



ARTIGO ORIGINAL

Nova mutação *nonsense* em homozigose no gene *NECTIN4* em família paquistanesa com displasia ectodérmica-síndrome da sindactilia-1 ☆,☆☆



Bibi Hajra ^{ib a}, Abdullah Abdullah ^{ib b}, Nousheen Bibi ^{ib c}, Fibhaa Syed ^{ib d}, Asmat Ullah ^{ib d,e}, Wasim Ahmad ^{ib b} e Umm e-Kaloom ^{ib a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Hazara University, Mansehra, Paquistão

^b Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências Biológicas, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Paquistão

^c Departamento de Bioinformática, Shaheed Benazir Bhutto Women University, Peshawar, Paquistão

^d Departamento de Medicina Geral, Shaheed Zulfiqar Ali Bhutto Medical University, PIMS, Islamabad, Paquistão

^e Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research, Setor de Genética do Metabolismo, Faculdade de Saúde e Ciências Médicas, University of Copenhagen, Copenhagen, Dinamarca

Recebido em 22 de março de 2022; aceito em 27 de julho de 2022

PALAVRAS-CHAVE

Ceratoderma palmoplantar;
Displasia ectodérmica;
Sindactilia

Resumo

Fundamentos: A displasia ectodérmica-síndrome da sindactilia-1 (EDSS1) é doença hereditária rara caracterizada por defeitos nos dentes, cabelos e unhas em associação com a fusão dos dígitos. Geneticamente, os fenótipos da doença são causados por variantes homozigóticas e heterozigóticas compostas no gene *NECTIN4*.

Objetivo: O principal objetivo do estudo foi identificar variantes na sequência patogênica para triagem familiar e identificação de portadores.

Métodos: No presente estudo, os autores investigaram uma grande família consanguínea de origem paquistanesa segregando EDSS1 autossômica recessiva. Todos os éxons codificadores do gene *NECTIN4* foram sequenciados diretamente utilizando *primers* específicos do gene.

Resultados: Os indivíduos afetados apresentaram as características clínicas clássicas da EDSS1, incluindo cabelos ralos, unhas hipoplásicas com lâmina ungueal grossa, plana e descolorida, dentes em forma de pino, cônicos e amplamente espaçados com hipoplasia do esmalte, sindactilia proximal e dos pés. A análise da sequência da região codificadora do *NECTIN4* identificou uma nova variante *nonsense* [c.163C>T; p.(Arg55*)] no éxon 2 do gene.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2022.07.009>

☆ Como citar este artigo: Hajra B, Abdullah A, Bibi N, Syed F, Ullah A, Ahmad W, et al. A novel homozygous nonsense mutation in *NECTIN4* gene in a Pakistani family with ectodermal dysplasia syndactyly syndrome 1. An Bras Dermatol. 2023;98:580–6.

☆☆ Trabalho realizado na Hazara University, Mansehra e Quaid-i-Azam University, Islamabad, Paquistão.

* Autor para correspondência.

E-mails: Kaloom.u@hu.edu.pk, kaloom.ibrahim@hotmail.com (U. e-Kaloom).

A análise computacional da estrutura da proteína revelou que a variante induziu a terminação prematura em Arg55 localizado na região de *loop V* semelhante a Ig, levando à perda de domínios do tipo Ig-C2 e região transmembrana, e provavelmente a função da nectina-4 será perdida.

Limitação do estudo: Não houve estudos de expressão gênica que fortaleceriam os achados da análise computacional.

Conclusão: O presente estudo ampliou o espectro fenotípico e de mutação do gene *NECTIN4*. Além disso, o estudo pode ajudar na testagem de portadores e no diagnóstico pré-natal das famílias afetadas.

© 2023 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

As displasias ectodérmicas (DEs) constituem um grupo de alterações congênitas que afetam a pele ou seus anexos, incluindo cabelos, dentes, unhas e glândulas sudoríparas. As DEs são heterogêneas tanto nas causas genéticas quanto nos fenótipos clínicos, com mais de 200 formas diferentes relatadas até o momento e prevalência estimada de aproximadamente 7/10.000 nascimentos em todo o mundo.¹ Os sistemas de classificação iniciais foram estabelecidos com base principalmente nas características fenotípicas e no modo de herança. Abordagens mais recentes incluem uma variedade de dados moleculares que facilitam o estabelecimento da relação do defeito genético com o efeito na estrutura e função da proteína e os fenótipos resultantes.²

