

**Aus dem CharitéCentrum 17  
Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit  
Perinatalzentrum und Humangenetik  
Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik  
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Mundlos**

**Habilitationsschrift**

**Die Rolle von nicht-kodierenden Mutationen und strukturellen Varianten bei  
angeborenen Fehlbildungen der Extremitäten**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Humangenetik

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Malte Spielmann**

Eingereicht: April 2016

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Meitinger, München

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke, Essen

**Für Oda, Lasse und Sabine**

1	Einleitung .....	5
1.1	Vom Human Genome Project zu ENCODE .....	5
1.2	Die cis-regulatorische Architektur des menschlichen Genoms .....	6
1.3	Identifikation von cis-regulatorischen Elementen und CRISPR/Cas9 Genome Editing ..	8
1.4	Wie kann man nicht-kodierende Mutationen nachweisen? .....	10
2	Originalarbeiten.....	11
2.1	Homeotische Arm zu Bein Transformation sind mit genomischen Aberrationen am PITX1 Locus assoziiert .....	11
2.2	Mikroduplikationen des Sonic Hedgehog Extremitäten Enhancer Elements ZRS sind assoziiert mit Haas Type Polysyndactylie und Laurin-Sandrow Syndrom.....	19
2.3	Deletionen von Exons mit regulatorischer Aktivität am DYNC111 Locus assoziieren mit Spalt-Hand und Spalt-Fuß Erkrankungen: Array CGH Screening von 134 Familien.....	28
2.4	Deletionen von regulatorischen Grenzen assoziieren mit angeborenen Erkrankungen	38
2.5	Mikrodeletionen auf Chromosom 6p22.3 assoziieren mit der mesomelen Dysplasie vom Savarirayan Typ.....	55
2.6	Exome Sequenzierung und CRISPR/Cas Genome Editing identifizieren Mutationen in ZAK als Ursache für Extremitätenfehlbildungen in Mensch und Maus .....	64
3	Diskussion.....	74
3.1	Duplikationen und Deletionen von cis-regulatorischen Elementen bei menschlichen Erkrankungen .....	75
3.2	Die Rolle von TADs und Boundary-Elementen bei menschlichen Erkrankungen.....	77
3.3	CRISPR/Cas9 Genome Editing: Die Zukunft der funktionellen Genetik .....	78
4	Zusammenfassung.....	80
5	Danksagung.....	87
6	Erklärung.....	89

## Abkürzungen

1 KGP	1000 Genom Projekt
bp	Basenpaar
CNVs	„Copy number variation“ Deletionen und Duplikationen
dbSNP	Datenbank für Sequenzvarianten
DNA	„deoxyribonucleid acid“, Erbsubstanz
FPR	Falsch-Positiv-Rate
HGMD	„Human Gene Mutation Database“, Datenbank pathogener SNVs
Kb	Kilo Basen, $10^3$ bp
MAC	„membrane attack complex“, Membranangriffskomplex
Mb	Mega Basen, $10^6$ bp
NGS	„next-generation sequencing“, Hochdurchsatz-Sequenzierung
OMIM	„Online Mendelian Inheritance in Man“, Verzeichnis genetischer Erkrankungen
PCR	„polymerase chain reaction“, Verfahren zur DNA Amplifikation
SNV	„single nucleotide variant“, Einzelbasenaustausch
TADs	„Topological Associated Domains“
VUCS	“variants of unknown clinical significance“, Mutationen unbestimmter klinischer Signifikanz

# 1 Einleitung

Next Generation Sequencing Technologien revolutionieren derzeit die moderne Medizin. Vom Traum der personalisierten Medizin und Therapie über Tumor-Sequenzierung bis hin zum persönlichen Mikrobiom werden NGS basierte Technologien in fast allen Bereichen der modernen Medizin eingesetzt [Shendure 2011]. In der Humangenetik stehen die Etablierung einer molekularen Diagnose bei angeborenen Erkrankungen und die Identifizierung von neuen Krankheitsgenen immer noch im Mittelpunkt von Diagnostik und Forschung. Klassischerweise wird dabei der „Kandidaten-Gen“ Ansatz gewählt, wobei nach einem klinischen Verdacht, das entsprechende Kandidaten-Gen mittels Sanger-Sequenzierung untersucht wird. Dies ist kostengünstig und ohne aufwendige bioinformatische Unterstützung möglich. Der Erfolg dieser Methode ist jedoch im hohen Maße von der Erfahrung des klinischen Genetikers und von der genetischen Heterogenität einer Erkrankung abhängig. Durch die Einführung von Gen-Panel Sequenzierung, Whole Exome Sequenzierung (WES) und Whole Genome Sequenzierung (WGS) konnte die diagnostische Erfolgsrate zum Beispiel für geistige Behinderung auf über 50% gesteigert werden [Gilissen et al. 2014]. Es ist daher anzunehmen, dass sich diese Tests in der nahen Zukunft als diagnostischer Standard in der Humangenetik durchsetzen werden. Interessanterweise bleiben aktuell dennoch über 40% der Patienten in der Humangenetik ohne molekulare Diagnose [Gilissen et al. 2014]. Dies könnte zum Teil an der Tatsache liegen, dass derzeit ausschließlich die 1,5% des menschlichen Genoms berücksichtigt werden, welche die ca. 22000 Gene kodieren. Damit werden knapp >98% des nicht-kodierenden Genoms ignoriert. Das hängt im Wesentlichen mit der Tatsache zusammen, dass bei der WES die nicht-kodierenden Varianten nicht erfasst werden können. Ein weiteres Problem ist, dass der „regulatorische Code“ der nicht-kodierenden Sequenz derzeit noch unbekannt ist und daher die medizinische Interpretation und Bewertung von nicht-kodierenden Varianten extrem schwer ist. Genomweiten Analyseverfahren wie *microarray-based comparative genome hybridization* (Array-CGH) und Whole Genome Sequenzierung machen es nun möglich, auch Varianten im nicht-kodierenden Genom zu identifizieren. Die Interpretation dieser nicht-kodierenden Varianten stellt damit eine zentrale Herausforderung für die kommenden Jahre in der Humangenetik dar.

## 1.1 Vom Human Genome Project zu ENCODE

Bereits wenige Jahre nach der Veröffentlichung der Ergebnisse des Human Genome Projects wurde deutlich, dass es sogar bei gesunden Menschen große Unterschiede in der DNA-

Sequenz gibt und man fast kein „normales“ menschliches Genom finden kann [Feero et al. 2010; Venter et al. 2001]. So wurden weitere internationale Forschungsprojekte gestartet, um die Variabilität des menschlichen Genoms in seiner ganzen Komplexität zu untersuchen. Im Rahmen des „1000 Genomes Project“ wurden über 2000 Genome von gesunden Individuen sequenziert. Zur gleichen Zeit wurde das sog. ENCODE Projekt gestartet: „Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)“ ([www.encodeproject.org](http://www.encodeproject.org)) [Consortium 2004]. Das vom National Human Genome Research Institute (NHGRI) finanzierte Großprojekt hat das Ziel den Code der nicht-kodierenden DNA zu entschlüsseln [Consortium 2004]. Über die letzten 10 Jahre wurden daher eine große Anzahl von *in vitro* und *in vivo* Experimenten zur Erstellung von *cis*-regulatorischen Landkarten des Genoms durchgeführt. Insgesamt sind bis 2015 weit über 500 wissenschaftliche Veröffentlichungen als Teil von ENCODE erschienen. Zu den größten Überraschungen der ENCODE Ergebnisse zählt, dass in über 70% des menschlichen Genoms regulatorische Sequenzen nachgewiesen werden konnten [Consortium et al. 2012].

Die ENCODE Ergebnisse könnten damit einen direkten Einfluss auf die humangenetische Diagnostik haben, da nun zum ersten Mal systematische Informationen und Daten über den regulatorischen Teil des menschlichen Genoms vorliegen, die bei der Interpretation von nicht-kodierenden Mutationen nützlich sein können.

