalez, S. (2005): How low can you go? Intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, and respiratory obstruction in children with complex craniosynostosis. In: *Journal of neurosurgery* 102 (1 Suppl), S. 16–22.
- Henderson, S.;** Gao, D.; Christensen, S.; Kimble, J. (1997): Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in *Caenorhabditis elegans*. In: *MBoC* 8 (9), S. 1751–1762.
- Heuzé, Y.;** Holmes, G.; Peter, I.; Richtsmeier, J.; Jabs, E. (2014): Closing the Gap. Genetic and Genomic Continuum from Syndromic to Nonsyndromic Craniosynostoses. In: *Current genetic medicine reports* 2 (3), S. 135–145.
- Hilton, M.;** Tu, X.; Wu, X.; Bai, S.; Zhao, H.; Kobayashi, T. et al. (2008): Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. In: *Nature medicine* 14 (3), S. 306–314.

- Hinoi, E.**; Bialek, P.; Chen, Y.-T.; Rached, M.-T.; Groner, Y.; Behringer, R. et al. (2006): Runx2 inhibits chondrocyte proliferation and hypertrophy through its expression in the perichondrium. In: *Genes & development* 20 (21), S. 2937–2942.
- Honjo, T.** (1996): The shortest path from the surface to the nucleus. RBP-J kappa/Su(H) transcription factor. In: *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 1 (1), S. 1–9.
- Howard, T.**; Paznekas, W.; Green, E.; Chiang, L.; Ma, N.; Luna, R. et al. (1997): Mutations in TWIST, a basic helix–loop–helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. In: *Nature genetics* 15, 36 EP -.
- Howe, L.**; Watanabe, O.; Leonard, J.; Brown, A. (2003): Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. In: *Cancer research* 63 (8), S. 1906–1913.
- Hu, J.**; Liao, J.; Sathanoori, M.; Kochmar, S.; Sebastian, J.; Yatsenko, S.; Surti, U. (2015): CNTN6 copy number variations in 14 patients. A possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. In: *Journal of neurodevelopmental disorders* 7 (1), S. 26.
- Hu, Q.-D.**; Ang, B.-T.; Karsak, M.; Hu, W.-P.; Cui, X.-Y.; Duka, T. et al. (2003): F3/Contactin Acts as a Functional Ligand for Notch during Oligodendrocyte Maturation. In: *Cell* 115 (2), S. 163–175.
- Hudson, L.**; Hamilton, W. (Hg.) (2010): Atlas of feline anatomy for veterinarians. 2. ed. Jackson: Teton NewMedia.
- Iseki, S.**; Wilkie, A.; Morriss-Kay, G. (1999): Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. In: *Development (Cambridge, England)* 126 (24), S. 5611–5620.
- Jabs, E.**; Müller, U.; Li, X.; Ma, L.; Luo, W.; Haworth, I. et al. (1993): A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. In: *Cell* 75 (3), S. 443–450.
- Jacob, S.**; Wu, C.; Freeman, T.; Koyama, E.; Kirschner, R. (2007): Expression of Indian Hedgehog, BMP-4 and Noggin in craniosynostosis induced by fetal constraint. In: *Annals of plastic surgery* 58 (2), S. 215–221.



- Jenkins, D.;** Seelow, D.; Jehee, F.; Perlyn, C.; Alonso, L.; Bueno, D. et al. (2007): RAB23 mutations in Carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. In: *American journal of human genetics* 80 (6), S. 1162–1170.
- Jho, E.;** Zhang, T.; Domon, C.; Joo, C.-K.; Freund, J.-N.; Costantini, F. (2002): Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. In: *Molecular and cellular biology* 22 (4), S. 1172–1183.
- Jiang, X.;** Iseki, S.; Maxson, R.; Sucov, H.; Morriss-Kay, G. (2002): Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. In: *Developmental biology* 241 (1), S. 106–116.
- Kamphans, T.;** Krawitz, P. (2012): GeneTalk. An expert exchange platform for assessing rare sequence variants in personal genomes. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (19), S. 2515–2516.
- Karsenty, G.** (2008): Transcriptional control of skeletogenesis. In: *Annual review of genomics and human genetics* 9, S. 183–196.
- Karsenty, G.;** Wagner, E. (2002): Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development. In: *Developmental Cell* 2 (4), S. 389–406.
- Kashevarova, A.;** Nazarenko, L.; Schultz-Pedersen, S.; Skryabin, N.; Salyukova, O.; Chechetkina, N. et al. (2014): Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families. CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability. In: *Molecular cytogenetics* 7 (1).
- Katoh, M.;** Katoh, M. (2007): Notch signaling in gastrointestinal tract (Review). In: *Int J Oncol*.
- Katsianou, M.;** Adamopoulos, C.; Vastardis, H.; Basdra, E. (2016): Signaling mechanisms implicated in cranial sutures pathophysiology. Craniosynostosis. In: *BBA clinical* 6, S. 165–176.
- Kii, S.;** Uzuka, Y.; Taura, Y.; Nakaichi, M.; Takeuchi, A.; Inokuma, H.; Onishi, T. (1997): Magnetic resonance imaging of the lateral ventricles in beagle-type dogs. In: *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 38 (6), S. 430–433.
- Kim, H.;** Rice, D.; Kettunen, P.; Thesleff, I. (1998): FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. In: *Development (Cambridge, England)* 125 (7), S. 1241–1251.

- Kimonis, V.;** Gold, J.-A.; Hoffman, T.; Panchal, J.; Boyadjiev, S. (2007): Genetics of craniosynostosis. In: *Seminars in pediatric neurology* 14 (3), S. 150–161.
- Klezovitch, O.;** Fernandez, T.; Tapscott, S.; Vasioukhin, V. (2004): Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in Lgl1 knockout mice. In: *Genes & development* 18 (5), S. 559–571.
- Klopocki, E.;** Lohan, S.; Brancati, F.; Koll, R.; Brehm, A.; Seemann, P. et al. (2011): Copy-number variations involving the IHH locus are associated with syndactyly and craniosynostosis. In: *American journal of human genetics* 88 (1), S. 70–75.
- König, H.;** Bragulla, H. (Hg.) (2009): Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis; mit 53 Tabellen. 4., überarb. Aufl. Stuttgart: Schattauer.
- Kopan, R.;** Ilagan, M. (2009): The canonical Notch signaling pathway. Unfolding the activation mechanism. In: *Cell* 137 (2), S. 216–233.
- Krivtsov, A.;** Rozov, F.; Zinovyeva, M.; Hendriks, P.; Jiang, Y.; Visser, J.; Belyavsky, A. (2007): Jedi--a novel transmembrane protein expressed in early hematopoietic cells. In: *Journal of cellular biochemistry* 101 (3), S. 767–784.
- Ku, C.-S.;** Cooper, D.; Polychronakos, C.; Naidoo, N.; Wu, M.; Soong, R. (2012): Exome sequencing. Dual role as a discovery and diagnostic tool. In: *Annals of neurology* 71 (1), S. 5–14.
- Kuo, C.;** Mirzadeh, Z.; Soriano-Navarro, M.; Rasin, M.; Wang, D.; Shen, J. et al. (2006): Postnatal deletion of Numb/Numbl like reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche. In: *Cell* 127 (6), S. 1253–1264.
- Kutkowska-Każmierczak, A.;** Gos, M.; Obersztyn, E. (2018): Craniosynostosis as a clinical and diagnostic problem. Molecular pathology and genetic counseling. In: *Journal of applied genetics* 59 (2), S. 133–147.
- Lajeunie, E.;** Le Merrer, M.; Bonaïti-Pellie, C.; Marchac, D.; Renier, D. (1995): Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. In: *American journal of medical genetics* 55 (4), S. 500–504.
- Laubner, S.;** Ondreka, N.; Failing Klaus; Kramer, M.; Schmidt, M. (2015): Magnetic resonance imaging signs of high intraventricular pressure - comparison of findings in dogs with clinically relevant internal hydrocephalus and asymptomatic dogs with ventriculomegaly. In: *BMC Vet Res* 11 (1), S. 1–11.

**Lauruschkus, G.** (1942): Über Riechfeldgrösse und Riechfeldkoeffizient bei einigen Hunderassen und der Katze. 77:473-97 Arch f Tierheilk.

**Lee, J.; Ishimoto, A.; Yanagawa, S.** (1999): Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (30), S. 21464–21470.

**Lenton, K.; James, A.; Manu, A.; Brugmann, S.; Birker, D.; Nelson, E. et al.** (2011): Indian hedgehog positively regulates calvarial ossification and modulates bone morphogenetic protein signaling. In: *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 49 (10), S. 784–796.

**Lepupin, O.; PETERS, E.; Halleux, C.; Hu, S.; Kramer, I.; Morvan, F. et al.** (2011): Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (22), S. 19489–19500.

**Lin, G.; Hankenson, K.** (2011): Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. In: *Journal of cellular biochemistry* 112 (12), S. 3491–3501.

**Lin, X.; Liu, B.; Yang, X.; Yue, X.; Diao, L.; Wang, J.; Chang, J.** (2013): Genetic deletion of Rnd3 results in aqueductal stenosis leading to hydrocephalus through up-regulation of Notch signaling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (20), S. 8236–8241.

**Lindsell, C.; Boulter, J.; diSibio, G.; Gossler, A.; Weinmaster, G.** (1996): Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. In: *Molecular and cellular neurosciences* 8 (1), S. 14–27.

**Lipinski, M.; Froenicke, L.; Baysac, K.; Billings, N.; Leutenegger, C.; Levy, A. et al.** (2008): The ascent of cat breeds. Genetic evaluations of breeds and worldwide random-bred populations. In: *Genomics* 91 (1), S. 12–21.

**Liu, X.; Zhang, C.; Jing, J.; Peng, W.; Zhu, S.; Zou, S.** (2017): Role of Notch Signaling in the Physiological Patterning of Posterofrontal and Sagittal Cranial Sutures. In: *The Journal of craniofacial surgery* 28 (6), S. 1620–1625.

**Liu, Y.; Tang, Z.; Kundu, R.; Wu, L.; Luo, W.; Zhu, D. et al.** (1999): Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull. A possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. In: *Developmental biology* 205 (2), S. 260–274.