DE envolvendo anormalidades congênitas dos cabelos junto com sindactilia é forma muito rara que foi mapeada nos cromossomos 1q23.1-q23.3 e 7p21.1-p14.3, causando a DE-síndrome de sindactilia-1 (EDSS1; OMIM 613573) e EDSS2 (OMIM 613576), respectivamente. Os achados clínicos característicos incluem cabelos/pelos ralos ou ausentes no couro cabeludo, sobrancelhas e cílios, dentição anormal (dentes em forma de pino, coroas cônicas e defeitos no esmalte), unhas hipoplásicas, ceratoderma palmoplantar e sindactilia parcial bilateral, afetando de maneira variável os dedos das mãos e dos pés.^{3,4} Foi relatado que a EDSS1 é causada por variantes no gene relacionado ao receptor do poliovírus 4 (*PVRL4*), recentemente denominado molécula de adesão celular Nectina-4 (*NECTIN4*). A *NECTIN4* codifica um membro da família de nectinas de moléculas de adesão celular, Nectina-4, que mostra alta expressão nas junções de aderência (JA) da epiderme suprabasal, folículos pilosos, queratinócitos cultivados e na separação de dígitos do embrião murino.⁴ O gene causador da EDSS2 ainda não foi relatado.

O presente estudo relata uma grande família paquistanesa com 15 indivíduos afetados segregando EDSS1 autossômico recessivo. Todos os indivíduos afetados apresentavam anormalidades capilares e dentárias, além de sindactilia bilateral. O sequenciamento direto do gene candidato identificou uma nova variante *nonsense* em homozigose [c.163C>T; p.(Arg55*)] no gene *NECTIN4*, expandindo assim o espectro fenotípico e molecular dessa doença rara.

Métodos

O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque de 2013. O consentimento informado por escrito foi

obtido dos participantes do estudo e a aprovação foi obtida do Comitê de Ética institucional e do Comitê de Revisão Ética (F. nº 73/HU/ORIC/2021/754) da instituição controladora.

Desenho da linhagem e extração de DNA

Para a elaboração da linhagem (fig. 1A), coleta de sangue e diagnóstico clínico, os membros afetados (IV-9, V-3, V-4) foram visitados em sua residência no distrito de Mansehra, divisão de Hazara, Khyber Pakhtunkhwa, Paquistão. Todos os indivíduos participantes foram informados sobre o objetivo e as consequências do projeto de pesquisa. Após serem informados, os idosos da família foram entrevistados para traçar a linhagem e o início da doença. Amostras de sangue venoso foram obtidas da veia antecubital. O sangue coletado foi armazenado em tubos contendo EDTA rotulados com as identificações dos indivíduos. O DNA genômico foi extraído de todas as amostras de sangue coletadas utilizando o procedimento padrão com fenol-clorofórmio. O DNA foi quantificado utilizando-se espectrofotômetro Nanodrop-1000 (Thermal Scientific, Wilmington, MA).

Sequenciamento de genes-alvo

Com base no padrão de herança da doença, consanguinidade e associação do gene *NECTIN4* com fenótipos semelhantes da doença, o sequenciamento de Sanger direcionado para a mutação foi realizado utilizando DNA de um indivíduo afetado (IV-9). *Primers* para sequenciamento dos éxons de codificação e os limites íntron-éxon de *NECTIN4* foram projetados a partir de regiões intrônicas utilizando o *software* PRIMER-3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). A especificidade dos *primers* foi verificada usando ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). As sequências de nucleotídeos dos *primers* estão disponíveis mediante solicitação. Os *primers* foram amplificados, purificados e sequenciados usando condições padrão.⁵ Os produtos amplificados por PCR foram purificados utilizando *kit* comercialmente disponível (Axygen, CA, EUA). O sequenciamento de Sanger foi realizado usando *kit* Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O editor de alinhamento de sequências BIOEDIT, versão 6.0.7 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado para a identificação das variantes. MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) foi usado para calcular o escore de patogenicidade da variante identificada.