## **1.2 Die *cis*-regulatorische Architektur des menschlichen Genoms**

Die Regulation der Expression der ca. 22000 menschlichen Gene ist ein extrem komplexer und auf vielen Ebenen regulierter Prozess. Auf Sequenzebene spielt die nicht-kodierende DNA eine wichtige Rolle. Insbesondere Entwicklungsgene zeigen eine typische „regulatorische Architektur“ [Wittkopp and Kalay 2012]. Die nicht-kodierenden Sequenzabschnitte, die sich oft zwischen und neben den Genen befinden und daher auch als „Genwüsten“ (*gene deserts*) bezeichnet werden, beinhalten wichtige *cis*-regulatorische Elemente [Klopocki and Mundlos 2011] [Montavon et al. 2011]. Man unterscheidet zum einen die Regulation in *cis* durch Promoter, Enhancer-, Repressor- und Insulator-Elemente, und zum anderen in *trans* durch Transkriptionsfaktoren, regulatorische RNAs und vieler derzeit noch unbekannte Faktoren [Spielmann 2015]. Bekannte Beispiele für „Regulatorische Landschaften“ sind der *SHH*-Lokus und der *HOXD*-Lokus [Montavon and Duboule 2013]. Ein weiteres Beispiel ist *EPHA4* Lokus, der von einer großen Genwüste umgeben ist, in der sich unzählige regulatorische Elemente befinden, die hunderte von Kilobasen von ihrem Zielgen entfernt liegen können [Dathe et al. 2009; Lupianez et al. 2015; Montavon et al. 2011; Spielmann 2015].

Ein wichtiger Aspekt der physiologischen Regulation von Genen ist die 3D Architektur des Genoms im Zellkern. Man geht davon aus, dass *cis*-regulatorische Elemente durch die spezifische Faltung von Chromatin in physischen Kontakt mit ihren Zielgenen kommen [Palstra et al. 2003]. Dieses sogenannte „Looping“ der DNA wird durch gewebespezifische Transkriptionsfaktoren vermittelt und bewirkt so eine zeitlich und räumlich begrenzte Expression eines Gens. Man geht davon aus, dass CTCF und Cohesin eine zentrale Rolle bei der Bildung dieser Loops spielen [de Wit and de Laat 2012; Dekker et al. 2002; Lieberman-Aiden et al. 2009]. Durch die Entwicklung der PCR-basierten Methode Chromosome Conformation Capture (3C) und die NGS-basierten Weiterentwicklungen dieser Methode wie 4C, 5C, ChiaPet und Hi-C ist es möglich geworden, die 3D Architektur des Genoms im Zellkern zu untersuchen und die physische Nähe zwischen *cis*-regulatorische Elementen und ihren Zielgenen nachzuweisen [Dixon et al. 2012; Lieberman-Aiden et al. 2009; Lupianez et al. 2015]. Die Hi-C Methode ist eine Kombination von 3C mit einer Aufreinigung der Ligationsprodukte und anschließender Hochdurchsatz Sequenzierung [Lieberman-Aiden et al. 2009].

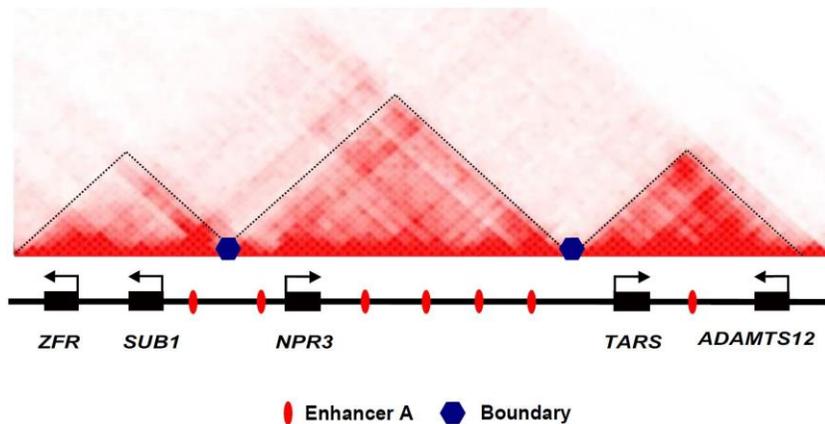


Abbildung 1: Das *NPR3* Gen liegt in einer eigenen "Topological Associated Domain" (TAD), welche durch regulatorische Insulator-Elemente oder Boundaries von benachbarten Domänen getrennt ist.

Im Gegensatz zur 4C Methode, welche den Kontakt zwischen einem Locus (viewpoint) und dem restlichen Genom nachweisen kann (einer gegen alle), erlaubt Hi-C einen umfassenden Nachweis

von allen DNA-DNA Interaktionen im Genom gleichzeitig (alle gegen alle)

(Abb. 1) [de Wit and de Laat 2012; Lupianez et al. 2016; Nagano et al. 2013]. Mit Hilfe dieser Hi-C-Technik wurden 2012 die „Topological Associated Domains“ (TADs) entdeckt [Dixon et al. 2012; Nora et al. 2012; Sexton et al. 2012]. TADs sind im Durchschnitt eine Megabase große Domänen im Genom, in denen vermehrt DNA-DNA Interaktionen nachgewiesen werden können und die von benachbarten TADs durch sog. Boundary Elemente getrennt sind. Abbildung 1 zeigt beispielhaft die TAD Architektur des *NPR3*-Lokus (Abb. 1). TADs bilden das regulatorische Gerüst des Genoms und sind konserviert zwischen unterschiedlichen Zelltypen und sogar verschiedenen Spezies [Dixon et al. 2012; Rao et al. 2014a; Sexton et al. 2012; Shen et al.

2012]. Die Bedeutung von Boundary Elementen für TADs ist derzeit zentraler Gegenstand von wissenschaftlichen Kontroversen. Boundaries sind sehr unterschiedlich und allein ihre Größe kann zwischen wenigen Kilobasen und hunderten von Kilobasen variieren. Oft finden sich Housekeeping Gene und short interspersed element (SINE) Retrotransposons in Boundary Regionen [Dixon et al. 2012; Hou et al. 2012; Raab et al. 2012; Sexton et al. 2012]. Eine zentrale Rolle scheinen die Architekturproteine CTCF (CCCTC-binding factor) und cohesin zu spielen [Van Bortle et al. 2014]. CTCF Bindungsstellen finden sich in den meisten Boundary Regionen und man geht davon aus, dass es eine wichtige Rolle beim Looping der DNA spielt. Genome Editing Experimente konnten zeigen, dass die Orientierung von CTCF Motiven die Loop Etablierung und die Entstehung von Boundary Regionen beeinflusst [Nora et al. 2012] [Guo et al. 2015], da die Orientierung von CTCF Motiven in über 90% der Boundaries konvergent ist [Rao et al. 2014a; Vietri Rudan et al. 2015].

Diese Daten zeigen, dass TADs und Boundaries eine wichtige Rolle in der Genregulation spielen. Strukturelle Aberrationen wie Deletionen, Duplikationen und Inversionen können die *cis*-regulatorische Architektur des menschlichen Genoms verändern, indem sie die Positionen von TADs und Boundaries verändern und so zu Fehlregulation von Genen führen. Meine eigenen Arbeiten und weitere aktuelle Studien zeigen, dass diese Positions-Effekte der nicht-kodierenden DNA ein wichtiger Mutations-Mechanismus bei angeborenen Erkrankungen der Extremitäten sind [Ibn-Salem et al. 2014; Lupianez et al. 2015; Spielmann and Mundlos 2013]. In der humangenetischen Routinediagnostik werden regulatorische Varianten derzeit noch nicht berücksichtigt. Durch die Einführung von NGS Technologien in der humangenetischen Diagnostik wird es in Zukunft möglich sein, auch Varianten außerhalb der kodierenden DNA zu untersuchen.

### **1.3 Identifikation von *cis*-regulatorischen Elementen und CRISPR/Cas9 Genome Editing**

Eines der wesentlichen Ziele des ENCODE Projektes war es, eine große Anzahl von menschlichen Geweben mit Hilfe von epigenetischen Markierungen, Chromosome Confirmation Capture Techniken und RNA-Sequenzierung zu untersuchen. Durch die Schaffung von *cis*-regulatorischen Landkarten des Genoms, hoffte man ein besseres Verständnis der nicht-kodierenden DNA zu erreichen.

Epigenetische Markierungen, sog. Histonmodifikationen, können helfen nicht-kodierende Elemente zu identifizieren [Spielmann 2015]. Die aktuell anerkanntesten Histonmodifikationen

für aktive Enhancer sind H3K4me1, H3K27ac und p300. Die genomweite Verteilung dieser Histonmodifikationen ist in verschiedenen Datenbanken hinterlegt. Durch die Kombination von verschiedenen Histonmodifikationen in verschiedenen Zelltypen und Informationen zur evolutionären Konservierung zwischen unterschiedlichen Spezies kann man versuchen *cis*-regulatorische Sequenzen zu identifizieren.