- Liu, Z.; Xu, J.; Colvin, J.; Ornitz, D.** (2002): Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. In: *Genes & development* 16 (7), S. 859–869.
- Lix, L.; Keselman, J.; Keselman, H.** (1996): Consequences of Assumption Violations Revisited: A Quantitative Review of Alternatives to the One-Way Analysis of Variance F Test. In: *Review of Educational Research* 66 (4), S. 579–619.
- Lutz, H.; Kohn, B.; Forterre, F.** (Hg.) (2015): *Krankheiten der Katze. 5., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Enke.
- Lyons, L.; Erdman, C.; Grahn, R.; Hamilton, M.; Carter, M.; Helps, C. et al.** (2016): Aristaless-Like Homeobox protein 1 (ALX1) variant associated with craniofacial structure and frontonasal dysplasia in Burmese cats. In: *Developmental biology* 409 (2), S. 451–458.
- Ma, L.** (1996): The molecular basis of Boston-type craniosynostosis. The Pro148-->His mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. In: *Human molecular genetics* 5 (12), S. 1915–1920.
- MacGavin, M.; Zachary, J.** (Hg.) (2007): *Pathologic basis of veterinary disease. 4th ed.* St Louis, Mo.: Mosby Elsevier (805-908).
- Mak, K.; Chen, M.-H.; Day, T.; Chuang, P.-T.; Yang, Y.** (2006): Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. In: *Development (Cambridge, England)* 133 (18), S. 3695–3707.
- Malik, R.; Sparkes, A.; Bessant, C.** (2009): Brachycephalia--a bastardisation of what makes cats special. In: *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11 (11), S. 889–890.
- Marchant, T.; Johnson, E.; McTeir, L.; Johnson, C.; Gow, A.; Liuti, T. et al.** (2017): Canine Brachycephaly Is Associated with a Retrotransposon-Mediated Missplicing of SMOC2. In: *Current biology : CB* 27 (11), 1573-1584.e6.
- Marie, P.** (2012): Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation. An update. In: *Gene* 498 (1), S. 1–4.
- Marongiu, M.; Marcia, L.; Pelosi, E.; Lovicu, M.; Deiana, M.; Zhang, Y. et al.** (2015): FOXL2 modulates cartilage, skeletal development and IGF1-dependent growth in mice. In: *BMC developmental biology* 15, S. 27.
- Mefford, H.; Shafer, N.; Antonacci, F.; Tsai, J.; Park, S.; Hing, A. et al.** (2010): Copy number variation analysis in single-suture craniosynostosis. Multiple rare variants including RUNX2

duplication in two cousins with metopic craniosynostosis. In: *American journal of medical genetics. Part A* 152A (9), S. 2203–2210.

**Mehrara, B.;** Mackool, R.; McCarthy, J.; Gittes, G.; Longaker, M. (1998): Immunolocalization of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 and receptor-2 in rat cranial sutures. In: *Plastic and Reconstructive Surgery* 102 (6), 1805-17; discussion 1818-20.

**Meinhardt, H.** (1983): Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. In: *Developmental biology* 96 (2), S. 375–385.

**Melvin, V.;** Feng, W.; Hernandez-Lagunas, L.; Artinger, K.; Williams, T. (2013): A morpholino-based screen to identify novel genes involved in craniofacial morphogenesis. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 242 (7), S. 817–831.

**Merrill, A.;** Bochukova, E.; Brugger, S.; Ishii, M.; Pilz, D.; Wall, S. et al. (2006): Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin-Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis. In: *Human molecular genetics* 15 (8), S. 1319–1328.

**Merzdorf, C.;** Sive, H. (2006): The *zic1* gene is an activator of Wnt signaling. In: *The International journal of developmental biology* 50 (7), S. 611–617.

**Mestrinho, L.;** Louro, J.; Gordo, I.; Niza, M.; Requicha, J.; Force, J.; Gawor, J. (2018): Oral and dental anomalies in purebred, brachycephalic Persian and Exotic cats. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 253 (1), S. 66–72.

**Mishina, Y.;** Snider, T. (2014): Neural crest cell signaling pathways critical to cranial bone development and pathology. In: *Experimental cell research* 325 (2), S. 138–147.

**Mommaerts, H.;** Esguerra, C.; Hartmann, U.; Luyten, F.; Tylzanowski, P. (2014): Smoc2 modulates embryonic myelopoiesis during zebrafish development. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 243 (11), S. 1375–1390.

**Monroe, D.;** McGee-Lawrence, M.; Oursler, M.; Westendorf, J. (2012): Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. In: *Gene* 492 (1), S. 1–18.

**Mooney, M.;** Aston, C.; Siegel, M.; Losken, H.; Smith, T.; Burrows, A. et al. (1996): Craniosynostosis with autosomal dominant transmission in New Zealand white rabbits. In: *Journal of craniofacial genetics and developmental biology* 16 (1), S. 52–63.

**Mooney, M.;** Losken, H.; Siegel, M.; Lalikos, J.; Losken, A.; Burrows, A.; Smith, T. (1994a): Development of a strain of rabbits with congenital simple nonsyndromic coronal suture

synostosis. Part II. Somatic and craniofacial growth patterns. In: *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association* 31 (1), S. 8–16.

**Mooney, M.;** Losken, H.; Siegel, M.; Lalikos, J.; Losken, A.; Smith, T.; Burrows, A. (1994b): Development of a strain of rabbits with congenital simple nonsyndromic coronal suture synostosis. Part I. Breeding demographics, inheritance pattern, and craniofacial anomalies. In: *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association* 31 (1), S. 1–7.

**Morgan, R.** (1994): Feline corneal sequestration. A retrospective study of 42 cases (1987-1991). In: *Journal (USA)*.

**Morris, D.** (2000): Cat breeds of the world. A complete illustrated encyclopedia. Toronto: CNIB.

**Morris-Kay, G.;** Iseki, S.; Johnson, D. (2001): Genetic control of the cell proliferation-differentiation balance in the developing skull vault. Roles of fibroblast growth factor receptor signalling pathways. In: *Novartis Foundation symposium* 232, 102-16; discussion 116-21.

**Most, D.;** Levine, J.; Chang, J.; Sung, J.; McCarthy, J.; Schendel, S.; Longaker, M. (1998): Studies in cranial suture biology. Up-regulation of transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor mRNA correlates with posterior frontal cranial suture fusion in the rat. In: *Plastic and Reconstructive Surgery* 101 (6), S. 1431–1440.

**Muenke, M.;** Schell, U.; Hehr, A.; Robin, N.; Losken, H.; Schinzel, A. et al. (1994): A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. In: *Nature genetics* 8 (3), S. 269–274.

**Mundlos, S.;** Otto, F.; Mundlos, C.; Mulliken, J.; Aylsworth, A.; Albright, S. et al. (1997): Mutations Involving the Transcription Factor CBFA1 Cause Cleidocranial Dysplasia. In: *Cell* 89 (5), S. 773–779.

**Murken, J.;** Grimm, T.; Holinski-Feder, E. (Hg.) (2006): Taschenlehrbuch Humangenetik. 7., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.

**Naganawa, T.;** Xiao, L.; Abogunde, E.; Sobue, T.; Kalajzic, I.; Sabbieti, M. et al. (2006): In vivo and in vitro comparison of the effects of FGF-2 null and haplo-insufficiency on bone formation in mice. In: *Biochemical and biophysical research communications* 339 (2), S. 490–498.

- Nicholas, F.** (2003): Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). A comparative knowledgebase of genetic disorders and other familial traits in non-laboratory animals. In: *Nucleic Acids Res* 31 (1), S. 275–277.
- Nickel, R.** (Hg.) (1977): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band 1 // Bewegungsapparat. 4., neubearb. Aufl.: Paul Parey (1).
- Niemiec, B.** (2010): Small animal dental, oral & maxillofacial disease. A color handbook. London: Manson/Veterinary Press (Veterinary Color Handbook Series).
- Nishimura, R.**; Hata, K.; Ikeda, F.; Ichida, F.; Shimoyama, A.; Matsubara, T. et al. (2008): Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 26 (3), S. 203–212.
- Nishimura, R.**; Hata, K.; Matsubara, T.; Wakabayashi, M.; Yoneda, T. (2012): Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. In: *Journal of biochemistry* 151 (3), S. 247–254.
- Noden, D.**; Trainor, P. (2005): Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. In: *Journal of anatomy* 207 (5), S. 575–601.
- Nöller, C.** (2007): Klinisch-funktionelle Anatomie und computertomographische Darstellung der Nase bei normo- und brachycephalen Katzen.
- O'Leary, N.**; Wright, M.; Brister, J.; Ciuffo, S.; Haddad, D.; McVeigh, R. et al. (2016): Reference sequence (RefSeq) database at NCBI. Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. In: *Nucleic Acids Res* 44 (D1), D733–45.
- Opperman, L.** (2000): Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. In: *Dev. Dyn.* 219 (4), S. 472–485.
- Opperman, L.**; Gakunga, P.; Carlson, D. (2005): Genetic Factors Influencing Morphogenesis and Growth of Sutures and Synchondroses in the Craniofacial Complex. In: *Seminars in Orthodontics* 11 (4), S. 199–208.
- Opperman, L.**; Nolen, A.; Ogle, R. (1997): TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 exhibit distinct patterns of expression during cranial suture formation and obliteration in vivo and in vitro. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12 (3), S. 301–310.
- Otto, A.** (1830): Lehrbuch der pathologischen Anatomie des Menschen und der Thiere. Berlin: August Rükker.

- Pan, A.;** Le Chang; Nguyen, A.; James, A. (2013): A review of hedgehog signaling in cranial bone development. In: *Frontiers in physiology* 4, S. 61.
- Panchal, J.;** Uttchin, V. (2003): Management of craniosynostosis. In: *Plastic and Reconstructive Surgery* 111 (6), 2032-48; quiz 2049.
- Papadopoulos, J.;** Agarwala, R. (2007): COBALT. Constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (9), S. 1073–1079.
- Passos-Bueno, M.;** Wilcox, W.; Jabs, E.; Serti, A.; Alonso, L.; Kitoh, H. (1999): Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. In: *Hum. Mutat.* 14 (2), S. 115–125.
- Persing, J.;** Jane, J.; Shaffrey, M. (1989): Virchow and the pathogenesis of craniosynostosis. A translation of his original work. In: *Plastic and Reconstructive Surgery* 83 (4), S. 738–742.
- Pickrell, W.;** Rees, M.; Chung, S.-K. (2012): Next generation sequencing methodologies--an overview. In: *Advances in protein chemistry and structural biology* 89, S. 1–26.
- Popesko, P. (Hg.)** (2011): Atlas der topografischen Anatomie der Haustiere. [Bd. 1-3 in einem Band]. 7., unveränd. Aufl. Stuttgart: Enke.
- Pratschke, K.** (2014): Current thinking about brachycephalic syndrome. More than just airways. In: *Companion Animal* 19 (2), S. 70–78.
- Prescott, C.** (1973): Reproduction patterns in the domestic cat. In: *Australian veterinary journal* 49 (3), S. 126–129.
- Pschyrembel, W.;** Witzel, S.; Dornblüth, O. (Hg.) (2007): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 261., neu bearb. und erw. Aufl. Berlin: de Gruyter.
- Reinhold, M.;** Abe, M.; Kapadia, R.; Liao, Z.; Naski, M. (2004): FGF18 represses noggin expression and is induced by calcineurin. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (37), S. 38209–38219.
- Reinhold, M.;** Naski, M. (2007): Direct interactions of Runx2 and canonical Wnt signaling induce FGF18. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (6), S. 3653–3663.
- Renier, D.;** Sainte-Rose, C.; Marchac, D.; Hirsch, J. (1982): Intracranial pressure in craniostenosis. In: *Journal of neurosurgery* 57 (3), S. 370–377.
- Rice, D.;** Aberg, T.; Chan, Y.; Tang, Z.; Kettunen, P.; Pakarinen, L. et al. (2000): Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. In: *Development (Cambridge, England)* 127 (9), S. 1845–1855.