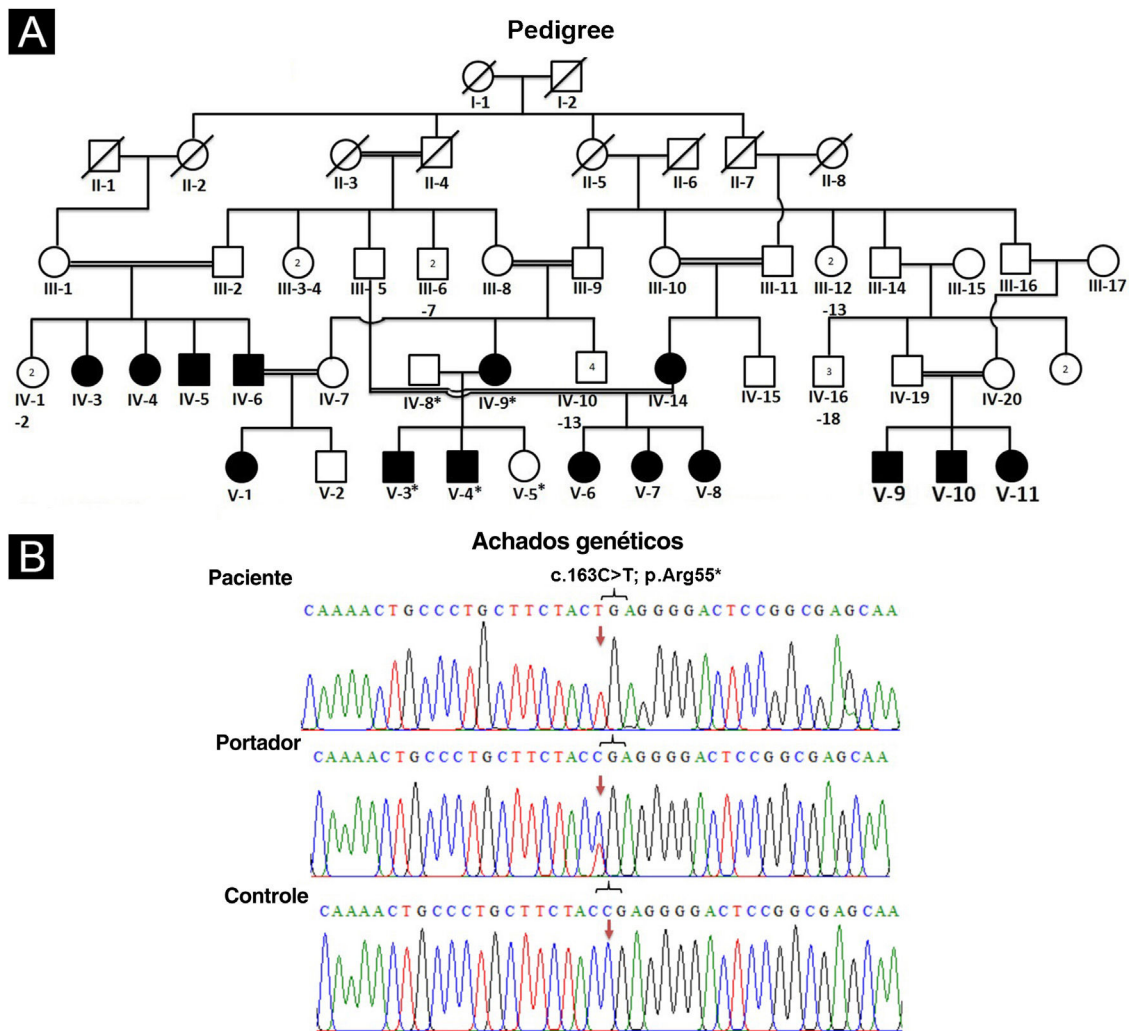


Figura 1 (A) Linhagem de família afetada mostrando segregação de EDSS1 na forma autossômica recessiva. (B) Cromatograma de sequenciamento do gene *NECTIN4* indicando variante *nonsense* (c.163C>T) em homozigose em indivíduos afetados (painel superior), em heterozigose em portador IV-8 (painel do meio) e alelo do tipo selvagem homozigoto (C) em indivíduo normal (painel inferior). As setas são utilizadas para destacar a posição da variante

Estrutura secundária e terciária da Nectina-4

A estrutura cristalina do fragmento extracelular de Nectina-4 humana foi recuperada do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) com PDBID:4FRW. A estrutura cristalina está disponível na conformação de dímeros abrangendo o domínio extracelular D1-D2 da Nectina-4. Chimera 1.5.6,⁶ e VEGA ZZ (<http://www.ddl.unimi.it>) foram usados para minimização de energia e refinamento de estrutura. A estrutura secundária foi recuperada por meio do PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk>).

Resultados

Achados clínicos

Todos os indivíduos afetados na família apresentaram fenótipos ectodérmicos específicos de EDSS1, isto é, cabelos, dentes, unhas e pele anormais. Os fenótipos de cabelo observados em indivíduos afetados incluíam cabelo ralos no couro

cabeludo, sobrancelhas e cílios e pelos ausentes no restante do corpo (fig. 2). A pele era seca, apresentando descamação, com hiperqueratose e ceratoderma palmoplantar (fig. 3). Os dentes tinham formato de pino ou eram cônicos e amplamente espaçados, com hipoplasia de esmalte (fig. 4A). Todos os membros afetados tinham palmas grandes e dedos curtos (fig. 2). As unhas eram hipoplásicas com lâmina ungueal descolorida (fig. 4B). Sindactilia cutânea proximal do 2°, 3° e 4° dedos foi observada bilateralmente em dois membros afetados (V-3, V-4; fig. 3A) e na mão direita da mãe afetada (IV-9; fig. 3B). Da mesma maneira, sindactilia do 2° e 3° dedos dos pés foi observada nos pés de V-3 e V-4 (fig. 5A), enquanto o 2° ao 5° dedo da mãe (IV-9) apresentava fusão a nível cutâneo até a articulação interfalangiana distal (fig. 5B). Além disso, eles apresentavam sudorese quase insignificante e enfrentavam intolerância ao calor durante o verão.