Der endgültige Nachweis, ob es sich bei einer DNA Sequenzen um einen Enhancer handelt kann derzeit nur durch einen *in vivo* Reporter-Assay erfolgen. Dies wird im Zebrafisch oder in der transgenen Maus durchgeführt. Man kloniert dabei die DNA Sequenzen in ein Reporterkonstrukt, das in der Regel aus einem Minimalpromotor und LacZ oder GFP besteht. Dieses Konstrukt wird dann mittels Injektion im Zebrafisch oder in der transgenen Maus getestet [Spielmann 2015; Visel et al. 2007]. Ein Enhancer führt dann zu einer gewebespezifischen Expression des Reportergens. So zeigt zum Beispiel ein Extremitäten-Enhancer eine spezifische Färbung in den Extremitäten des Mausembryos [Spielmann and Mundlos 2013; Spielmann 2015].

Die Einführung der CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologie hat das gesamte Feld der *in vitro* und *in vivo* Mutagenese revolutioniert und birgt enorme Chancen auf für die Identifikation von *cis*-regulatorischen Sequenzen [Wang et al. 2013]. Bisher war es extrem arbeitsintensiv und zeitaufwendig, menschliche Mutationen und strukturelle Varianten *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Durch die Kombinationen von clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) und Donorsequenzen ist es nun in wenigen Wochen möglich, gezielt Gene in der Maus auszuschalten (knock out), bestimmte menschliche Mutationen nachzustellen (knock-in) oder Inversionen, Duplikationen und Deletionen herzustellen [Kraft et al. 2015; Seruggia and Montoliu 2014].

Das CRISPR/Cas9 System wurde ursprünglich als Teil der adaptiven Immunabwehr von Prokaryonten gegen virale Infektionen identifiziert und basiert auf der Hybridisierung einer Führungs-RNA (Guide RNA) auf einer korrespondierende Ziel-RNA (Target RNA). Die Führungs-RNA besitzt eine Cas9 Interaktions-Domäne, welche die Rekrutierung der Cas9 Endonulcease zu Ziel Region bewirkt [Mali et al. 2013]. Die Cas9 Endonulcease bewirkt einen doppelsträngigen Bruch der DNA (double-stranded break) in der Region der Zielsequenz, der durch endogene Reparaturmechanismus non-homologous end joining (NHEJ) oder homology directed repair (HDR) wieder repariert wird [Sternberg and Doudna 2015]. NHEJ ist ein sehr fehlerhafter Reparaturmechanismus und es kommt an der Bruchstelle zu zahlreichen Mutationen, Deletionen und Insertionen. Man kann daher mit Hilfe einer einzelnen Guide RNA

eine Mutationen oder Deletionen verursachen, die den Funktionsverlust eines Gens bewirkt (knock out). In Kombination mit einer Donorsequenz ist es aber auch möglich, eine spezifische Sequenz in die DNA einzufügen (knock in). Darüber hinaus ist es durch die Kombination von zwei Guide RNAs möglich, an zwei Stellen im Genom gleichzeitig zu schneiden und so Deletionen, Inversion und Duplikationen zu erzeugen [Kraft et al. 2015].

Das CRISPR/Cas9 System bietet daher ein enormes Potential für die Bewertung von Varianten von unklarer klinischer Bedeutung in der Humangenetik und könnte ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung von kodierenden und nicht-kodierenden Mutationen werden.

#### **1.4 Wie kann man nicht-kodierende Mutationen nachweisen?**

Die gängigste Methode zum Nachweis nicht-kodierender Mutationen beschränkt sich derzeit auf den Nachweis von Kopienanzahlveränderungen mittels Array-CGH. Detektiert werden sogenannten „Copy Number Variations“ (CNV), also submikroskopischen Verlust (Deletionen) oder submikroskopischen Gewinn (Duplikationen) von genomischem Material in hochauflösendem Maßstab [Spielmann 2015]. Mit der Array-CGH lassen sich aktuelle Deletionen und Duplikationen von bis zu 10kb nachweisen (z.B. 1M Array= 1.00.000 Oligonukleotiden).

Um kleinere strukturelle Varianten und komplexe strukturelle Aberrationen wie Inversionen nachzuweisen, ist eine Genomsequenzierung notwendig [Gilissen et al. 2014]. Diese erlaubt gleichzeitig den Nachweis von Punktmutationen in der nichtkodierenden Sequenz. Die Interpretation von Punktmutationen in der nicht-kodierenden Sequenz ist derzeit noch extrem schwierig. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass in den kommenden Jahren noch detailliertere *cis*-regulatorische Karten des Genoms mit besserer Auflösung erstellt werden. Diese können dann benutzt werden, um nach *de novo* Mutationen und strukturellen Varianten in *cis*-regulatorischen Elementen zu suchen.

## 2 Originalarbeiten

### 2.1 Homeotische Arm zu Bein Transformation sind mit genomischen Aberrationen am *PITX1* Locus assoziiert

**Spielmann M**, Brancati F, Krawitz PM, Robinson PN, Ibrahim DM, Franke M, Hecht J, Lohan S, Dathe K, Nardone AM, Ferrari P, Landi A, Wittler L, Timmermann B, Chan D, Mennen U, Klopocki E, Mundlos S.

Homeotic Arm-to-Leg Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the *PITX1* Locus.

Am J Hum Genet. 2012 Oct 5;91(4):629-35. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.08.014.

Studien zur homeotischen Transformation in *Drosophila*-Mutanten haben die Entwicklungsbiologie revolutioniert. Die Rolle solcher Mutationen bei Menschen ist derzeit noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit haben wir drei unabhängige Familien mit Liebenberg Syndrom untersucht. Das Liebenberg Syndrom ist eine angeborene Extremitätenfehlbildung, die ausschließlich die Arme betrifft. Radiologische Untersuchungen der Patienten zeigten, dass die Arme der Patienten morphologische Merkmale von Beinen angenommen haben. Wir konnten zeigen, dass es sich dabei um eine homeotische Transformation handelt.

Mittels Kopplungsanalyse und Array CGH konnten wir Deletionen in der regulatorischen Landschaft von *PITX1* in allen betroffenen Familien identifizieren. In den Deletionen befindet sich das Gen *H2AFY*, welches selbst keine Rolle in der Entwicklung der Arme spielt. Distal der Deletion befindet sich ein Extremitäten Enhancer (hs1473), der normalerweise nicht zu *PITX1* gehört. Wir konnten zeigen, dass die Deletion ein Insulator-Element entfernt. Durch die Deletion wird es dem Extremitäten Enhancer (hs1473) möglich, die *PITX1* Expression zu kontrollieren. *PITX1* ist ein wichtiges Gen für die Entwicklung der hinteren Extremitäten und wird in der embryonalen Entwicklung ausschließlich in den Beinen exprimiert. Bei den Patienten mit Liebenberg Syndrom kommt es durch Enhancer-Adoption zu einer pathologischen Expression von *PITX1* in den Armen. Durch diese Fehlexpression von *PITX1* nehmen die Arme der Patienten charakteristische morphologische Merkmale von Beinen an. Wir konnten im Mausmodell zeigen, dass es sich beim Liebenberg Syndrom um eine homeotischen Transformation der Arme zu Beinen handelt.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.014>













## 2.2 Mikroduplikationen des Sonic Hedgehog Extremitäten Enhancer Elements ZRS sind assoziiert mit Haas Type Polysyndactylie und Laurin-Sandrow Syndrom

Lohan S\*, **Spielmann M\***, Doelken SC, Flöttmann R, Muhammad F, Baig SM, Wajid M, Hülsemann W, Habenicht R, Kjaer KW, Patil SJ, Girisha KM, Abarca-Barriga HH, Mundlos S, Klopocki E.

Microduplications encompassing the Sonic Hedgehog Limb Enhancer ZRS are Associated with Haas Type Polysyndactyly and Laurin-Sandrow Syndrome.

Clin Genet. 2014 Jan 23. doi: 10.1111/cge.12352.

\*contributed equally

Eines der bekanntesten Beispiele für Genregulation in *cis* ist der *SHH* Locus und der Extremitäten-Enhancer „ZRS“ (Zone of regulatory Sequence). Dieser befindet sich über 1 Mb distal von *SHH* im Intron des *LMBR1* Gens. *SHH* ist ein Signalmolekül aus der Gruppe der Hedgehog Proteine. Duplikationen und Punktmutationen des ZRS führen zur pathologischen Fehlexpression von SHH und verursachen Syndaktylie und Polydaktylie. Insgesamt sind bereits über 30 Duplikationen des ZRS bekannt.