- Riddle, R.**; Johnson, R.; Laufer, E.; Tabin, C. (1993): Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. In: *Cell* 75 (7), S. 1401–1416.
- Ruiz i Altaba, A.**; Mas, C.; Stecca, B. (2007): The Gli code. An information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. In: *Trends in cell biology* 17 (9), S. 438–447.
- Rusbridge, C.**; Knowler, P. (2021): The Need for Head Space. Brachycephaly and Cerebrospinal Fluid Disorders. In: *Life (Basel, Switzerland)* 11 (2).
- Rüsse, I.**; Sinowatz, F. (2015): Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. 3., durchges. Aufl. Berlin, Wien u.a.: Blackwell Wiss.-Verl.
- Sanchez-Irizarry, C.**; Carpenter, A.; Weng, A.; Pear, W.; Aster, J.; Blacklow, S. (2004): Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. In: *Molecular and cellular biology* 24 (21), S. 9265–9273.
- Schinazi, R.**; Yao, X. (1995): Hydrocephalus induction in mice infected with herpes simplex virus type 2 after antiviral treatment. In: *Antiviral Research* 28 (4), S. 291–302.
- Schlueter, C.**; Budras, K.; Ludewig, E.; Mayrhofer, E.; Koenig, H.; Walter, A.; Oechtering, G. (2009): Brachycephalic feline noses. CT and anatomical study of the relationship between head conformation and the nasolacrimal drainage system. In: *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11 (11), S. 891–900.
- Schmider, E.**; Ziegler, M.; Danay, E.; Beyer, L.; Bühner, M. (2010): Is It Really Robust? In: *Methodology* 6 (4), S. 147–151.
- Schmidt, M.**; Farke, D.; Staszuk, C.; Lang, A.; Büttner, K.; Plendl, J.; Kampschulte, M. (2022): Closure times of neurocranial sutures and synchondroses in Persian compared to Domestic Shorthair cats. In: *Scientific reports* 12 (1), S. 573.
- Schmidt, M.**; Kampschulte, M.; Enderlein, S.; Gorgas, D.; Lang, J.; Ludewig, E. et al. (2017): The Relationship between Brachycephalic Head Features in Modern Persian Cats and Dymorphologies of the Skull and Internal Hydrocephalus. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31 (5), S. 1487–1501.
- Schnorr, B.**; Kressin, M. (2006): Embryologie der Haustiere. Ein Kurzlehrbuch. 5., neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke.
- Schoenebeck, J.**; Hutchinson, S.; Byers, A.; Beale, H.; Carrington, B.; Faden, D. et al. (2012): Variation of BMP3 contributes to dog breed skull diversity. In: *PLoS genetics* 8 (8), e1002849.

- Schoenebeck, J.**; Ostrander, E. (2013): The genetics of canine skull shape variation. In: *Genetics* 193 (2), S. 317–325.
- Schwarz, J.**; Rödelsperger, C.; Schuelke, M.; Seelow, D. (2010): MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. In: *Nature methods* 7 (8), S. 575–576.
- Selby, L.**; Hayes, H.; Becker, S. (1979): Epizootiologic features of canine hydrocephalus. In: *American journal of veterinary research* 40 (3), S. 411–413.
- Senarath-Yapa, K.**; Li, S.; Meyer, N.; Longaker, M.; Quarto, N. (2013): Integration of multiple signaling pathways determines differences in the osteogenic potential and tissue regeneration of neural crest-derived and mesoderm-derived calvarial bones. In: *International journal of molecular sciences* 14 (3), S. 5978–5997.
- Shapiro, S.**; Wilk, M. (1965): An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). In: *Biometrika* 52 (3/4), S. 591.
- Sharma, V.**; Fenwick, A.; Brockop, M.; McGowan, S.; Goos, J.; Hoogeboom, A. et al. (2013): Mutations of TCF12, encoding a basic-helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. In: *Nature genetics* 45 (3), S. 304–307.
- Shimizu, K.**; Chiba, S.; Kumano, K.; Hosoya, N.; Takahashi, T.; Kanda, Y. et al. (1999): Mouse Jagged1 Physically Interacts with Notch2 and Other Notch Receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (46), S. 32961–32969.
- Shukla, V.**; Coumoul, X.; Wang, R.-H.; Kim, H.-S.; Deng, C.-X. (2007): RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. In: *Nature genetics* 39 (9), S. 1145–1150.
- Sieslack, J.** (2019): Untersuchung über die Auswirkungen des zunehmenden Grads der Brachycephalie auf den Gesichtsschädel bei Perserkatzen. 1. Auflage. Giessen: VVB Laufersweiler Verlag (Edition scientifique).
- Slater, B.**; Lenton, K.; Kwan, M.; Gupta, D.; Wan, D.; Longaker, M. (2008): Cranial sutures. A brief review. In: *Plastic and Reconstructive Surgery* 121 (4), 170e-8e.
- Smith, C.**; Blake, J.; Kadin, J.; Richardson, J.; Bult, C.; the Mouse Genome Database Group (2018): Mouse Genome Database (MGD)-2018. Knowledgebase for the laboratory mouse. In: *Nucleic Acids Res* 46 (D1), D836-D842.

- Speltz, M.;** Kapp-Simon, K.; Cunningham, M.; Marsh, J.; Dawson, G. (2004): Single-suture craniosynostosis. A review of neurobehavioral research and theory. In: *Journal of pediatric psychology* 29 (8), S. 651–668.
- Spivak-Kroizman, T.;** Lemmon, M.; Dikic, I.; Ladbury, J.; Pinchasi, D.; Huang, J. et al. (1994): Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. In: *Cell* 79 (6), S. 1015–1024.
- St-Jacques, B.;** Hammerschmidt, M.; McMahon, A. (1999): Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. In: *Genes & development* 13 (16), S. 2072–2086.
- Stockard, C.** (1941): The genetic and endocrinic basis for differences in form and behavior. Philadelphia: The Wistar Institute of Anatomy and Biology.
- Tabachnick, B.;** Fidell, L. (2019): Using multivariate statistics. Seventh edition (Always learning).
- Taylor, W.** (1986): The classification of amino acid conservation. In: *Journal of Theoretical Biology* 119 (2), S. 205–218.
- Teven, C.;** Farina, E.; Rivas, J.; Reid, R. (2014): Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. In: *Genes & diseases* 1 (2), S. 199–213.
- The Cat Fanciers' Association, Inc (Hg.) (2017): Persian Show Standart. Online verfügbar unter <http://www.cfa.org/Portals/0/documents/breeds/standards/persian.pdf>, zuletzt geprüft am 28.04.2018.
- The Governing Council of the Cat Fancy (2018): Standard of Points - Persian. Online verfügbar unter <https://www.gccfcats.org/Portals/0/Persian.SOP.Template.pdf?ver=2018-01-11-213229-983>, zuletzt geprüft am 08.01.2019.
- Thien, C.;** Langdon, W. (2001): Cbl. Many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 294 EP -.
- Thomas, W.** (2010): Hydrocephalus in dogs and cats. In: *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 40 (1), S. 143–159.
- Thompson, D.;** Malcolm, G.; Jones, B.; Harkness, W.; Hayward, R. (1995): Intracranial pressure in single-suture craniosynostosis. In: *Pediatric neurosurgery* 22 (5), S. 235–240.

- Thorvaldsdóttir, H.**; Robinson, J.; Mesirov, J. (2013): Integrative Genomics Viewer (IGV). High-performance genomics data visualization and exploration. In: *Briefings in bioinformatics* 14 (2), S. 178–192.
- Tsunoda, I.**; McCright, I.; Kuang, L.; Zurbriggen, A.; Fujinami, R. (1997): Hydrocephalus in mice infected with a Theiler's murine encephalomyelitis virus variant. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56 (12), S. 1302–1313.
- Tuite, G.**; Chong, W.; Evanson, J.; Narita, A.; Taylor, D.; Harkness, W. et al. (1996): The effectiveness of papilledema as an indicator of raised intracranial pressure in children with craniosynostosis. In: *Neurosurgery* 38 (2), S. 272–278.
- Twigg, S.**; Forecki, J.; Goos, J.; Richardson, I.; Hoogeboom, A.; van den Ouweland, A. et al. (2015a): Gain-of-Function Mutations in ZIC1 Are Associated with Coronal Craniosynostosis and Learning Disability. In: *American journal of human genetics* 97 (3), S. 378–388.
- Twigg, S.**; Wilkie, A. (2015b): A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis. In: *American journal of human genetics* 97 (3), S. 359–377.
- Vortkamp, A.**; Lee, K.; Lanske, B.; Segre, G.; Kronenberg, H.; Tabin, C. (1996): Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. In: *Science* 273 (5275), S. 613–622.
- Wall, S.** (1997): Diagnostic features of the major non-syndromic craniosynostoses and the common deformational conditions which may be confused with them. In: *Current Paediatrics* 7 (1), S. 8–17.
- Wang, Y.**; Zhou, X.; Oberoi, K.; Phelps, R.; Couwenhoven, R.; Sun, M. et al. (2012): p38 Inhibition ameliorates skin and skull abnormalities in Fgfr2 Beare-Stevenson mice. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (6), S. 2153–2164.
- Warren, S.**; Brunet, L.; Harland, R.; Economides, A.; Longaker, M. (2003): The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion. In: *Nature* 422 (6932), S. 625–629.
- Warthen, D.**; Moore, E.; Kamath, B.; Morrisette, J.; Sanchez-Lara, P.; Sanchez, P. et al. (2006): Jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome. Increasing the mutation detection rate. In: *Human mutation* 27 (5), S. 436–443.
- Wasthuber, J.** (1991): History of domestic cats and cat breeds. In: *Feline Husbandry: Diseases and management in the multiple-cat environment*, S. 1–59.

- Wiik, A.**; Ropstad, E.; Ekesten, B.; Karlstam, L.; Wade, C.; Lingaas, F. (2015): Progressive retinal atrophy in Shetland sheepdog is associated with a mutation in the CNGA1 gene. In: *Animal genetics* 46 (5), S. 515–521.
- Wilkie, A.**; Byren, J.; Hurst, J.; Jayamohan, J.; Johnson, D.; Knight, S. et al. (2010): Prevalence and complications of single-gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. In: *Pediatrics* 126 (2), e391-400.
- Willer, S.** (1992): Erbliche und dispositionelle Krankheiten. In: *V. Schmidt u. M. Ch. Horzinek: Krankheiten der Katze*, S. 74–94.
- Williams, D.**; Kim, J.-Y. (2009): Feline entropion. A case series of 50 affected animals (2003–2008). In: *Veterinary ophthalmology* 12 (4), S. 221–226.
- Winter, R.**; Baraitser, M.: London Medical Databases. In: Online verfügbar unter <https://www.face2gene.com/lmd-library-london-medical-database-dysmorphology/>, zuletzt geprüft am 06.12.18.
- Winter, R.**; Baraitser, M. (1987): The London Dysmorphology Database. In: *Journal of medical genetics* 24 (8), S. 509–510.
- Wunderlin, N.** (2010): Relevanz der computertomographischen Untersuchung des Schädels von Katzen mit einem geringgradigen Schädel-Hirn-Trauma. Vergleich der bildgebenden Verfahren - Röntgen versus Computertomographie - im Hinblick auf knöcherne Veränderungen des Schädels bei Katzen mit einem geringgradigen Schädel-Hirn-Trauma. Zugl.: Gießen, Univ., Diss., 2009. 1. Aufl. Giessen: VVB Lauferweiler (Edition scientifique).
- Yan, J.**; Li, J.; Hu, J.; Zhang, L.; Wei, C.; Sultana, N. et al. (2018): Smad4 deficiency impairs chondrocyte hypertrophy via the Runx2 transcription factor in mouse skeletal development. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (24), S. 9162–9175.
- Yao, H.**; Whoriskey, W.; Capel, B. (2002): Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. In: *Genes & development* 16 (11), S. 1433–1440.
- Yen, H.-Y.**; Ting, M.-C.; Maxson, R. (2010): Jagged1 functions downstream of Twist1 in the specification of the coronal suture and the formation of a boundary between osteogenic and non-osteogenic cells. In: *Developmental biology* 347 (2), S. 258–270.
- Yoshida, T.**; Vivatbutsi, P.; Morriss-Kay, G.; Saga, Y.; Iseki, S. (2008): Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. In: *Mechanisms of development* 125 (9-10), S. 797–808.