Achados genéticos

A análise da linhagem indicou claramente o padrão de herança autossômica recessiva. A comparação dos

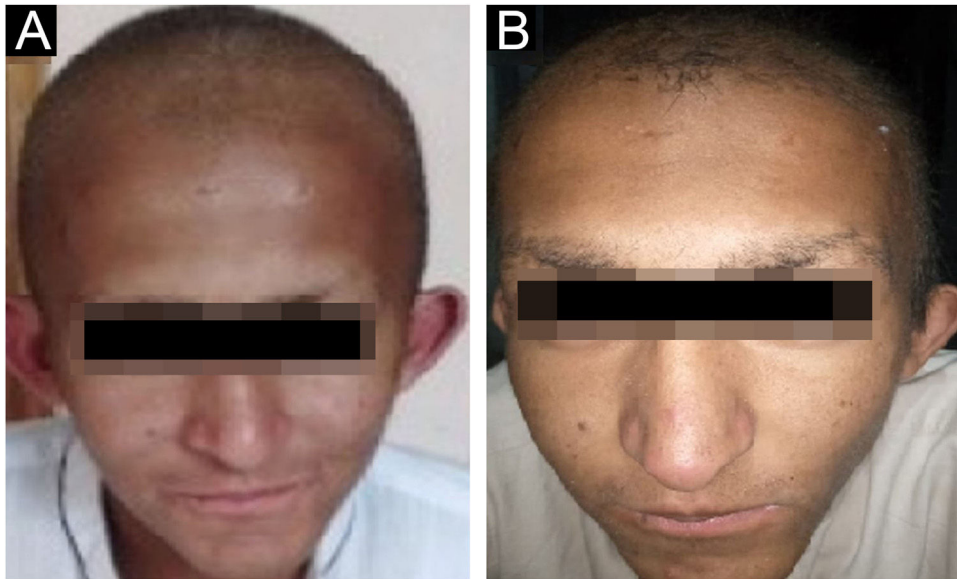


Figura 2 Fotografias faciais de indivíduos afetados (V-3 e V-4 são mostradas nos painéis A e B, respectivamente). Cabelos ralos no couro cabeludo, sobrancelhas e cílios e pavilhões auriculares deformados são claramente evidentes

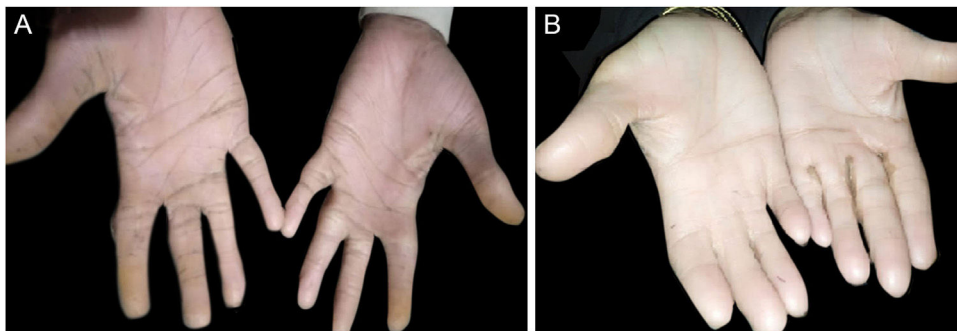


Figura 3 Mãos do membro afetado (V-4 e IV-9) mostrando palma grande, dedos curtos, pele seca e descamativa, ceratodermia e sindactilia proximal do 2°, 3° e 4° dedos em V-4 (A) e na mão direita de IV-9 (B)