In dieser Arbeit wurde eine Kohorte an Patienten mit Polydaktylien und Syndaktylien mittels Array CGH und qPCR auf Duplikationen des ZRS untersucht. Wir konnten fünf nicht verwandte Familien mit überlappenden Duplikationen identifizieren und die molekulare Ursache des Laurin-Sandrow Syndroms aufklären. Bei der Größe der Duplikationen zeigte sich eine Genotyp-Phänotyp Korrelation. Kleine Duplikationen unter 75 kb führen zum schwersten Phänotyp dem sog. Laurin-Sandrow Syndrom. Beim Laurin-Sandrow Syndrom kommt es zu Spiegelbild-Polydaktylien der Füße und an den Händen zu kompletten Syndaktylien. Duplikationen mit einer Größe von über 100 kb führen zu Synpolydaktylien der Hände und triphalangialen Daumen.

<http://dx.doi.org/10.1111/cge.12352>















### 2.3 Deletionen von Exons mit regulatorischer Aktivität am *DYNC111* Locus assoziieren mit Spalt-Hand und Spalt-Fuß Erkrankungen: Array CGH Screening von 134 Familien

Tayebi N, Jamsheer A, Flöttmann R, Sowinska-Seidler A, Doelken SC, Oehl-Jaschkowitz B, Hülsemann W, Habenicht R, Klopocki E, Mundlos S, **Spielmann M.**

Deletions of exons with regulatory activity at the *DYNC111* locus are associated with split-hand/split-foot malformation: array CGH screening of 134 unrelated families.

Orphanet J Rare Dis. 2014 Jul 29;9:108. doi: 10.1186/s13023-014-0108-6.

In den vergangenen Jahren wurden immer mehr nicht-kodierenden Mutationen als Ursache für angeborene Fehlbildungen identifiziert. Im Jahr 2012 wurden nun auch Exons von kodierenden Genen identifiziert, die regulatorische Bedeutung haben. Man nennt diese „exonische Enhancer“ bzw. „eExons“.

In dieser Studie wurden 134 nicht verwandte Familien mit Spalt-Händen und Spalt-Füßen mittels hochauflösender Array CGH auf Deletionen und Duplikationen von eExons untersucht. In drei Familien mit autosomal dominanten nicht-syndromalen Spalt-Händen und Spalt-Füßen konnten Deletionen der eExons 15 und 17 des *DYNC111* Gens nachgewiesen werden. In einer weiteren Familie, die zusätzlich noch Schwerhörigkeit zeigte, wurde eine größere Deletion von 510 kb nachgewiesen, die neben den eExons 15 und 17 des *DYNC111* Gens auch noch den ZNS Enhancer *hs1642* beinhaltete. Die eExons 15 und 17 des *DYNC111* sind bekannte Enhancer Elements der Gene *DLX5* und *DLX6*. Die Deletion von *DLX5/6* in der Maus führt zu Spalt-Händen und Spalt-Füßen. Die Deletion der Enhancer führt daher mit großer Wahrscheinlichkeit zu einem regulatorischen Funktionsverlust von *DLX5/6* in der Entwicklung der Extremitäten.

In unserer Kohorte von 134 Familien mit Spalt-Händen und Spalt-Füßen zeigte sich, dass die Deletion der eExons des *DYNC111* Gens für 3% der Fälle verantwortlich war, während die Duplikation 17p13.3 in 13% der Familien nachgewiesen wurde, die Duplikation 10q24 in 12%, und Mutationen *TP63* in 4%. Über 68% der Fälle sind derzeit noch molekular nicht aufgeklärt.

<http://dx.doi.org/10.1186/s13023-014-0108-6>

















## 2.4 Deletionen von regulatorischen Boundaries assoziieren mit angeborenen Erkrankungen

Jonas Ibn-Salem, Sebastian Köhler, Michael I Love, Ho-Ryun Chung, Ni Huang, Matthew E Hurles, Melissa Haendel, Nicole L Washington, Damian Smedley, Christopher J Mungall, Suzanna E Lewis, Claus-Eric Ott, Sebastian Bauer, Paul N Schofield, Stefan Mundlos, **Malte Spielmann\*** and Peter N Robinson\*

Deletions of chromosomal regulatory boundaries are associated with congenital disease

Genome Biology 2014, 15:423 doi:10.1186/s13059-014-0423-

\*Corresponding authors

Strukturelle Aberrationen wie Deletionen, Duplikationen und Inversionen können die *cis*-regulatorische Architektur des menschlichen Genoms verändern, indem sie die Positionen von „Topological Associated Domains“ (TADs) und Boundaries verändern. Durch Deletionen von TAD Boundaries kann es zu Fehlregulation von Genen kommen. Man bezeichnet diesen Mechanismus als „Enhancer-Adoption“.

In dieser Studie haben wir die Human Phenotype Ontology (HPO) Datenbank benutzt, um die Phenotypen von 922 Deletionen aus der DECIPHER Datenbank mit monogenetischen Erkrankungen von benachbarten Genen, die außerhalb der Deletion liegen, zu verbinden. So haben wir versucht Kombinationen von gewebespezifischen Enhancern und Genen in unmittelbarer Nähe der Bruchpunkte der Deletionen zu identifizieren, die zum Phänotypen des Patienten im Sinne einer „Enhancer-Adoption“ passten Dies wurde computergestützt verglichen mit dem Pathomechanismus der Haploinsuffizienz, bzw. dem Gen-Dosis-Effekt der Gene in den Deletionen. Unsere Analysen zeigten, dass ca. 11,8 % der Deletionen am besten durch „Enhancer-Adoption“, bzw. eine Kombination aus beidem zu erklären sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass für die klinische Bewertung von strukturellen Aberrationen in der Humangenetik der *cis*-regulatorische genomische Kontext der Varianten berücksichtigt werden muss.

<http://dx.doi.org/10.1186/s13059-014-0423-1>































## 2.5 Mikrodeletionen auf Chromosom 6p22.3 assoziieren mit der mesomelen Dysplasie vom Savarirayan Typ.

Flöttmann R, Wagner J, Kobus K, Curry CJ, Savarirayan R, Nishimura G, Yasui N, Spranger J, Van Esch H, Lyons MJ, DuPont BR, Dwivedi A, Klopocki E, Horn D, Mundlos S, **Spielmann M**. Microdeletions on 6p22.3 are associated with mesomelic dysplasia Savarirayan type.

J Med Genet. 2015 Jul;52(7):476-83. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103108.

Mesomale Dysplasien sind eine Gruppe von Skelettdysplasien, die sich durch Verkürzungen der mittleren Segmente der Extremitäten auszeichnen. Insgesamt sind derzeit 11 verschiedene mesomale Dysplasien beschrieben. Die mesomale Dysplasie vom Savarirayan Typ zeichnet sich durch Verkürzung der unteren Extremität aus. Die molekulare Ursache ist derzeit unklar. Im Rahmen unserer Studie wurden drei nicht verwandte Familien mit mesomaler Dysplasie vom Savarirayan Typ mittels Array CGH untersucht. In allen drei Familien konnten überlappende *de novo* Deletionen auf Chromosom 6p22.3 identifiziert werden. Die Deletionen beinhalteten vier bekannte Gene *MBOAT1*, *E2F3*, *CDKAL1*, und *SOX4*. Alle drei Patienten zeigten eine mesomale Verkürzung von Tibia und Fibula. Zusätzlich wurde bei einem weiteren Patient mit einer geistigen Entwicklungsverzögerung eine etwas größere *de novo* Deletion nachgewiesen, die zusätzlich das Gen *ID4* beinhaltete. Interessanterweise zeigte dieser Patient keine skelettalen Auffälligkeiten. Da keines der deletierten Gene im Mausmodell Auffälligkeiten der Extremitäten zeigt, müssen andere Mutationsmechanismen in Betracht gezogen werden als ausschließlich „Loss of Function“. Eine Analyse der regulatorischen Umgebung der Deletion zeigte, dass durch die Deletion zwei regulatorische Grenzen (Boundaries) entfernt werden und mehrere bekannte Extremitäten-Enhancer in der Lage sind, ektop auf die Expression von *ID4* einzuwirken. Die Deletion führt also mit großer Wahrscheinlichkeit zu „Enhancer adoption“ und somit zur Fehlregulation von *ID4* und verursacht dadurch die mesomale Dysplasie.