**Yu, H.-M.; Jerchow, B.; Sheu, T.-J.; Liu, B.; Costantini, F.; Puzas, J. et al. (2005):** The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. In: *Development (Cambridge, England)* 132 (8), S. 1995–2005.

**Yun, Y.-R.; Won, J.; Jeon, E.; Lee, S.; Kang, W.; Jo, H. et al. (2010):** Fibroblast growth factors. Biology, function, and application for tissue regeneration. In: *Journal of tissue engineering* 2010, S. 218142.

**Zanotti, S.; Canalis, E. (2016):** Notch Signaling and the Skeleton. In: *Endocrine reviews* 37 (3), S. 223–253.

**Zhao, Y.; Zhang, Z. (2001):** The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (34), S. 32382–32391.

## Anhang

Tabelle 22: Die durch eine Literaturrecherche überprüften Gene und ihre jeweiligen Ergebnisse aus der NGS. Angegeben ist von links nach rechts das betroffene Chromosom, die Position der Mutation, die Base(n) der Referenzsequenz, die neu detektierte(n) Base(n), die Verteilung innerhalb der 5 sequenzierten Individuen (K515, K528, K529, K530, K531), die Lokalisation bzw. der Effekt der Mutation und das betroffene Gen.

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrA1	29287501	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	MTRF1
chrA1	88058653	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	OBSCN
chrA1	107591766	A	G	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107593598	G	A	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107593708	G	C	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107593982	C	A	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107594050	A	G	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107656457	G	A	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	missense_variant	CCDC192
chrA1	107656710	A	G	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107659714	A	G	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107659907	A	G	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107660973	A	ACCTC	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107661106	GAA	GAAA,GA,G	0/1	0/2	0/2	1/2	2/2	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107661106	GAA	GAAA,GA,G	0/1	0/2	0/2	1/2	2/2	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107661106	GAA	GAAA,GA,G	0/1	0/2	0/2	1/2	2/2	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107661347	A	G	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107661351	A	G	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	107661650	C	T	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	CCDC192
chrA1	145991265	C	T	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	CMYA5
chrA1	155403908	G	A	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	missense_variant	ADGRV1
chrA1	155403908	G	A	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	missense_variant	ADGRV1

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrA1	155403908	G	A	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	missense_variant	ADGRV1
chrA1	155403908	G	A	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	missense_variant	ADGRV1
chrA1	155403908	G	A	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	missense_variant	ADGRV1
chrA1	155403908	G	A	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	missense_variant	ADGRV1
chrA1	155403908	G	A	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	missense_variant	ADGRV1
chrA1	155445847	GAA	GAAA,G,A,G	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	downstream_gene_variant	ADGRV1
chrA1	155445847	GAA	GAAA,G,A,G	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	downstream_gene_variant	ADGRV1
chrA1	155445847	GAA	GAAA,G,A,G	0/1	0/1	1/1	1/1	0/0	downstream_gene_variant	ADGRV1
chrA2	43076862	C	CGGTCCGGAG	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CNTN6
chrA2	43281469	A	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	CNTN6
chrA2	43363296	T	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	CNTN6
chrA2	43365977	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	CNTN6
chrA2	114732014	A	G	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	upstream_gene_variant	ABCB5
chrA2	114734336	C	G	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	upstream_gene_variant	ABCB5
chrA2	114734761	A	C,T	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2	upstream_gene_variant	ABCB5
chrA2	114734761	A	C,T	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2	upstream_gene_variant	ABCB5
chrA2	114734880	C	A	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	upstream_gene_variant	ABCB5
chrA2	114785779	G	A	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	missense_variant	ABCB5
chrA2	114876548	C	T	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	ABCB5
chrA2	118779011	A	ACTCT	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	CA2H7orf3 I
chrA3	1790035	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	missense_variant	RBBP8NL
chrA3	103897783	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	KRCC1
chrA3	103898608	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	KRCC1
chrA3	1039000356	T	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	KRCC1
chrA3	1039000553	A	G	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	KRCC1
chrA3	1039000968	G	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	KRCC1



## Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrA3	103901297	A	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103902349	G	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103903125	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	KRCCI
chrA3	103903446	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	KRCCI
chrA3	103908594	G	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103909129	G	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103909177	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103909303	CTG	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103909352	T	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103909472	G	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103909745	T	TG	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103910596	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	KRCCI
chrA3	103911323	A	G	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	KRCCI
chrB1	46907813	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ADGRA2
chrB1	46910528	G	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ADGRA2
chrB1	46910557	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ADGRA2
chrB1	46910707	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ADGRA2
chrB1	46912878	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ADGRA2
chrB1	46912878	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ADGRA2
chrB1	46914831	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ADGRA2
chrB1	46914831	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ADGRA2
chrB1	46914831	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ADGRA2
chrB1	121383076	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	CENPE
chrB1	121383076	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	CENPE
chrB1	128804829	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128806411	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128807397	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PDLIM5

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB1	128807800	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128808464	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128808499	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128809335	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809335	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809335	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809335	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809335	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809370	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809370	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809370	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809408	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809408	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809408	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809408	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809426	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809426	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809426	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809426	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809426	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekte/ Lokalisation	Gen
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128809713	T	TAA,TA,TAAA,TAAAA	2/4	2/4	2/4	2/2	2/2	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	12880022	T	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	12880022	T	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	12880022	T	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	12880022	T	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128811546	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128811546	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128811546	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128811546	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128811546	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128811546	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128863364	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PDLIM5
chrB1	128894372	T	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128894645	AT	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128897200	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128902163	CTT	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128902806	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128915805	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	5_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128915835	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	5_prime_UTR_variant	PDLIM5
chrB1	128915989	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128915989	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128916771	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128916771	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128917552	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128917552	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128917757	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekte/ Lokalisation	Gen
chrB1	128917757	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128917758	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	128917758	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129036939	T	TAA,TAAAAA,TAATAAAA,TT AAA,TTAAAA,TTAAAAAA	2/3	2/3	2/3	2/2	0/2	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129036939	T	TAA,TAAAAA,TAATAAAA,TT AAA,TTAAAA,TTAAAAAA	2/3	2/3	2/3	2/2	0/2	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129036939	T	TAA,TAAAAA,TAATAAAA,TT AAA,TTAAAA,TTAAAAAA	2/3	2/3	2/3	2/2	0/2	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129036939	T	TAA,TAAAAA,TAATAAAA,TT AAA,TTAAAA,TTAAAAAA	2/3	2/3	2/3	2/2	0/2	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129036939	T	TAA,TAAAAA,TAATAAAA,TT AAA,TTAAAA,TTAAAAAA	2/3	2/3	2/3	2/2	0/2	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129036939	T	TAA,TAAAAA,TAATAAAA,TT AAA,TTAAAA,TTAAAAAA	2/3	2/3	2/3	2/2	0/2	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129037111	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129042231	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129042231	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129042231	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129042231	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129042231	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129042231	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129042231	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129042231	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB1	129042231	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PDLIM5
chrB2	108799293	T	G	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108799323	T	G	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCBLDI

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB2	108800436	C	T	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108800526	GTTT	G	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108800649	ACTGT	A	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108800779	T	C	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108801057	T	A	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108801121	G	A	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108803365	A	AAAAAC,AAAAAAC	0/2	2/2	0/2	0/2	0/1	upstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108803365	A	AAAAAC,AAAAAAC	0/2	2/2	0/2	0/2	0/1	upstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108805058	T	A	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	DCBLDI
chrB2	108864192	C	T	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	DCBLDI
chrB2	108874541	C	CGA	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108877502	ACCC	ACC,AC,A	2/3	2/2	0/2	0/2	1/3	downstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108877502	ACCC	ACC,AC,A	2/3	2/2	0/2	0/2	1/3	downstream_gene_variant	DCBLDI
chrB2	108877502	ACCC	ACC,AC,A	2/3	2/2	0/2	0/2	1/3	downstream_gene_variant	DCBLDI
chrB3	71814435	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71814435	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71814435	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817371	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817371	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817371	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817414	ACT	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817414	ACT	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817414	ACT	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817422	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817422	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817422	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817453	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB3	71817453	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71817453	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71818096	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71818096	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71818096	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71823257	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	3_prime_UTR_variant	EMC4
chrB3	71823257	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	3_prime_UTR_variant	EMC4
chrB3	71823257	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	missense_variant	EMC4
chrB3	71826581	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71826581	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	EMC4
chrB3	71826581	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	EMC4
chrB3	87200712	T	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	RALGAPA
										I
chrB3	87317794	T	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	5_prime_UTR_variant	RALGAPA
										I
chrB3	87317937	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	RALGAPA
										I
chrB3	87319594	CA	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	RALGAPA
										I
chrB3	87320836	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	RALGAPA
										I
chrB3	87320969	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	RALGAPA
										I
chrB3	87321034	TAAAA	T,TAAAAA,TAAA,TAAAAAAA A,TAA,TA	1/6	1/6	1/4	1/4	4/6	upstream_gene_variant	RALGAPA
										I
chrB3	87321034	TAAAA	T,TAAAAA,TAAA,TAAAAAAA A,TAA,TA	1/6	1/6	1/4	1/4	4/6	upstream_gene_variant	RALGAPA
										I