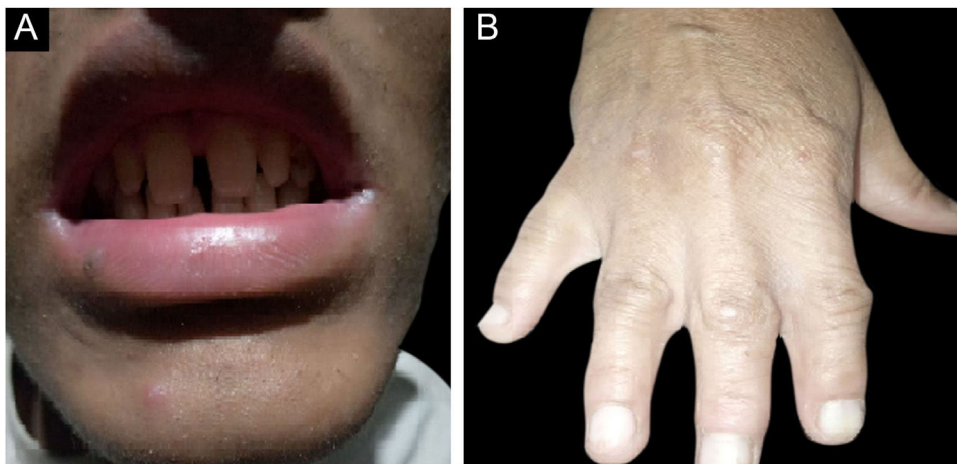


Figura 4 (A) Dentes em formato de pino, cônicos e amplamente espaçados com hipoplasia de esmalte. (B) Mão de um membro afetado (IV-9) mostrando lâmina ungueal hipoplásica e descolorida

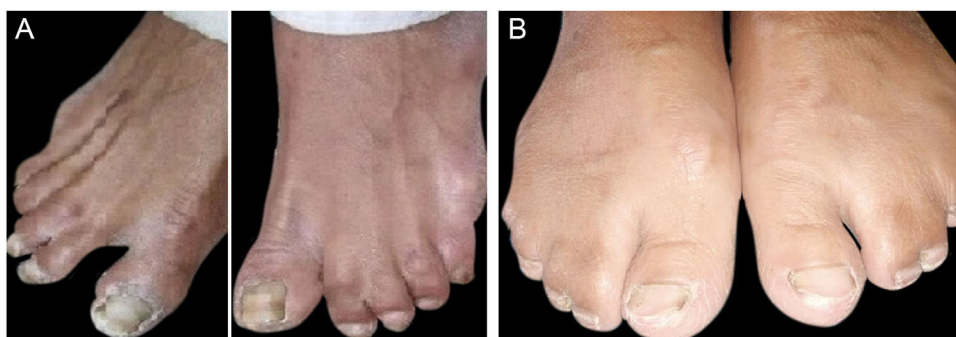


Figura 5 (A) Pés de um membro afetado (V-3) mostrando sindactilia bilateral de 2-3 artelhos. (B) Pés de mãe afetada (IV-9) mostrando fusão do 2º ao 5º dedos até a articulação interfalângiana distal

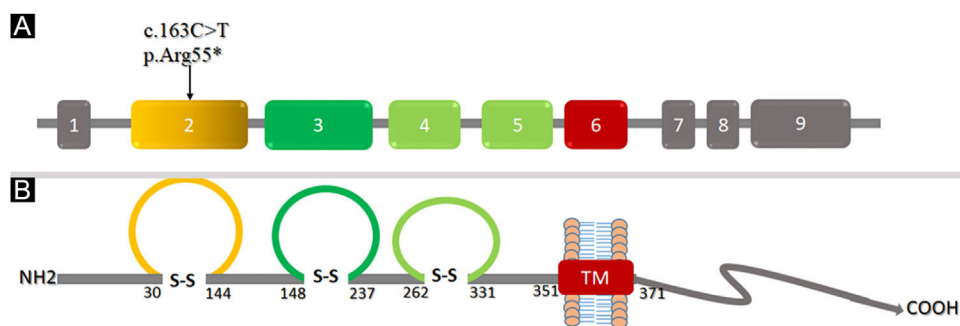


Figura 6 (A-B) Arquitetura do domínio do gene da Nectina-4 mostrando três domínios extracelulares semelhantes a Ig nas cores amarela e verde, respectivamente, enquanto a região transmembrana é mostrada na cor vermelha. Os números denotam os aminoácidos localizados nos limites de cada domínio

resultados de sequenciamento gerados a partir do DNA dos pacientes IV-9, V-3, V-4 com a sequência de referência revelou variante de sequência em homozigose (c.163C>T) no éxon 2 do gene (fig. 1B). O sequenciamento da variante identificada em membros normais (IV-8, V-5) confirmou seu estado heterozigoto, consistente com o modo de herança autossômica recessiva. A variante não estava presente em 50 indivíduos saudáveis etnicamente pareados. A patogenicidade da variante obedeceu às diretrizes do American College of Medical Genetics (ACMG)⁷ e fenótipos clínicos consistentes. A variante não estava presente em ExAC ou 1000G e foi prevista como causadora de doença pelo Mutation Taster.