<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103108>















## 2.6 Exome Sequenzierung und CRISPR/Cas9 Genome Editing identifizieren Mutationen in *ZAK* als Ursache für Extremitätenfehlbildungen in Mensch und Maus

**Spielmann M\***, Kakar N\*, Tayebi N, Leettola C, Nürnberg C, Sowada N, Lupiáñez DG, Harabula I, Flöttmann R, Horn D, Chan WL, Wittler L, Yilmaz R, Altmüller J, Thiele H, van Bokhoven H, Schwartz CE, Nürnberg P, Bowie U, Ahmad J, Kubisch C, Mundlos S, Borck G.

Genome Research 2016 Feb 11;26(2):183-91. Epub 2016 Jan 11.

\*contributed equally

Die Einführung der CRISPR/Cas9 Technologie bietet die Möglichkeit, in sehr kurzer Zeit transgene Mäuse herzustellen, um humane Erkrankungen in der Maus zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir eine autosomal rezessive Erkrankung bei zwei nicht verwandten Familien, die sich durch die Kombination von Spaltfüßen, Nagelaufälligkeiten der Hände und Schwerhörigkeit auszeichnet. Wir konnten zunächst zeigen, dass beide Familien homozygote Mutationen in der SAM Domäne des *ZAK* Gens tragen. *ZAK* ist ein Gen aus der Familie der MAP-Kinasen und seine Funktion ist derzeit unbekannt. Zunächst wiesen wir mittels in situ Hybridisierung nach, dass *ZAK* in der Maus in den embryonalen Extremitäten exprimiert ist. Weiterhin konnten wir mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Genome Editing zeigen, dass die Inaktivierung beider Isoformen von *Zak* früh embryonal letal ist. Die Embryonen entwickelten ein schweres Herzödem und verstarben an Embryonaltag 9.5. Im Gegensatz dazu führen spezifische Mutationen, bzw. Die Deletion der SAM Domäne von *Zak* in der Maus zu komplexen Fehlbildungen der Extremitäten und sind mit einer verminderten Expression von Trp63 assoziiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass *ZAK* eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Extremitäten bei Mensch und Maus besitzt. Weiterhin zeigen wir, dass es mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie möglich ist, in weniger als 10 Wochen transgene Mäuse herzustellen, um die Pathogenität von mehreren menschlichen Mutationen nachzuweisen.

<http://dx.doi.org/10.1101/gr.199430.115>

















### 3 Diskussion

Durch die Einführung von Gen-Panel Sequenzierung, Whole Exome Sequenzierung (WES) und Whole Genome Sequenzierung (WGS) konnte die diagnostische Erfolgsrate zum Beispiel für geistige Behinderung auf über 50% gesteigert werden [Gilissen et al. 2014]. Es ist daher anzunehmen, dass sich diese Tests in naher Zukunft als diagnostischer Standard in der Humangenetik durchsetzen werden. Trotz dieser enormen Fortschritte bleiben aktuell noch über 45% der Patienten in der Humangenetik ohne molekulare Diagnose [Gilissen et al. 2014]. Dies könnte unter anderem an der Tatsache liegen, dass bisher Mutationen und strukturelle Veränderungen im nicht-kodierenden Teil des Genoms außer Acht gelassen werden [Spielmann 2015]. Traditionell werden Deletionen und Duplikationen auf Haploinsuffizienz, bzw. den Gen-Dosis-Effekt der Gene in den Aberrationen untersucht und mit öffentlichen Datenbanken abgeglichen. Dieser Ansatz führt jedoch nicht immer zum Erfolg und in einigen Fällen ist es notwendig, Varianten in ihrem gnomischen Kontext zu untersuchen. Durch die Einführung von WGS zu Detektion von kleineren gnomischen Varianten und Inversionen wird dieses Problem in Zukunft häufiger werden.

In den letzten Jahren wurden entscheidende Fortschritte in der Analyse und Annotierung der nicht-kodierenden DNA gemacht. ENCODE und andere große Forschungskonsortien haben mit Hilfe von Hochdurchsatz-Techniken wie ChIP-seq und Hi-C die 3D Architektur des Genoms im Zellkern erforscht und *cis*-regulatorische Karten des gesamten menschlichen Genoms erstellt. Diese Daten zeigen, dass das Genom in regulatorische Domänen, sog. TADs unterteilt ist, die durch Boundary-Elemente voneinander getrennt sind und dass diese eine zentrale Rolle in der Genregulation spielen [Dixon et al. 2012; Rao et al. 2014b]. Strukturelle Aberrationen wie Deletionen, Duplikationen und Inversionen können die *cis*-regulatorische Architektur des menschlichen Genoms verändern, indem sie die Positionen von TADs und Boundaries verändern und so zu Fehlregulation von Genen führen (Abb. 2) [Lupianez et al. 2016; Spielmann 2015]. Meine eigenen Arbeiten und weitere aktuelle Studien zeigen, dass diese Positionseffekte der nicht-kodierenden DNA ein wichtiger Mutations-Mechanismus bei angeborenen Erkrankungen der Extremitäten sind [Ibn-Salem et al. 2014; Lupianez et al. 2015; Spielmann and Mundlos 2013].

### 3.1 Duplikationen und Deletionen von *cis*-regulatorischen Elementen bei menschlichen Erkrankungen

Strukturelle Varianten der nicht-kodierenden DNA können die TAD Architektur eines Lokus verändern (Abb. 2). Deletionen oder Mutationen von Enhancer Elementen können zu einem gewebsspezifischen Funktionsverlust eines Gens führen: man spricht von regulatorischen Loss of Function Mutationen (Abb. 2B). Bekannte Beispiele sind Punktmutationen im ZRS, dem Extremitäten Enhancer-Elements des *SHH* Gens bei Polydaktylie [Wieczorek et al. 2010] und Mutationen in einem pankreas-spezifischen Enhancer Elements als Ursache von autosomal rezessiver Pankreasaplasie [Weedon et al. 2014].

Wir konnten im Rahmen einer Array CGH Untersuchung von 134 Familien mit Ektrodaktylie bzw. Spalthänden und Spaltfüßen mehrere Familien mit Deletion von exonischen Enhancer (eExons) Elementen im *DYNC111* Gen identifizieren [Tayebi et al. 2014]. Die eExons 15 und 17 des *DYNC111* sind bekannte Enhancer Elements der Gene *DLX5* und *DLX6*. Die Deletion von *DLX5/6* in der Maus führt zu Spalt-Händen und Spalt-Füßen. Die Deletion dieser Enhancer führt daher mit großer Wahrscheinlichkeit zu einem regulatorischen Funktionsverlust von *DLX5/6* in der Entwicklung der Extremitäten. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass insgesamt ca. 3% aller Ektrodaktylie Fälle durch Deletionen am *DYNC111* Locus verursacht sind [Tayebi et al. 2014]. Regulatorische *Loss-of-Function* Deletionen sind auch am *SOX9* Locus bei Patienten mit campomeler Dysplasie und am *PAX6* Locus bei Patienten mit Aniridie beschrieben [Spielmann and Klopocki 2013]

Die medizinische Interpretation von Duplikationen ist immer noch komplex und man geht in der Regel davon aus, dass kodierende Duplikationen zu einer Verdopplung der Gen-Dosis führen und dadurch einen Phänotyp verursachen. Wie sieht es aber mit Duplikation im nicht-kodierenden Bereich des Genoms aus?

Eines der bekanntesten Beispiele für Genregulation in *cis* ist der der *SHH* Locus und der Extremitäten-Enhancer „ZRS“ (Zone of Regulatory Sequence) [Lettice et al. 2011; Lettice et al. 2003]. Dieser befindet sich über 1 Mb distal von *SHH* im Intron des *LMBR1* Gens. *SHH* ist ein Signalmolekül aus der Gruppe der Hedgehog Proteine. Duplikationen und Punktmutationen des ZRS führen zur pathologischen Fehlexpression von SHH und verursachen Syndaktylie und Polydaktylie. Insgesamt sind bereits über 30 Duplikationen des ZRS bekannt. In dieser Arbeit wurde eine Kohorte an Patienten mit Polydaktylien und Syndaktylien mittels Array CGH und

qPCR auf Duplikationen des ZRS untersucht. Wir konnten fünf nicht verwandte Familien mit überlappenden Duplikationen identifizieren und die molekulare Ursache des Laurin-Sandrow Syndroms aufklären. Bei der Größe der Duplikationen zeigte sich eine Genotyp-Phänotyp Korrelation. Kleine Duplikationen unter 75 kb führen zum schwersten Phänotyp dem sog. Laurin-Sandrow Syndrom. Beim Laurin-Sandrow Syndrom kommt es zu Spiegelbild-Polydaktylien der Füße und an den Händen zu kompletten Syndaktylien. Duplikationen mit einer Größe von über 100 kb führen zu Synpolydaktylien der Hände und triphalangialen Daumen [Lohan et al. 2014; Spielmann 2015]. Obwohl der genaue Mechanismus noch nicht endgültig aufgeklärt ist, geht man davon aus, dass Duplikationen von *cis*-regulatorische Elementen zu einer gewebsspezifischen Fehlexpression eines Gens führen: man spricht von regulatorischen Gain of Function Mutationen (Abb. 2C) [Dathe et al. 2009; Lohan et al. 2014].