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromosom	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB3	87321034	TAAAA	T,TAATAAA,TAAA,TAATAAA A,TA,A,TA	1/6	1/6	1/4	1/4	4/6	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321034	TAAAA	T,TAATAAA,TAAA,TAATAAA A,TA,A,TA	1/6	1/6	1/4	1/4	4/6	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321034	TAAAA	T,TAATAAA,TAAA,TAATAAA A,TA,A,TA	1/6	1/6	1/4	1/4	4/6	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321034	TAAAA	T,TAATAAA,TAAA,TAATAAA A,TA,A,TA	1/6	1/6	1/4	1/4	4/6	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321870	AAGAGAGAGAGAG AGAG	AAGAGAGAGAGAGAGAG AGAG,AGAGAGAGAGAG,AA GAGAGAGAGAGAGAGAG AGAG,AGAGAGAG,AA,G,A	0/5	0/5	1/5	1/5	1/2	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321870	AAGAGAGAGAGAG AGAG	AAGAGAGAGAGAGAGAG AGAG,AGAGAGAG,AA,G,A	0/5	0/5	1/5	1/5	1/2	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321870	AAGAGAGAGAGAG AGAG	AAGAGAGAGAGAGAGAG AGAG,AGAGAGAGAGAG,AA GAGAGAGAGAGAGAGAG	0/5	0/5	1/5	1/5	1/2	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321870	AAGAGAGAGAGAG AGAG	AAGAGAGAGAGAGAGAG AGAG,AGAGAGAG,AA,G,A	0/5	0/5	1/5	1/5	1/2	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321870	AAGAGAGAGAGAG AGAG	AAGAGAGAGAGAGAGAG AGAG,AGAGAGAGAGAG,AA GAGAGAGAGAGAGAGAG	0/5	0/5	1/5	1/5	1/2	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321870	AAGAGAGAGAGAG AGAG	AAGAGAGAGAGAGAGAG AGAG,AGAGAGAG,AA,G,A	0/5	0/5	1/5	1/5	1/2	upstream_gene_variant	RALGAPA
chrB3	87321870	AAGAGAGAGAGAG AGAG	AAGAGAGAGAGAGAGAG AGAG,AGAGAGAGAGAG,AA	0/5	0/5	1/5	1/5	1/2	upstream_gene_variant	RALGAPA



## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
			GAGAGAGAGAGAGAGAG							
			AGAG, AAGAGAGAG, AAG, A							
chrB3	87321870	AAGAGAGAGAGAG AGAG	AAGAGAGAGAGAGAGAG AGAG, AAGAGAGAGAGAG, AA	0/5	0/5	1/5	1/5	1/2	upstream_gene_variant	RALGAPA 1
chrB3	102407207	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TXNDCl6
chrB3	102407207	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TXNDCl6
chrB3	109100090	A	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109100205	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109100604	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109102168	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109102357	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109102484	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109103747	C	CTGCGAT	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109104178	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109104232	G	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109113680	A	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109117241	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109117241	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109117241	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109118781	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109118781	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109119223	G	A	1/1	1/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109119223	G	A	1/1	1/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109119223	G	A	1/1	1/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB3	109120832	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	missense_variant	PCNX4
chrB3	109120832	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109120832	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109120832	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109122995	TTCTCTCTCTCTC	TTCTCTCTCTCTCTCTC TCTCTCTCTC,TTCTCTCTCTC TC,TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTC,TTCTCTCTCTCTCTCTC	5/5	3/5	0/5	0/3	0/5	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109122995	TTCTCTCTCTCTCTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTCTCTCTC,TTCTCTCTCTC TC,TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTC,TTCTCTCTCTCTCTCTC	5/5	3/5	0/5	0/3	0/5	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109122995	TTCTCTCTCTCTCTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTCTCTCTC,TTCTCTCTCTC TC,TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTC,TTCTCTCTCTCTCTCTC	5/5	3/5	0/5	0/3	0/5	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109122995	TTCTCTCTCTCTCTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTCTCTCTC,TTCTCTCTCTC TC,TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTC,TTCTCTCTCTCTCTCTC	5/5	3/5	0/5	0/3	0/5	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109122995	TTCTCTCTCTCTCTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTCTCTCTC,TTCTCTCTCTC TC,TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTC,TTCTCTCTCTCTCTCTC	5/5	3/5	0/5	0/3	0/5	upstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109122995	TTCTCTCTCTCTCTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTCTCTCTC,TTCTCTCTCTC TC,TTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTC,TTCTCTCTCTCTCTCTC	5/5	3/5	0/5	0/3	0/5	upstream_gene_variant	PCNX4

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
			TC,TTCTCTCTCTCTCTCTC							
			TTCTC,TTCTCTCTCTCTCTCTC							
chrB3	109127521	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	missense_variant	PCNX4
chrB3	109127521	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	missense_variant	PCNX4
chrB3	109127521	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/1	missense_variant	PCNX4
chrB3	109146453	GTTTTT	GT,G,GTTTT,GTTT,GTT	5/5	1/5	4/5	0/1	0/5	downstream_gene_variant	DHRS7
chrB3	109146453	GTTTTT	GT,G,GTTTT,GTTT,GTT	5/5	1/5	4/5	0/1	0/5	downstream_gene_variant	DHRS7
chrB3	109146453	GTTTTT	GT,G,GTTTT,GTTT,GTT	5/5	1/5	4/5	0/1	0/5	downstream_gene_variant	DHRS7
chrB3	109146453	GTTTTT	GT,G,GTTTT,GTTT,GTT	5/5	1/5	4/5	0/1	0/5	downstream_gene_variant	DHRS7
chrB3	109146453	GTTTTT	GT,G,GTTTT,GTTT,GTT	5/5	1/5	4/5	0/1	0/5	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109146453	GTTTTT	GT,G,GTTTT,GTTT,GTT	5/5	1/5	4/5	0/1	0/5	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109146453	GTTTTT	GT,G,GTTTT,GTTT,GTT	5/5	1/5	4/5	0/1	0/5	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109146453	GTTTTT	GT,G,GTTTT,GTTT,GTT	5/5	1/5	4/5	0/1	0/5	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109146453	GTTTTT	GT,G,GTTTT,GTTT,GTT	5/5	1/5	4/5	0/1	0/5	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109147007	T	TATATATACACACAC,TAT ACACACACAC,TACACACA CAC,TATATATATACACAC AC	2/2	2/3	2/3	3/4	2/4	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109147007	T	TATATATACACACAC,TAT ACACACACAC,TACACACA	2/2	2/3	2/3	3/4	2/4	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109147007	T	TATATATATATACACAC AC	2/2	2/3	2/3	3/4	2/4	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109147007	T	TATATATACACACAC,TAT ACACACACAC,TACACACA	2/2	2/3	2/3	3/4	2/4	downstream_gene_variant	PCNX4

Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromosom	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
			CAC,TATATATATACACAC							
			AC							
chrB3	109147007	T	TATATATACACACAC,TAT ACACACACAC,TACACACA	2/2	2/3	3/4	2/4	2/4	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB3	109148085	T	CAC,TATATATATACACAC							
chrB3	109148191	G	AC							
chrB3	109150071	G		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	PCNX4
chrB4	5006922	A		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	ASB13
chrB4	5007575	G		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	ASB13
chrB4	5008194	C		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	ASB13
chrB4	5008647	G		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	ASB13
chrB4	5009408	A		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	ASB13
chrB4	5010121	T		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	ASB13
chrB4	5010453	CT		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	ASB13
chrB4	5011336	T		0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	downstream_gene_variant	ASB13
chrB4	5011912	G		1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	3_prime_UTR_variant	ASB13
chrB4	5012760	C		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	3_prime_UTR_variant	ASB13
chrB4	5015487	G		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	missense_variant	ASB13
chrB4	6781254	C		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	missense_variant	SFMBT2
chrB4	6781254	C		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	missense_variant	SFMBT2
chrB4	6803555	AAAAAAAAAG	A..AAGAAAAAAG	0/2	1/2	1/2	0/2	1/2	upstream_gene_variant	SFMBT2
chrB4	6803555	AAAAAAAAAG	A..AAGAAAAAAG	0/2	1/2	1/2	0/2	1/2	upstream_gene_variant	SFMBT2
chrB4	6805174	G	A	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	upstream_gene_variant	SFMBT2

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB4	6805174	G	A	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	upstream_gene_variant	SFMBT2
chrB4	6805174	G	A	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	upstream_gene_variant	SFMBT2
chrB4	6805174	G	A	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	upstream_gene_variant	SFMBT2
chrB4	36029717	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCPIB
chrB4	36030984	G	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCPIB
chrB4	36031089	C	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	DCPIB
chrB4	36089855	A	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	DCPIB
chrB4	36094865	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	DCPIB
chrB4	36095270	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	DCPIB
chrB4	37106470	G	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37107188	G	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37107409	C	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37107508	G	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37107781	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37110579	T	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	WNKI
chrB4	37110579	T	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	WNKI
chrB4	37110579	T	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	WNKI
chrB4	37110579	T	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	WNKI
chrB4	37110579	T	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	WNKI
chrB4	37110579	T	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	WNKI
chrB4	37110579	T	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37138497	T	C	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	WNKI
chrB4	37269973	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37269973	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37269973	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37269973	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37269973	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37269973	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37269973	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37269973	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37269973	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37272225	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37272225	A	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37272225	G	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37272225	G	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37272225	G	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37272225	G	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37272225	G	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37272225	G	A	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37273039	T	TAA,TAAA,TAAAA	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37273039	T	TAA,TAAA,TAAAA	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI
chrB4	37273039	T	TAA,TAAA,TAAAA	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	upstream_gene_variant	WNKI



## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB4	38162765	C	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	FOXMI
chrB4	38164993	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	FOXMI
chrB4	38164993	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	FOXMI
chrB4	38164993	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	FOXMI
chrB4	38164993	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	FOXMI
chrB4	38173291	C	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	FOXMI
chrB4	38173291	C	G	0/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	FOXMI
chrB4	38176509	T	A	0/1	0/1	0/0	0/1	1/1	upstream_gene_variant	FOXMI
chrB4	38176509	T	A	0/1	0/1	0/0	0/1	1/1	upstream_gene_variant	FOXMI
chrB4	38176509	T	A	0/1	0/1	0/0	0/1	1/1	upstream_gene_variant	FOXMI
chrB4	38176509	T	A	0/1	0/1	0/0	0/1	1/1	upstream_gene_variant	FOXMI
chrB4	39964905	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	39965025	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	39965216	TATATA	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	39966127	C	CCTGT	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	39967565	G	GA,GA,GA	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	39967565	G	GA,GA,GA	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	39968297	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	40009271	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	GALNT8
chrB4	40017389	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	40017609	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	40018437	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	40019838	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	40019937	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	40020421	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	40020666	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	GALNT8
chrB4	41925829	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	TPH1



Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB4	41928460	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	TPII
chrB4	41929405	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	TPII
chrB4	41929706	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	TPII
chrB4	41930080	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TPII
chrB4	41933428	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	TPII
chrB4	41937952	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	TPII
chrB4	42014352	C	T	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	upstream_gene_variant	EMG1
chrB4	42020830	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	EMG1
chrB4	42021207	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	EMG1
chrB4	42022823	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	EMG1
chrB4	42023303	GC	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	EMG1
chrB4	42168969	A	T	0/0	0/0	0/1	./.	./.	missense_variant	C1RL
chrB4	77034444	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	non_coding_transcript_exon_variant	PFKM
chrB4	77035989	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PFKM
chrB4	77035989	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PFKM
chrB4	77035989	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PFKM
chrB4	77035989	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	splice_donor_variant&intron_variant	PFKM
chrB4	77036206	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PFKM
chrB4	77036206	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PFKM
chrB4	77036206	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PFKM
chrB4	77036374	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PFKM
chrB4	77036374	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PFKM
chrB4	77037584	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PFKM
chrB4	77037584	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PFKM
chrB4	77037584	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PFKM