Análise estrutural da Nectina-4

Para entender as mudanças conformacionais na estrutura tridimensional da proteína, é essencial o conhecimento das características da estrutura secundária. A variante identificada (p.Arg55*) foi mapeada no primeiro domínio semelhante a Ig-V da Nectina-4 abrangendo 30-144 resíduos (fig. 6). A análise da estrutura em 2D revelou seis folhas β , três α -hélices e duas pontes dissulfeto (fig. 7A). A terminação da Nectina-4 na posição Arg55 resultou na perda de toda a estrutura secundária e, eventualmente, na perda da estrutura terciária e suas interações biológicas.

A análise do modelo em 3D do domínio extracelular D1-D2 da Nectina-4 indicou que Arg55 está localizada na região de loop V semelhante a Ig, que é crítica para a produção

de dímeros cis e trans de Nectina-4 (fig. 7B), altamente conservada entre espécies diferentes (fig. 8A). Em decorrência do término prematuro, a proteína Nectina-4 perderá os domínios do tipo Ig-C2 e a região transmembrana (fig. 8B), provavelmente causando perda da função da Nectina-4 que levou aos fenótipos EDSS1.

Discussão

As nectinas compostas por quatro membros (Nectinas 1-4) constituem uma família de moléculas de adesão celular que pertencem à superfamília das imunoglobulinas (IgSF). Essas proteínas, independentemente ou com outras proteínas caderinas, desempenham papel significativo na formação de junções de aderência que fazem a mediação da adesão célula-célula.⁸⁻¹¹ Todas as nectinas têm estrutura característica composta por um ectodomínio formado por três domínios semelhantes a imunoglobulinas (Ig), uma única região transmembrana e um domínio citoplasmático.¹² O domínio citoplasmático reconhece uma afadina, a molécula adaptadora que se liga e recruta grupos de actina filamentososa (actina F), que facilitam a adesão célula-célula.^{13,14} Os domínios semelhantes a Ig das nectinas são especializados na mediação das interações homofílicas ou heterofílicas. Particularmente, as trans-interações de Nectina-1 e Nectina-4 regulam a reforma do citoesqueleto de actina por meio da ativação de Rac1, um membro da família Rho de pequenas GTPases que aumenta o agrupamento da molécula de adesão.^{12,15} A trans-dimerização

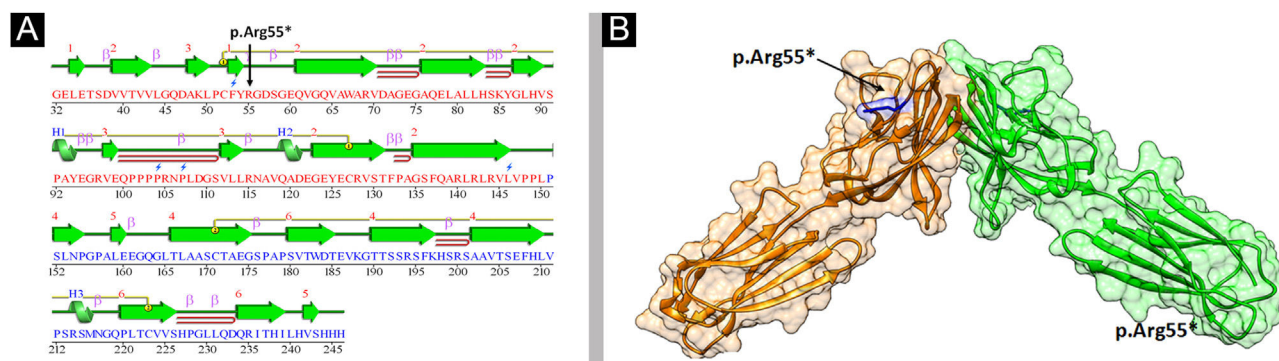


Figura 7 (A) Estrutura secundária do domínio do gene da Nectina-4 D1-D2. (B) Estrutura em 3D do dímero da Nectina-4 na faixa de 32 a 243 aminoácidos. Duas subunidades do dímero são representadas na fita laranja e verde com Arg55 mostrado no modelo de bastão azul