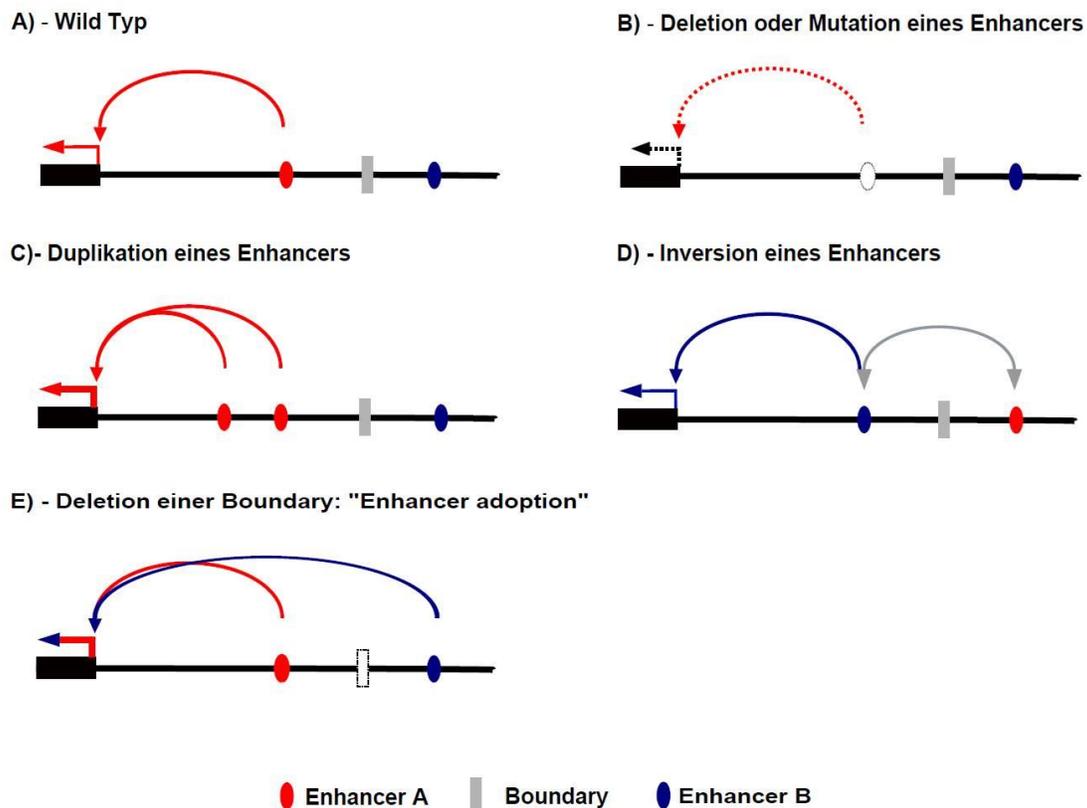


Abbildung 2: Nicht-kodierende Mutationen und strukturelle Aberrationen haben Einfluss auf die Expression benachbarter Gene.

### 3.2 Die Rolle von TADs und Boundary-Elementen bei menschlichen Erkrankungen

Deletionen von TAD Boundary Elementen oder Inversionen können die Architektur eines Lokus verändern und so zu „Enhancer Adoption“ oder „Enhancer-Hijacking“ führen (Abb. 2D und E) [Lettice et al. 2011; Northcott et al. 2014; Spielmann 2015]. Unter Enhancer Adoption versteht man, dass Enhancer aus benachbarten TADs durch die Deletion oder Inversion einer Boundary in die Position gebracht werden fremde Gene fehlzuregulieren und dadurch Erkrankungen verursachen [Lupianez et al. 2016]. Dieser Mutationsmechanismus spielt auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren [Northcott et al. 2014]. In der humangenetischen Routinediagnostik werden regulatorischen Varianten derzeit noch nicht berücksichtigt. Durch die Einführung von NGS Technologien in der humangenetischen Diagnostik wird es in Zukunft möglich sein, auch Varianten außerhalb der kodierenden DNA zu untersuchen.

Eines der ersten Beispiele für Deletionen von Boundary Elementen und Enhancer-Adoption ist das autosomal dominante Liebenberg Syndrom [Spielmann et al. 2012]. Das Liebenberg Syndrom zeichnet sich durch Fehlbildungen der oberen Extremität aus, bei der die Arme der Patienten radiologische und morphologische Eigenschaften von Beinen annehmen. Wir konnten zeigen, dass mehrere Deletionen ca. 300 kb telomer von *PITX1* (*Paired-like Homeodomain 1*) das *house keeping*-Gen *H2AFY* deletieren und die TAD-Boundary entfernen [Spielmann et al. 2012]. *PITX1* ist von zentraler Bedeutung für die Entstehung der hinteren Extremität und in der embryonalen Entwicklung ausschließlich in den Beinen exprimiert. *H2AFY* selbst spielt keine Rolle in der Skelettentwicklung. Bei den Patienten mit Liebenberg Syndrome kommt es durch Enhancer-Adoption zwischen dem Extremitäten-Enhancer (hs1473) und *PITX1* zu einer pathologischen Expression von *PITX1* in den Armen. Durch diese Fehlexpression von *PITX1* nehmen die Arme der Patienten charakteristische morphologische Merkmale von Beinen an. Wir konnten im Mausmodell zeigen, dass es sich beim Liebenberg Syndrom um eine homeotische Transformation der Arme zu Beinen handelt [Spielmann et al. 2012; Spielmann 2015].

Ein weiteres Beispiel für Enhancer-Adoption ist die mesomale Dysplasie vom Savarirayan Typ, die sich durch Verkürzung der unteren Extremität auszeichnet. Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit *de novo* Deletionen auf Chromosom 6p22.3 als molekulare Ursache dieser mesomalen Dysplasie identifizieren und zeigen, dass die Deletionen mit großer Wahrscheinlichkeit zu Enhancer-Adoption und somit zur Fehlregulation von *ID4* führen [Flottmann et al. 2015].

In einer weiteren Studie im Rahmen dieser Arbeit haben wir bioinformatisch untersucht, wie häufig das Phänomen von Enhancer-Adoption in größeren Kohorten ist. Mit Hilfe der Human Phenotype Ontology (HPO) Datenbank haben wir versucht die Phänotypen von 922 Deletionen aus der DECIPHER Datenbank mit monogenetischen Erkrankungen von benachbarten Genen, die außerhalb der Deletion liegen, zu verbinden. So konnten wir Kombinationen von gewebespezifischen Enhancern und Genen in unmittelbarer Nähe der Bruchpunkte der Deletionen identifizieren, die zum Phänotypen des Patienten passten im Sinne einer Enhancer-Adoption. Dies haben wir computergestützt verglichen mit dem Pathomechanismus der Haploinsuffizienz, bzw. dem Gen-Dosis-Effekt der Gene innerhalb der Deletionen. Unsere Analysen zeigten, dass ca. 11,8 % der Deletionen am besten durch Enhancer-Adoption“, bzw. eine Kombination aus beidem zu erklären sind [Ibn-Salem et al. 2014]. Ein bekanntes Beispiel sind zum Beispiel Deletionen einer TAD-Boundary am *FOXP1* Locus als Ursache des Rett Syndroms [Ariani et al. 2008; Kortum et al. 2011].

In Abbildung 2 ist dargestellt, wie auch Translokationen und Inversionen zu Enhancer-Adoption und Fehlexpression führen können (Abb.2 D und E).

### **3.3 CRISPR/Cas9 Genome Editing: Die Zukunft der funktionellen Genetik**

Die Einführung der CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologie birgt enorme Chancen für die funktionelle Analyse und Bewertung und von kodierenden und nicht-kodierenden Mutationen [Charpentier and Doudna 2013; Sternberg and Doudna 2015; Wang et al. 2013]. Bisher war es extrem arbeitsintensiv und zeitaufwendig, menschliche Mutationen und strukturelle Varianten *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Als Teil dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass es mittels CRISPR/Cas9 Genome Editing in wenigen Wochen möglich ist, gezielt Gene in der Maus auszuschalten (knock out) und spezifische menschliche Deletionen nachzustellen [Kraft et al. 2015; Spielmann et al. 2016].