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrB4	117394967	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CRADD
chrB4	117394967	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CRADD
chrB4	117395139	T	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CRADD
chrB4	117395139	T	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CRADD
chrB4	117395692	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CRADD
chrB4	117395692	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CRADD
chrB4	117396222	T	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	5_prime_UTR_variant	CRADD
chrB4	117396222	T	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CRADD
chrB4	117396522	G	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	5_prime_UTR_variant	CRADD
chrB4	117396522	G	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CRADD
chrB4	117396659	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	5_prime_UTR_variant	CRADD
chrB4	117396659	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CRADD
chrB4	117398315	T	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	CRADD
chrB4	132251934	A	G	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	missense_variant	APOL5
chrB4	132254051	A	G	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	APOL5
chrB4	132255111	G	A	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	downstream_gene_variant	APOL5
chrC1	20603184	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	FCN3
chrC1	20604352	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant&splice_regio n_variant	FCN3
chrC1	20609115	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	FCN3
chrC1	20609243	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	FCN3
chrC1	65620015	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	NEXN
chrC1	65620015	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	NEXN
chrC1	65620015	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	NEXN
chrC1	65620015	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	NEXN
chrC1	65620015	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	NEXN
chrC1	65635747	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	NEXN

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC1	65635747	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	NEXN
chrC1	65635747	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	NEXN
chrC1	65635747	C	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	3_prime_UTR_variant	NEXN
chrC1	65638872	C	CT	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	NEXN
chrC1	65638872	C	CT	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	NEXN
chrC2	4708476	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	missense_variant	BACE2
chrC2	4708476	C	T	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	missense_variant	BACE2
chrC2	68443032	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PARP14
chrC2	68443032	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PARP14
chrC2	68443032	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PARP14
chrC2	126660810	G	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	FOXL2
chrC2	134547170	A	G	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	missense_variant	COL6A5
chrC2	134547170	A	G	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	non_coding_transcript_exon_variant	COL6A5
chrC2	134567810	T	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	missense_variant	COL6A5
chrC2	134567810	T	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	non_coding_transcript_exon_variant	COL6A5
chrC2	155109367	G	GC,GGC	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	frameshift_variant	PLCD1
chrC2	155109367	G	GC,GGC	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	frameshift_variant	PLCD1
chrC2	159829003	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829003	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829104	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829104	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829172	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829172	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829555	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829555	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC2	159829584	G	GC	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829584	G	GC	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829611	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159829611	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830066	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830066	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830120	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830120	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830166	T	TG	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830166	T	TG	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830266	C	A,T	1/2	0/2	1/2	1/1	1/1	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830266	C	A,T	1/2	0/2	1/2	1/1	1/1	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830266	C	A,T	1/2	0/2	1/2	1/1	1/1	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830266	C	A,T	1/2	0/2	1/2	1/1	1/1	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830276	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830276	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830284	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830284	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830295	G	GA	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830295	G	GA	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830296	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830296	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830322	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830322	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830442	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830442	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830455	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10

Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC2	159830455	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830472	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830472	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830756	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830756	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830838	G	GT	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830838	G	GT	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830840	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830840	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830852	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830852	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830860	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159830860	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159832560	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159832560	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159833284	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	159833284	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	non_coding_transcript_exon_variant	ANO10
chrC2	159840255	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	non_coding_transcript_exon_variant	ANO10
chrC2	159859823	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159860270	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159860313	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159860651	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159860700	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861006	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861006	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC2	159861024	T	A	0/1	0/1	0/0	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861024	T	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861053	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861053	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861148	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861148	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861310	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861310	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861541	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861541	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861573	G	GA	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159861573	G	GA	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159863018	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159863018	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159863336	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159863336	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159863701	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	159863701	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159864085	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	159864085	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159864466	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	159864466	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159864956	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159864956	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159864956	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ANO10
chrC2	159865363	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159865363	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromosom	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC2	159865370	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159865370	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159865425	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159865425	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159865675	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159865675	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159867390	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159867796	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159867930	CT	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159868544	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159868546	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159868548	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159869389	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159879657	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ANO10
chrC2	159879657	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	non_coding_transcript_exon_variant	ANO10
chrC2	159915515	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159916168	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159916500	AAAGAAAT	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159916577	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159917077	CTATATATATATAT ATA	CTATATA,CTATATATATATAT ATATATATA,CTA,C,CTATATA TATATATATATATATA,CT ATATATATATA	1/3	1/2	1/3	3/3	3/3	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159917077	CTATATATATATAT ATA	CTATATA,CTATATATATATAT ATATATATA,CTA,C,CTATATA	1/3	1/2	1/3	3/3	3/3	downstream_gene_variant	ANO10

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
			TATATATATATATATA,CT ATATATATATA							
chrC2	159917077	CTATATATATATAT ATA	CTATATA,CTATATATATATAT ATATATATA,CTAC,CTATATA TATATATATATATATATA,CT ATATATATATA	1/3	1/2	1/3	3/3	3/3	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159917077	CTATATATATATAT ATA	CTATATA,CTATATATATATAT ATATATATA,CTAC,CTATATA TATATATATATATATATA,CT ATATATATATA	1/3	1/2	1/3	3/3	3/3	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159917077	CTATATATATATAT ATA	CTATATA,CTATATATATATAT ATATATATA,CTAC,CTATATA TATATATATATATATATA,CT ATATATATATA	1/3	1/2	1/3	3/3	3/3	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159917077	CTATATATATATAT ATA	CTATATA,CTATATATATATAT ATATATATA,CTAC,CTATATA TATATATATATATATATA,CT ATATATATATA	1/3	1/2	1/3	3/3	3/3	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159917369	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159917419	TA	TAA,T	0/2	0/2	0/2	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159917419	TA	TAA,T	0/2	0/2	0/2	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159918976	C	CT,CAATACTT	0/2	0/2	0/2	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159918976	C	CT,CAATACTT	0/2	0/2	0/2	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159919293	GA	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159919486	A	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159920722	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ANO10



Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC2	159920722	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	159925055	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159925131	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159925369	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159925848	G	GT,GTTTT	1/2	0/2	1/2	1/1	1/1	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159925848	G	GT,GTTTT	1/2	0/2	1/2	1/1	1/1	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159925875	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159926075	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159926527	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159926655	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159926892	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159927057	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159927457	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159927594	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159927606	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159927666	CGG	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159927977	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159928015	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159928619	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159928638	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159928711	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159928746	A	AAT	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159928749	T	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159928760	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159928824	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159929106	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159929501	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC2	159929550	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159929728	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANO10
chrC2	159930260	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	159930506	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	159930573	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ANO10
chrC2	160036575	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	non_coding_transcript_exon_variant	ANO10
chrC2	160053037	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	5_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	160053037	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	5_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	160053037	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	5_prime_UTR_variant	ANO10
chrC2	160053037	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	non_coding_transcript_exon_variant	ANO10
chrC2	160054562	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160054562	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160054562	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160054562	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160054562	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055352	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055352	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055352	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055352	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055352	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055847	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055847	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055847	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC2	160055847	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055847	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055847	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10

Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT TTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10

Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromosom	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
			TTT							
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
			TTT							
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
			TTT							
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
			TTT							
chrC2	160055938	C	CTT,CTTTTT,CT,CTTTT,CTTTT	1/3	0/3	1/3	1/1	1/1	upstream_gene_variant	ANO10
			TTT							
chrC2	160056123	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056123	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056123	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056123	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056123	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056740	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056740	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056740	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056740	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056740	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056740	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056740	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrC2	160056740	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ANO10
chrD1	3194103	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	CASP4
chrD1	20033662	AACCACCAAC	A	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	conservative_inframe_deletion	JHY
chrD1	20033662	AACCACCAAC	A	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	conservative_inframe_deletion	JHY
chrD1	20033662	AACCACCAAC	A	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	conservative_inframe_deletion	JHY
chrD1	25848389	G	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KCNJ5

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD1	25849354	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25849488	G	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25849850	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25851705	AAATTAAAGG	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25852036	A	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25852054	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25878661	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	KCNJ5
chrD1	25878661	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	KCNJ5
chrD1	25879215	A	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25879215	A	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25879692	G	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25879692	G	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25880743	T	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25880743	T	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25881371	C	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25881371	C	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25881689	T	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25881689	T	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	KCNJ5
chrD1	25883277	TTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCTC, TTCTCTCTC,TTCTCTC,T	3/3	0/3	3/3	4/4	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25883277	TTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCTC, TTCTCTCTC,TTCTCTC,T	3/3	0/3	3/3	4/4	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25883277	TTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCTC, TTCTCTCTC,TTCTCTC,T	3/3	0/3	3/3	4/4	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25883277	TTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCTC, TTCTCTCTC,TTCTCTC,T	3/3	0/3	3/3	4/4	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25883643	G	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5

## Anhang

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD1	25884253	C	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25884370	C	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25884855	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25884864	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25886687	T	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25887157	T	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	KCNJ5
chrD1	25922760	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ARHGAP3
chrD1	25922855	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ARHGAP3
chrD1	25923107	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ARHGAP3
chrD1	25924570	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ARHGAP3
chrD1	25925995	A	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ARHGAP3
chrD1	25926550	T	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ARHGAP3
chrD1	25926550	T	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ARHGAP3
chrD1	25931308	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	ARHGAP3
chrD1	25931308	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	ARHGAP3
chrD1	25931308	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	ARHGAP3

## Anhang

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD1	25931308	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	ARHGAP3 2
chrD1	25931308	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	ARHGAP3 2
chrD1	25988010	C	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	5_prime_UTR_variant	ARHGAP3 2
chrD1	25990799	A	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	25992865	A	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26100899	C	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26101058	C	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26101626	T	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26102105	T	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26125801	T	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26125801	T	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26126310	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26126310	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2



## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD1	26172993	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26175128	ATCT	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26175462	T	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26175564	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26175625	T	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26177655	T	C	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26177707	TAC	TACAC;TACACAC;T;TACACA CACAC	4/4	0/4	4/4	3/3	3/3	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26177707	TAC	TACAC;TACACAC;T;TACACA CACAC	4/4	0/4	4/4	3/3	3/3	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26177707	TAC	TACAC;TACACAC;T;TACACA CACAC	4/4	0/4	4/4	3/3	3/3	upstream_gene_variant	ARHGAP3 2
chrD1	26731150	T	TC	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26731708	G	A	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26732201	TAA	TAAAA;TAAA;TAAAAA;T	4/4	0/4	4/4	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26732201	TAA	TAAAA;TAAA;TAAAAA;T	4/4	0/4	4/4	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26732201	TAA	TAAAA;TAAA;TAAAAA;T	4/4	0/4	4/4	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26732201	TAA	TAAAA;TAAA;TAAAAA;T	4/4	0/4	4/4	0/0	0/0	downstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26732944	G	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PRDM10