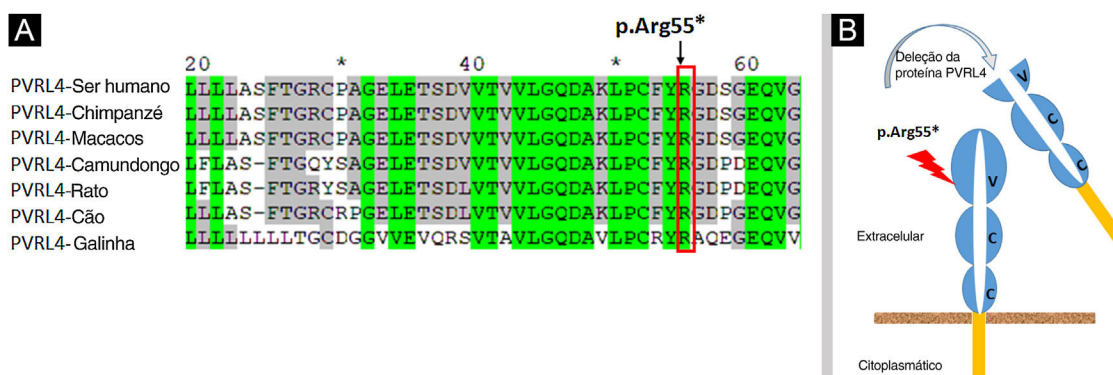


Figura 8 (A) Alinhamento de sequência mostrando a conservação de Arg55 em sete espécies. (B) Modelo esquemático representando a deleção dos domínios funcionais da proteína Nectina-4 na variante Arg55*

defeituosa decorrente da perda ou comprometimento da Nectina-1 (também conhecida como PVRL1) ou Nectina-4 causa defeito na adesão célula-célula normal e causa DE com fenda labial/palatina (CLPED1) e EDSS1, respectivamente,^{4,16,17} ambas caracterizadas por anormalidades em cabelos e dentes juntamente com sindactilia.

O sequenciamento de Sanger dos éxons codificadores do gene NECTIN4 identificou uma nova variante homozigótica nonsense (c.163C>T) nos indivíduos afetados da família aqui relatada. Prevê-se que essa variante resulte na perda da função da Nectina-4 por meio de declínio do mRNA mediado por mutação nonsense (NMD, do inglês nonsense-mediated mRNA decay) ou por meio da produção de proteína truncada. A análise computacional das estruturas em 2D e 3D da proteína confirmou que essa variante (p.Arg55*) causou o término prematuro da Nectina-4; portanto, a maior parte do domínio Ig, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático não serão codificados. Assim, a função da proteína Nectina-4 (adesão célula-célula) é prejudicada/perdida na via de sinalização RAC1, levando aos fenótipos da doença EDSS1.

Essa é a terceira variante *nonsense* no gene NECTIN4, elevando assim o número total de variantes para 11. Anteriormente, cinco variantes missense (p.Leu81Pro, p.His83Tyr, p.Pro212Arg, p.Val242Met, p.Arg284Gln), uma variante com mudança de quadro de leitura (variante frameshift: p.Gln384ArgfsTer7), uma deleção no quadro do éxon 2, duas

variantes *nonsense* (p.Asp61Ter, p.Gln77Ter) e uma variante heterozigótica composta (p.Thr185Met; p.Pro304HisfsTer2) tinham sido relatadas no gene NECTIN4.^{4,18-25} A maioria dos fenótipos clínicos dos pacientes no presente estudo, como sindactilia de dedos 2-3-4 e artelhos 2-3-4-5, lâmina ungueal espessa, plana e descolorida com hiperqueratose das unhas das mãos e dos pés, ceratoderma palmoplantar, pavilhões auriculares deformados, sudorese insignificante e intolerância ao calor também foram relatados por Raza et al.²¹ Isso provavelmente se deve ao fato de que ambas as variantes são do tipo *nonsense* e estão localizadas na região de loop V semelhante a Ig, que é crítica para a produção de dímeros cis e trans de Nectina-4. Em comparação ao presente estudo, a hipoplasia do esmalte foi mais grave, com morfologia mal definida da superfície da coroa em uma variante *nonsense* herdada em família da Caxemira (p.Asp61*). Os pacientes do presente estudo tinham cabelos curtos e ralos no couro cabeludo, sobrancelhas e cílios, como relatado anteriormente,²³⁻²⁵ mas a anomalia dos cabelos era congênita e não progressiva, conforme relatado nas famílias descritas por Brancati et al.,⁴ Fortugno et al.²⁴ e Florian et al.²⁵

Todas as variantes de sequência relatadas até o momento em NECTIN4 em famílias paquistanesas e famílias da Caxemira administrada pelo Paquistão segregando EDSS1 estão presentes no domínio extracelular de Nectina-4. A variante (p.Arg55*) identificada no presente estudo também está localizada no domínio extracelular. Portanto, sugere-se que

as famílias da mesma origem afetadas com EDSS1 sejam estudadas quanto a variações na região que codifica o domínio extracelular antes de realizar o sequenciamento completo do genoma/exoma.

Conclusão

O estudo não apenas expandiu o espectro de mutações no gene *NECTIN4*, mas também enfatiza a importância do teste de genes-alvo como poderosa ferramenta diagnóstica para a determinação conclusiva do tipo específico de DE.

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Bibi Hajra: Obtenção, análise e interpretação dos dados.