In einer Pilotstudie haben wir Mutationen in einem bisher unbekanntem Gen namens *ZAK* in zwei Patienten mit Spaltfüßen, Nagelaufälligkeiten und Schwerhörigkeit identifiziert. Da wir trotz intensiver Bemühungen und der Sanger-Sequenzierung von über 100 weiteren Patienten kein drittes unabhängiges Allel finden konnten, haben wir uns entschieden, das Gen mittels CRISPR/Cas9 zu untersuchen. Zunächst wiesen wir mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology nach, dass in der Maus die Inaktivierung beider Isoformen von *Zak* (knock

out) früh embryonal letal ist [Spielmann et al. 2016]. Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass mit Hilfe von zwei Guide-RNA Sequenzen die spezifische Deletion der SAM Domäne von *Zak* in der Maus zu komplexen Fehlbildungen der Extremitäten führt und mit einer verminderten Expression von *Trp63* assoziiert ist [Spielmann et al. 2016]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass *ZAK* eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Extremitäten bei Mensch und Maus besitzt. Weiterhin zeigen wir, dass es mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie möglich ist in weniger als 10 Wochen eine transgene Mäuse herzustellen, um die Pathogenität von mehreren menschlichen Mutationen nachzuweisen.

In einem weiteren Projekt konnten wir mittels CRISPR/Cas9 die Bedeutung von TAD-Boundaries am Beispiel des *EPHA4* Lokus nachweisen [Lupianez et al. 2015]. Wir haben zunächst drei 1,6 Mb große Deletionen identifiziert, die das *EPHA4* Gen und die benachbarte TAD-Boundary deletieren und zu einer seltenen Form der Brachydaktylie führen [Lupianez et al. 2015]. Interessanterweise zeigten *EPHA4* Knockout-Mäuse keine Auffälligkeiten der Extremitäten. Daher haben wir mittels zwei CRISPR/Cas9 Guide-RNA Sequenzen in der Maus die humane Deletion inklusive der TAD-Boundary und ohne die TAD-Boundary nachgestellt. Es zeigte sich, dass ausschließlich die Deletion inklusive der TAD-Boundary zu einem Brachydaktylie Phänotyp führte, während die Deletion ohne die TAD-Boundary ein normales Skelett entwickelte. Mittels in situ Hybridisierung und RNA-Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion endogene *EPHA4* Enhancer das benachbarte Gen *PAX3* durch Enhancer Adoption fehlregulieren können und so zu dem Phänotyp führen [Lupianez et al. 2015]. Im Einklang mit anderen aktuellen Studien konnten wir weiterhin die zentrale Rolle von CTCF-Bindungsstellen an TAD-Boundary bestätigen [Rao et al. 2014a; Vietri Rudan et al. 2015]

Diese Arbeiten zeigen, welches enorme Potential die CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologie für die biomedizinische Forschung und die Humangenetik hat. Das CRISPR/Cas9 System ist extrem robust und anwenderfreundlich und hat sich daher mit großer Geschwindigkeit durchgesetzt [Sternberg and Doudna 2015]. Für die Bewertung von spezifischen humanen Mutationen ist insbesondere der homology directed repair (HDR) in Kombination mit einer Donorsequenz (knock in) interessant. Neben der *in vivo* Analyse von Mäusen ist auch die *in vitro* Mutagenese sehr vielversprechend.

## 4 Zusammenfassung

Durch die Einführung von Whole Exome Sequenzierung und Whole Genome Sequenzierung konnte die diagnostische Erfolgsrate zum Beispiel für geistige Behinderung auf über 50% gesteigert werden. Trotz dieser enormen Fortschritte kann derzeit bei über 45% der Patienten in der Humangenetik keine Mutation nachgewiesen werden. Es ist wahrscheinlich, dass viele dieser Patienten Mutationen im nicht-kodierenden Teil des Genoms tragen. Der nicht-kodierenden Teil des Genoms wird derzeit in der humangenetischen Diagnostik ignoriert, denn traditionell werden Deletionen und Duplikationen auf Haploinsuffizienz, bzw. den Gen-Dosis-Effekt der Gene in den Aberrationen untersucht und mit öffentlichen Datenbanken abgeglichen. Dieser Ansatz führt jedoch nicht immer zum Erfolg und viele Varianten müssen in ihrem genomischen Kontext analysiert werden. Durch die Einführung von WGS zu Detektion von kleineren Varianten und Inversionen wird dieses Problem in der Zukunft häufiger werden. In den letzten Jahren ist unser Wissen über die Funktion der nicht-kodierenden Sequenz enorm gestiegen. Mit Hilfe von ChIP-seq und Hi-C Experimenten wurde die 3D Architektur des Genoms im Zellkern erforscht und *cis*-regulatorische Karten des gesamten menschlichen Genoms erstellt. Diese Daten zeigen, dass das Genom in sog. Topological associated Domains (TADs) unterteilt ist, die durch Boundary-Elemente begrenzt sind. Deletionen, Duplikationen und Inversionen können diese *cis*-regulatorische Architektur des nicht-kodierenden Genoms verändern, indem sie die Positionen von TADs und Boundaries verändern und so zu Fehlregulation von Genen und Fehlbildungen führen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Strukturelle Aberrationen der nicht-kodierenden DNA als molekulare Ursache mehrerer Erkrankungen identifiziert werden. Deletionen von exonischen Enhancer Elementen am *DLX5/6* Locus führen durch einen regulatorischen Funktionsverlust zu Spalthänden. Im Gegensatz dazu führen Duplikationen eines Enhancer Elements mit großer Wahrscheinlichkeit durch einen regulatorischen Gain of Function zum Laurin-Sandrow Syndrom. Das Liebenberg Syndrom und die mesomele Dysplasie vom Savarirayan Typ sind Beispiele für Deletionen von Boundary-Elementen und Fehlregulation durch Enhancer-Adoption. Weiterhin konnte in einer Pilotstudie gezeigt werden, dass es mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie möglich ist, in weniger als 10 Wochen transgene Mäuse herzustellen, um die Pathogenität von kodierenden und nicht-kodierenden menschlichen Mutationen nachzuweisen. Diese Arbeiten zeigen welches enorme Potential die CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologie für die biomedizinische Forschung und die Humangenetik hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und weitere aktuelle Studien zeigen, dass Positions-Effekte der nicht-kodierenden DNA mit ca. 11% ein wichtiger Mutations-Mechanismus bei angeborenen Erkrankungen der Extremitäten sind und dass CRISPR/Cas9 Genome Editing eine zentrale Rolle bei der Bewertung von nicht-kodierenden menschlichen Mutationen haben wird. Strukturelle Aberrationen in der humangenetischen Diagnostik sollten daher nicht nur auf Haploinsuffizienz von Genen untersucht werden, sondern müssen im *cis*-regulatorischen genomischen Kontext analysiert werden

## Referenzen

- Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S, Meloni I, Longo I, Mari F, Broccoli V, Zappella M, Renieri A. 2008. FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *American journal of human genetics* 83(1):89-93.
- Charpentier E, Doudna JA. 2013. Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature* 495(7439):50-51.
- Consortium EP. 2004. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* 306(5696):636-640.
- Consortium EP, Bernstein BE, Birney E, Dunham I, Green ED, Gunter C, Snyder M. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489(7414):57-74.
- Dathe K, Kjaer KW, Brehm A, Meinecke P, Nurnberg P, Neto JC, Brunoni D, Tommerup N, Ott CE, Klopocki E, Seemann P, Mundlos S. 2009. Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2. *American journal of human genetics* 84(4):483-492.
- de Wit E, de Laat W. 2012. A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes & development* 26(1):11-24.
- Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science* 295(5558):1306-1311.
- Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485(7398):376-380.
- Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS. 2010. Genomic medicine--an updated primer. *The New England journal of medicine* 362(21):2001-2011.
- Flottmann R, Wagner J, Kobus K, Curry CJ, Savarirayan R, Nishimura G, Yasui N, Spranger J, Van Esch H, Lyons MJ, DuPont BR, Dwivedi A, Klopocki E, Horn D, Mundlos S, Spielmann M. 2015. Microdeletions on 6p22.3 are associated with mesomelic dysplasia Savarirayan type. *J Med Genet* 52(7):476-483.
- Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, Kwint M, Janssen IM, Hoischen A, Schenck A, Leach R, Klein R, Tearle R, Bo T, Pfundt R, Yntema HG, de Vries BB, Kleefstra T, Brunner HG, Vissers LE, Veltman JA. 2014. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 511(7509):344-347.
- Guo Y, Xu Q, Canzio D, Shou J, Li J, Gorkin DU, Jung I, Wu H, Zhai Y, Tang Y, Lu Y, Wu Y, Jia Z, Li W, Zhang MQ, Ren B, Krainer AR, Maniatis T, Wu Q. 2015. CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function. *Cell* 162(4):900-910.
- Hou C, Li L, Qin ZS, Corces VG. 2012. Gene density, transcription, and insulators contribute to the partition of the Drosophila genome into physical domains. *Molecular cell* 48(3):471-484.
- Ibn-Salem J, Kohler S, Love MI, Chung HR, Huang N, Hurles ME, Haendel M, Washington NL, Smedley D, Mungall CJ, Lewis SE, Ott CE, Bauer S, Schofield PN, Mundlos S, Spielmann M, Robinson PN. 2014. Deletions of chromosomal regulatory boundaries are associated with congenital disease. *Genome biology* 15(9):423.