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD1	26733222	C	CA	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PRDM10
chrD1	26734657	C	T	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PRDM10
chrD1	26734879	A	G	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	PRDM10
chrD1	26781612	G	C	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	PRDM10
chrD1	26835648	C	T	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26835741	C	A	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26836152	C	CT	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26836699	A	AAC	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26838355	G	A	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26838481	G	T	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26838826	G	C	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26838940	A	G	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26839127	G	A	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26839508	GA	GAAA,G	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26839508	GA	GAAA,G	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26839537	A	T	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26839581	G	A	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26840343	C	G	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26840389	AAGAT	A	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	26840598	CT	C	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PRDM10
chrD1	27175973	C	T	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	27176901	C	T	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	27178154	C	T	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ADAMTS8
chrD1	27198409	T	A	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	ADAMTS8
chrD1	27198433	C	A	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	ADAMTS8
chrD1	27198639	C	T	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	missense_variant	ADAMTS8
chrD1	27199434	G	A	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ADAMTS8

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD1	27199738	T	C	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	27199844	C	G	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	27200227	A	G	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	27201082	C	T	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	27201112	C	G	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	27201210	G	GA	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	27202439	C	T	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	27203768	CTCCT	C	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ADAMTS8
chrD1	100788293	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF408
chrD1	100789101	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF408
chrD1	100791066	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF408
chrD1	100796144	A	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ZNF408
chrD1	100797887	TCC	TCCC,T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ZNF408
chrD1	100797887	TCC	TCCC,T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ZNF408
chrD1	100797995	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ZNF408
chrD1	100798882	TTATG	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF408
chrD1	116708183	G	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	MUC5B
chrD2	61650567	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	SEMA4G
chrD2	61650567	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	SEMA4G
chrD2	80108992	TAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TA,AAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TA,AAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TA,AAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TA,AAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2

Fortsetzung Tabelle 22

Chromosom	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD2	80108992	TAAAAAAAA	TAAA,TAA,TA,T,TAATAAAA,T AAAAA	1/5	4/5	4/5	1/3	4/4	upstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80171819	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TACC2
chrD2	80171819	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TACC2
chrD2	80171819	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TACC2
chrD2	80171819	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TACC2
chrD2	80171819	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TACC2
chrD2	80171819	C	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TACC2
chrD2	80325321	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	TACC2
chrD2	80325321	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	TACC2
chrD2	80325321	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	TACC2
chrD2	80325321	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	TACC2
chrD2	80325321	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	TACC2
chrD2	80325963	T	TA	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80326411	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80326419	AGGCTG	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80328895	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	TACC2
chrD2	80331533	TACAGA	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	BTBD16
chrD2	80331533	TACAGA	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	BTBD16
chrD2	80331533	TCACAGA	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	BTBD16
chrD2	80331533	TCACAGA	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	BTBD16
chrD2	80331948	CCCCAGCACAAA	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	BTBD16
chrD2	80331948	CCCCAGCACAAA	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	BTBD16
chrD2	80331948	CCCCAGCACAAA	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	BTBD16
chrD2	80331948	CCCCAGCACAAA	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	BTBD16

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD2	80343518	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	BTBD16
chrD2	80343518	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	BTBD16
chrD2	80343518	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	BTBD16
chrD3	256752	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	257303	A	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	257306	T	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	257321	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	257483	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	258617	A	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	258657	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	259134	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	259951	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	260265	ATATATATAT	A,AAATATAT	1/1	1/1	1/1	./.	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	260265	ATATATATAT	A,AAATATAT	1/1	1/1	1/1	./.	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	260906	A	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	261004	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	261322	GC	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	frameshift_variant	ZNF891
chrD3	262365	T	C	1/1	1/1	1/1	./.	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	263134	G	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	264701	T	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	264960	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	265369	CA	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266165	C	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266251	G	C,T	2/2	1/2	1/2	1/1	1/1	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266251	G	C,T	2/2	1/2	1/2	1/1	1/1	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266392	G	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266498	T	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD3	266533	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266547	G	GAA	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266560	T	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266561	T	A	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266689	G	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266796	T	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	266889	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF891
chrD3	549667	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ANKLE2
chrD3	549667	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ANKLE2
chrD3	553302	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	ANKLE2
chrD3	555663	T	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ANKLE2
chrD3	574879	A	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	POLE
chrD3	614355	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	POLE
chrD3	624914	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	POLE
chrD3	625880	A	G	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	POLE
chrD3	626224	G	C	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	POLE
chrD3	3256432	G	T	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	TMEM132
										C
chrD3	3256996	T	C	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	TMEM132
										C
chrD3	3257060	C	T	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	TMEM132
										C
chrD3	3257554	C	G	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	TMEM132
										C
chrD3	3260288	A	G	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	TMEM132
										C

Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromosom	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD3	3260435	C	T	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	TMEM132
chrD3	3261606	C	T	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	TMEM132
chrD3	3261606	C	T	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	TMEM132
chrD3	3261701	G	A	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	TMEM132
chrD3	3261701	G	A	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	TMEM132
chrD3	3261840	C	T	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	TMEM132
chrD3	3261840	C	T	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	missense_variant	TMEM132
chrD3	3467195	C	T	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	TMEM132
chrD3	21935526	G	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	INPP5J
chrD3	22672064	ACACT	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	upstream_gene_variant	LIF
chrD3	22676213	AACACACACAC	AACACACAC, AACACACAC	1/5	0/5	1/5	1/5	3/5	upstream_gene_variant	LIF
			ACAC, AACACACACACA							
			CAC, AACACACACACAC							
			ACAC, AACACACACACACA							
			CAC							
chrD3	22676213	AACACACACAC	AACACACAC, AACACACAC	1/5	0/5	1/5	1/5	3/5	upstream_gene_variant	LIF
			ACAC, AACACACACACA							
			CAC, AACACACACACAC							



Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen			
chrD3	22676213	AACACACACACAC	ACAC, AACACACACACACACA	1/5	0/5	1/5	1/5	3/5	upstream_gene_variant	LIF			
			CAC										
			AACACACACACAC										
			ACAC, A, AACACACACACACA										
			CAC, AACACACACACACACAC										
ACAC, AACACACACACACACA													
chrD3	22676213	AACACACACACAC	CAC	1/5	0/5	1/5	1/5	3/5	upstream_gene_variant	LIF			
			AACACACAC, AACACACACAC										
			ACAC, A, AACACACACACACA										
			CAC, AACACACACACACACAC										
			ACAC, AACACACACACACACA										
chrD3	22676213	AACACACACACAC	CAC	1/5	0/5	1/5	1/5	3/5	upstream_gene_variant	LIF			
			AACACACAC, AACACACACAC										
			ACAC, A, AACACACACACACA										
			CAC, AACACACACACACACAC										
			ACAC, AACACACACACACACA										
chrD3	22676213	AACACACACACAC	CAC	1/5	0/5	1/5	1/5	3/5	upstream_gene_variant	LIF			
			AACACACAC, AACACACACAC										
			ACAC, A, AACACACACACACA										
			CAC, AACACACACACACACAC										
			ACAC, AACACACACACACACA										
chrD3	22681834	G	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	missense_variant	LIF			
			chrD3	22685248	T	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	LIF
						C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	downstream_gene_variant	LIF

Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromosom	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD3	23711686	A	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	CD3H22orf31
chrD3	23711686	A	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	CD3H22orf31
chrD3	64810296	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PIK3C3
chrD3	64810586	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PIK3C3
chrD3	64810641	G	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PIK3C3
chrD3	64812624	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PIK3C3
chrD3	64812817	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PIK3C3
chrD3	64813240	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	PIK3C3
chrD3	64821864	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	PIK3C3
chrD4	56850951	G	A	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ACO1
chrD4	59369134	T	C	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	CD72
chrD4	59369134	T	C	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	CD72
chrD4	59369134	T	C	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	missense_variant	CD72
chrD4	59372514	C	T	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	5_prime_UTR_variant	CD72
chrD4	59372514	C	T	0/1	1/1	0/1	0/1	0/0	5_prime_UTR_variant	CD72
chrD4	64424225	GT	G	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrD4	64424229	T	G	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrD4	64424232	G	C	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrD4	64425998	C	A	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrD4	64426144	T	C	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrD4	64426742	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrD4	64426742	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	missense_variant	INVS
chrD4	64426742	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	missense_variant	INVS
chrD4	64426742	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	missense_variant	INVS

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrD4	64426742	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	missense_variant	INVS
chrD4	64426742	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	missense_variant	INVS
chrD4	64429974	CAACTT	C	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrD4	64430037	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrD4	64430066	G	A	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrD4	64430425	G	A	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	downstream_gene_variant	INVS
chrE1	793679	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	793957	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	794215	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	795009	G	A	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	796441	T	G	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	796441	T	G	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	796441	T	G	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	796442	T	C	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	796442	T	C	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	796442	T	C	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	796740	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	796740	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	796740	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	797063	C	A	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	797063	C	A	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	797063	C	A	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	800471	A	G	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	800471	A	G	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	800471	A	G	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	821301	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	KIAA0753
chrE1	821301	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	KIAA0753

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrE1	821301	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	KIAA0753
chrE1	821301	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	KIAA0753
chrE1	821301	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	KIAA0753
chrE1	821301	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	non_coding_transcript_exon_v ariant	KIAA0753
chrE1	821301	C	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	non_coding_transcript_exon_v ariant	KIAA0753
chrE1	833274	G	T	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	836083	A	AGACG	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	KIAA0753
chrE1	13447229	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	missense_variant	P2RX5
chrE1	13447229	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	missense_variant	P2RX5
chrE1	13447229	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	missense_variant	P2RX5
chrE1	13447229	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	missense_variant	P2RX5
chrE1	13447229	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	missense_variant	P2RX5
chrE1	13447229	C	T	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	missense_variant	P2RX5
chrE1	43116340	A	G	1/1	0/1	0/1	1/1	0/0	missense_variant	NAGLU
chrE1	43116340	A	G	1/1	0/1	0/1	1/1	0/0	missense_variant	NAGLU
chrE1	43121604	AAGG	A	1/1	0/1	0/1	1/1	0/0	downstream_gene_variant	NAGLU
chrE1	43122457	C	T	1/1	0/1	0/1	1/1	0/0	downstream_gene_variant	NAGLU
chrE1	43123102	G	A	1/1	0/1	0/1	1/1	0/0	downstream_gene_variant	NAGLU
chrE1	43123133	CTTT	CTTTT,CTTTT,CTTTT,CTT C	5/5	0/5	0/5	5/5	0/0	downstream_gene_variant	NAGLU
chrE1	43123133	CTTT	CTTTT,CTTTT,CTTTT,CTT C	5/5	0/5	0/5	5/5	0/0	downstream_gene_variant	NAGLU
chrE1	43123133	CTTT	CTTTT,CTTTT,CTTTT,CTT C	5/5	0/5	0/5	5/5	0/0	downstream_gene_variant	NAGLU