Abdullah Abdullah: Revisão crítica da literatura; participação efetiva na orientação da pesquisa.

Nousheen Bibi: Obtenção, análise e interpretação dos dados.

Fibhaa Syed: Obtenção, análise e interpretação dos dados.

Asmat Ullah: Elaboração e redação do manuscrito.

Wasim Ahmad: Aprovação da versão final do manuscrito; revisão crítica do manuscrito.

Umm-e-Kalsoom: Elaboração e redação do manuscrito, concepção e planejamento do estudo.

Conflito de interesses

Nenhum.

Agradecimento

Os autores agradecem a participação da família afetada no presente estudo.

Referências

1. Itin PH, Fistarol SK. Ectodermal dysplasias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004;131:45–51.
2. Wright JT, Fete M, Schneider H, Zinser M, Koster MI, Clarke AJ, et al. Ectodermal dysplasias: classification and organization by phenotype, genotype, and molecular pathway. *Am J Med Genet A.* 2019;179:442–7.
3. Tariq M, Khan MN, Ahmad W. Ectodermal dysplasia-cutaneous syndactyly syndrome maps to chromosome 7p21.1-p14.3. *Hum Genet.* 2009;125:421–9.
4. Brancati F, Fortugno P, Bottillo I, Lopez M, Josselin E, Boudghene-Stambouli O, et al. Mutations in PVRL4, encoding cell adhesion molecule nectin-4, cause ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome. *Am J Hum Genet.* 2010;87:265–73.
5. Ullah A, Hammid A, Umair M, Ahmad W. A novel heterozygous intragenic sequence variant in DLX6 probably underlies first case of autosomal dominant split-hand/foot malformation type 1. *Mol Syndromol.* 2017;8:79–84.
6. Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Huang CC, Ferrin TE. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF chimera. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:339.
7. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–24.
8. Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:119–46.
9. Takai Y, Ikeda W, Ogita H, Rikitake Y. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008;24:309–42.
10. Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:60315.
11. Brasch J, Harrison OJ, Honig B, Shapiro L. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol.* 2012;22:299–310.
12. Takai Y, Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci.* 2003;116:17–27.
13. Harris TJ, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:502–14.
14. Shimono Y, Rikitake Y, Mandai K, Mori M, Takai Y. Immunoglobulin superfamily receptors and adherens junctions. *Subcell Biochem.* 2012;60:137–70.
15. Shapiro L, Weis WI. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1, a003053.
16. Suzuki K, Hu D, Bustos T, Zlotogora J, Richieri-Costa A, Helms JA, et al. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat Genet.* 2000;25:427–30.
17. Reymond N, Fabre S, Lecocq E, Adelaïde J, Dubreuil P, Lopez M. Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J Biol Chem.* 2001;276:43205–15.
18. Jelani M, Chishti MS, Ahmad W. Mutation in PVRL4 gene encoding nectin-4 underlies Ectodermal-Dysplasia-Syndactyly Syndrome (EDSS1). *J Hum Genet.* 2011;56:352–7.
19. Fortugno P, Josselin E, Tsiakas K, Agolini E, Cestra G, Teson M, et al. Nectin-4 mutations causing ectodermal dysplasia with syndactyly perturb the rac1 pathway and the kinetics of adherens junction formation. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2146–53.
20. Svendsen T, Henningsen E, Hertz JM, Vestergaard Grejsen D, Bygum A. A retrospective study of clinical and mutational findings in 45 Danish families with ectodermal dysplasia. *Acta Derm Venereol.* 2014;94:531–3.
21. Raza SI, Dar RN, Shah AA, Ahmad W. A novel homozygous non-sense mutation in the PVRL4 gene and expansion of clinical spectrum of EDSS1. *Ann Hum Genet.* 2015;79:92–8.
22. Dardour L, Cosyns K, Devriendt K. A novel missense variant in the PVRL4 gene underlying ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome in a Turkish child. *Mol Syndromol.* 2017;9:22–4.
23. Ahmad F, Nasir A, Thiele H, Umair M, Borck G, Ahmad W. A novel homozygous missense variant in NECTIN4 (PVRL4) causing ectodermal dysplasia cutaneous syndactyly syndrome. *Ann Hum Genet.* 2018;82:232–8.
24. Florian R, Gruber R, Volc-Platzer B. A novel homozygous mutation in PVRL4 causes ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome 1. *Int J Dermatol.* 2018;57:223–6.
25. Rotunno R, Diociaiuti A, Dentici ML, Rinelli M, Callea M, Retrosi C, et al. Ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome with toe-only minimal syndactyly due to a novel mutation in NECTIN4: a case report and literature review. *Genes (Basel).* 2021;12:748.