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrE1	43123133	CTTT	CTTTT,CTTTT,CTTTT,CTT, 5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/0	downstream_gene_variant	NAGLU
			C							
chrE2	8140197	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	missense_variant	NUP62
chrE2	8142722	G	A	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	NUP62
chrE2	8142848	G	A	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	NUP62
chrE2	8142870	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	NUP62
chrE2	8143043	C	T	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	NUP62
chrE2	8144100	A	G	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	NUP62
chrE2	8144435	G	GCA	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	NUP62
chrE2	8145895	T	C	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	downstream_gene_variant	NUP62
chrE2	17402653	G	A	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	missense_variant	ZNF567
chrE2	35145029	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	SLC6A2
chrE2	35145029	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	SLC6A2
chrE2	35145056	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	SLC6A2
chrE2	35145056	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/1	upstream_gene_variant	SLC6A2
chrE2	35190466	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	SLC6A2
chrE2	35192519	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	SLC6A2
chrE2	35192519	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	SLC6A2
chrE2	35193115	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	SLC6A2
chrE2	35193115	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	SLC6A2
chrE2	35197613	A	ATT,AAATTTT,AT,ATTT,AAAT	3/4	1/3	3/4	4/4	0/4	downstream_gene_variant	SLC6A2
			T							
chrE2	35197613	A	ATT,AAATTTT,AT,ATTT,AAAT	3/4	1/3	3/4	4/4	0/4	downstream_gene_variant	SLC6A2
			T							
chrE2	35197613	A	ATT,AAATTTT,AT,ATTT,AAAT	3/4	1/3	3/4	4/4	0/4	downstream_gene_variant	SLC6A2
			T							

## Fortsetzung Tabelle 22

Chromosom	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrE2	35197613	A	A,T,AA,T,T,T,T,AT,A,T,T,AA,T,T	3/4	1/3	3/4	4/4	0/4	downstream_gene_variant	SLC6A2
			T							
chrE2	35197613	A	A,T,AA,T,T,T,T,AT,A,T,T,AA,T,T	3/4	1/3	3/4	4/4	0/4	downstream_gene_variant	SLC6A2
			T							
chrE2	35197949	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	SLC6A2
chrE2	46335975	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	CDH1
chrF1	38132103	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38133192	A	AAG,AAAG,AG,AAAAAG,AAA AG	3/5	3/5	3/5	0/5	5/5	upstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38133192	A	AAG,AAAG,AG,AAAAAG,AAA AG	3/5	3/5	3/5	0/5	5/5	upstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38133192	A	AAG,AAAG,AG,AAAAAG,AAA AG	3/5	3/5	3/5	0/5	5/5	upstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38133192	A	AAG,AAAG,AG,AAAAAG,AAA AG	3/5	3/5	3/5	0/5	5/5	upstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38133192	A	AAG,AAAG,AG,AAAAAG,AAA AG	3/5	3/5	3/5	0/5	5/5	upstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38133211	G	GC	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38133533	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38133610	C	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38138686	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	CFHR5
chrF1	38167978	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38168766	AATTG	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38169273	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38170057	T	TAA,TA	0/1	0/1	0/1	0/2	0/0	downstream_gene_variant	CFHR5
chrF1	38170057	T	TAA,TA	0/1	0/1	0/1	0/2	0/0	downstream_gene_variant	CFHR5
chrF2	84170077	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	LY6D

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrF2	84170455	G	A	0/1	1/1	0/1	0/0	./.	downstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84172967	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84173974	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84174550	G	GGGA	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84176289	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	LY6D
chrF2	84176839	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84177903	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84178348	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84179456	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84179498	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84179556	G	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	upstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84180822	C	CCATCCATTTCATCCAT,CCATC CATCCATCCATTTCATCCAT,CC ATCCATCCATTTCATCCAT,CCT TCCATTTCATCCAT	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	upstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84180822	C	CCATCCATTTCATCCAT,CCATC CATCCATCCATTTCATCCAT,CC ATCCATCCATTTCATCCAT,CCT TCCATTTCATCCAT	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	upstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84180822	C	CCATCCATTTCATCCAT,CCATC CATCCATCCATTTCATCCAT,CC ATCCATCCATTTCATCCAT,CCT TCCATTTCATCCAT	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	upstream_gene_variant	LY6D
chrF2	84180822	C	CCATCCATTTCATCCAT,CCATC CATCCATCCATTTCATCCAT,CC ATCCATCCATTTCATCCAT,CCT TCCATTTCATCCAT	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	upstream_gene_variant	LY6D

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrF2	84450218	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	missense_variant	ZNF696
chrF2	84451734	G	A	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF696
chrF2	84454487	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF696
chrF2	84455235	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF696
chrF2	84455278	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF696
chrF2	84455292	T	C	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	downstream_gene_variant	ZNF696
chrF2	84456054	TTGTGTGTGTGTGT	TTGTGTGTGTGTGTGTGT	0/2	0/2	1/2	0/1	4/6	downstream_gene_variant	ZNF696
		GTGTGTGTG	TGTGTG,TTGTGTGTG,T,TT							
			GTGTGTGTGTGTGTGTGTG							
			TGTGTGTGTG,TTGTGTG,TTG							
			TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT							
			GTGTGTGTG							
chrF2	84456054	TTGTGTGTGTGTGTGT	TTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	0/2	0/2	1/2	0/1	4/6	downstream_gene_variant	ZNF696
		GTGTGTGTG	TGTGTG,TTGTGTGTG,T,TT							
			GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG							
			TGTGTGTGTG,TTGTGTG,TTG							
			TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT							
			GTGTGTGTG							
chrF2	84456054	TTGTGTGTGTGTGTGT	TTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	0/2	0/2	1/2	0/1	4/6	downstream_gene_variant	ZNF696
		GTGTGTGTG	TGTGTG,TTGTGTGTG,T,TT							
			GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG							
			TGTGTGTGTG,TTGTGTG,TTG							
			TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT							
			GTGTGTGTG							



Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chr2	84456054	TTGTGTGTGTGTGT GTGTGTGTG	TGTGTGTGTG,TTGTGTG,TTG	0/2	0/2	1/2	0/1	4/6	downstream_gene_variant	ZNF696
			TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT							
			GTGTGTG							
			TTGTGTGTGTGTGTGTGTGT							
			TGTGTG,TTGTGTGTG,T,TT							
chr2	84456054	TTGTGTGTGTGTGT GTGTGTGTG	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG	0/2	0/2	1/2	0/1	4/6	downstream_gene_variant	ZNF696
			TGTGTG,TTGTGTGTG,T,TT							
			GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG							
			TGTGTGTGTG,TTGTGTG,TTG							
			TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT							
GTGTGTG										
chr2	84456054	TTGTGTGTGTGTGT GTGTGTGTG	TTGTGTGTGTGTGTGTGTG	0/2	0/2	1/2	0/1	4/6	downstream_gene_variant	ZNF696
			TGTGTG,TTGTGTGTG,T,TT							
			GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG							
			TGTGTGTGTG,TTGTGTG,TTG							
			TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT							
GTGTGTG										
chrX	13611462	G	CCGCCGC	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	disruptive_inframe_insertion	REPS2
chrX	13611462	G	CCGCCGC	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	disruptive_inframe_insertion	REPS2
chrX	13611462	G	CCGCCGC	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	disruptive_inframe_insertion	REPS2
chrX	13611462	G	CCGCCGC	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	disruptive_inframe_insertion	REPS2
chrX	13830659	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13830659	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13830659	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13830659	C	T	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13832099	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13832099	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13832099	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13832099	A	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2

Anhang

Fortsetzung Tabelle 22

Chromo- som	Position	Referenz	Variante	K515	K528	K529	K530	K531	Effekt/ Lokalisation	Gen
chrX	13832706	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13832706	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13832706	T	G	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant	REPS2
chrX	13838458	CGTGTGTGTGTGTG TGT	CGTGTGTGTGTGTG TGTGTGTGTGTGT GTGTGTGT	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	3_prime_UTR_variant downstream_gene_variant	REPS2
chrX	36131210	GGGCGGGGGAGA GGCGGGGA	G	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	conservative_inframe_deletion	MEDI40S

Tabelle 23: Primärdaten der Perserkatzen im Studienkollektiv, aufsteigend nach dem Wert des kranialen Index. Die Schwellenwerte des kranialen Index bei 70 und 83 sind durch eine Trennlinie hervorgehoben.

Proband	kranialer Index	Geschlecht	Alter in Jahren	Gewicht in kg
1	62,00	m	10	2,4
2	66,54	m	2	4,05
3	66,97	m	0,92	3,1
4	68,05	w	1	3
5	68,71	m	7	4,3
6	69,88	w	2	4,4
7	71,19	m	2	2,8
8	73,73	w	11	3,7
9	76,11	w	5	2,6
10	76,79	m	0,75	3
11	77,12	w	5	2,8
12	80,86	w	4	3,3
13	82,00	w	12	3
14	85,41	m	4	3,2
15	86,11	m	12	3,8
16	87,22	w	14	2,7
17	87,35	m	1	2,5
18	88,16	w	3	3,3
19	88,53	w	0,58	1,8
20	89,18	m	1	3,1
21	90,06	m	2	4,1
22	90,46	w	11	3,9
23	90,67	w	3	3,5
24	90,98	w	4	3

Fortsetzung Tabelle 23

Proband	kranialer Index	Geschlecht	Alter in Jahren	Gewicht in kg
25	92,40	w	0,92	2,9
26	92,60	m	18	3,3
27	93,04	w	2	2,5
29	93,93	m	12	6,2
30	94,24	w	13	3,6
30	94,57	w	0,58	2,2
31	94,68	w	1	2,3
32	95,24	m	2	3,7
33	96,00	w	6	2,9
34	96,09	w	0,58	2,6
35	96,84	w	0,5	2,1
36	96,88	m	5	4,4
37	96,89	w	0,75	2,1
38	98,25	w	6	3,2
39	98,26	w	0,33	2,4
40	98,67	w	0,67	2
41	99,17	m	6	3,2
42	99,33	m	4	5,4
43	99,51	m	0,58	2,3
44	100,16	w	2	4
45	101,00	w	0,1	0,5
46	101,20	w	2	2,5
47	102,24	m	1	3,9
48	106,94	m	1	4,3
49	111,45	m	0,58	2,5
50	113,09	m	1,5	4
51	118,00	w	0,1	0,3
52	120,00	m	0,1	0,3
53	120,39	w	0,1	0,35

## Fortsetzung Tabelle 23

Proband	kranialer Index	Geschlecht	Alter in Jahren	Gewicht in kg
54	123,00	m	0,1	0,4

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Schmidt für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas, seine fachliche Expertise und seine ansteckende Begeisterung für die Thematik. Seine warmherzige und verständnisvolle Art führte zu einer großartigen Arbeitsatmosphäre und einer entsprechend hohen Motivation für die Durchführung dieser Arbeit.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Gesine Lühken. Jederzeit gewährte sie mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Dr. Jochen Bathke möchte ich mich für die Unterstützung bei der bioinformatischen Datenauswertung und bei Frau Stephanie Steitz für die Hilfe bei der ausgedehnten Labortätigkeit herzlich bedanken. Sie haben mir beide jederzeit umfangreiche und geduldige Unterstützung entgegengebracht.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meine Eltern, Großeltern und Schwester haben mich zeitlebens in jeglicher Hinsicht unterstützt und mir immer volles Verständnis entgegenbracht. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat. Ich stimme zu, dass die vorliegende Arbeit mit einer Anti-Plagiatssoftware überprüft werden darf.

Gießen, den 15.09.2022

Julia Katharina Renate Hahlweg



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7068-7



9 17 8 3 8 3 5 19 7 0 6 8 7