- Klopocki E, Mundlos S. 2011. Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 12:53-72.
- Kortum F, Das S, Flindt M, Morris-Rosendahl DJ, Stefanova I, Goldstein A, Horn D, Klopocki E, Kluger G, Martin P, Rauch A, Roumer A, Saitta S, Walsh LE, Wiczorek D, Uyanik G, Kutsche K, Dobyns WB. 2011. The core FOXP1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis. *Journal of medical genetics* 48(6):396-406.
- Kraft K, Geuer S, Will AJ, Chan WL, Paliou C, Borschiwer M, Harabula I, Wittler L, Franke M, Ibrahim DM, Kragestein BK, Spielmann M, Mundlos S, Lupianez DG, Andrey G. 2015. Deletions, Inversions, Duplications: Engineering of Structural Variants using CRISPR/Cas in Mice. *Cell Rep*.
- Lettice LA, Daniels S, Sweeney E, Venkataraman S, Devenney PS, Gautier P, Morrison H, Fantes J, Hill RE, FitzPatrick DR. 2011. Enhancer-adoption as a mechanism of human developmental disease. *Human mutation* 32(12):1492-1499.
- Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E. 2003. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Human molecular genetics* 12(14):1725-1735.
- Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES, Dekker J. 2009. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326(5950):289-293.
- Lohan S, Spielmann M, Doelken SC, Flottmann R, Muhammad F, Baig SM, Wajid M, Hulsemann W, Habenicht R, Kjaer KW, Patil SJ, Girisha KM, Abarca-Barriga HH, Mundlos S, Klopocki E. 2014. Microduplications encompassing the Sonic hedgehog limb enhancer ZRS are associated with Haas-type polysyndactyly and Laurin-Sandrow syndrome. *Clinical genetics*.
- Lupianez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, Wittler L, Borschiwer M, Haas SA, Osterwalder M, Franke M, Timmermann B, Hecht J, Spielmann M, Visel A, Mundlos S. 2015. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* 161(5):1012-1025.
- Lupianez DG, Spielmann M, Mundlos S. 2016. Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease. *Trends in genetics : TIG*.
- Mali P, Esvelt KM, Church GM. 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature methods* 10(10):957-963.
- Montavon T, Duboule D. 2013. Chromatin organization and global regulation of Hox gene clusters. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 368(1620):20120367.
- Montavon T, Soshnikova N, Mascrez B, Joye E, Thevenet L, Splinter E, de Laat W, Spitz F, Duboule D. 2011. A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell* 147(5):1132-1145.

- Nagano T, Lubling Y, Stevens TJ, Schoenfelder S, Yaffe E, Dean W, Laue ED, Tanay A, Fraser P. 2013. Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature* 502(7469):59-64.
- Nora EP, Lajoie BR, Schulz EG, Giorgetti L, Okamoto I, Servant N, Piolot T, van Berkum NL, Meisig J, Sedat J, Gribnau J, Barillot E, Bluthgen N, Dekker J, Heard E. 2012. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* 485(7398):381-385.
- Northcott PA, Lee C, Zichner T, Stutz AM, Erkek S, Kawauchi D, Shih DJ, Hovestadt V, Zapatka M, Sturm D, Jones DT, Kool M, Remke M, Cavalli FM, Zuyderduyn S, Bader GD, VandenBerg S, Esparza LA, Ryzhova M, Wang W, Wittmann A, Stark S, Sieber L, Seker-Cin H, Linke L, Kratochwil F, Jager N, Buchhalter I, Imbusch CD, Zipprich G, Raeder B, Schmidt S, Diessl N, Wolf S, Wiemann S, Brors B, Lawrenz C, Eils J, Warnatz HJ, Risch T, Yaspo ML, Weber UD, Bartholomae CC, von Kalle C, Turanyi E, Hauser P, Sanden E, Darabi A, Siesjo P, Sterba J, Zitterbart K, Sumerauer D, van Sluis P, Versteeg R, Volckmann R, Koster J, Schuhmann MU, Ebinger M, Grimes HL, Robinson GW, Gajjar A, Mynarek M, von Hoff K, Rutkowski S, Pietsch T, Scheurlen W, Felsberg J, Reifenberger G, Kulozik AE, von Deimling A, Witt O, Eils R, Gilbertson RJ, Korshunov A, Taylor MD, Lichter P, Korbel JO, Wechsler-Reya RJ, Pfister SM. 2014. Enhancer hijacking activates GF11 family oncogenes in medulloblastoma. *Nature* 511(7510):428-434.
- Palstra RJ, Tolhuis B, Splinter E, Nijmeijer R, Grosveld F, de Laat W. 2003. The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nature genetics* 35(2):190-194.
- Raab JR, Chiu J, Zhu J, Katzman S, Kurukuti S, Wade PA, Haussler D, Kamakaka RT. 2012. Human tRNA genes function as chromatin insulators. *The EMBO journal* 31(2):330-350.
- Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Aiden EL. 2014a. A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping. *Cell*.
- Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Aiden EL. 2014b. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159(7):1665-1680.
- Seruggia D, Montoliu L. 2014. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic research* 23(5):707-716.
- Sexton T, Yaffe E, Kenigsberg E, Bantignies F, Leblanc B, Hoichman M, Parrinello H, Tanay A, Cavalli G. 2012. Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. *Cell* 148(3):458-472.
- Shen Y, Yue F, McCleary DF, Ye Z, Edsall L, Kuan S, Wagner U, Dixon J, Lee L, Lobanenkov VV, Ren B. 2012. A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature* 488(7409):116-120.
- Shendure J. 2011. Next-generation human genetics. *Genome biology* 12(9):408.
- Spielmann M, Brancati F, Krawitz PM, Robinson PN, Ibrahim DM, Franke M, Hecht J, Lohan S, Dathe K, Nardone AM, Ferrari P, Landi A, Wittler L, Timmermann B, Chan D, Mennen U, Klopocki E, Mundlos S. 2012. Homeotic Arm-to-Leg

- Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the PITX1 Locus. *American journal of human genetics* 91(4):629-635.
- Spielmann M, Kakar N, Tayebi N, Leettola C, Nurnberg G, Sowada N, Lupianez DG, Harabula I, Flottmann R, Horn D, Chan WL, Wittler L, Yilmaz R, Altmuller J, Thiele H, van Bokhoven H, Schwartz CE, Nurnberg P, Bowie JU, Ahmad J, Kubisch C, Mundlos S, Borck G. 2016. Exome sequencing and CRISPR/Cas genome editing identify mutations of ZAK as a cause of limb defects in humans and mice. *Genome research* 26(2):183-191.
- Spielmann M, Klopocki E. 2013. CNVs of noncoding cis-regulatory elements in human disease. *Current opinion in genetics & development* Apr 16.: S0959-437.
- Spielmann M, Mundlos S. 2013. Structural variations, the regulatory landscape of the genome and their alteration in human disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 35(6):533-543.
- Spielmann MM, S. 2015. Nicht-kodierende Mutationen. *Medizinische Genetik*
- Volume 27 (Issue 1 ):pp 19-30.
- Sternberg SH, Doudna JA. 2015. Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular cell* 58(4):568-574.
- Tayebi N, Jamsheer A, Flottmann R, Sowinska-Seidler A, Doelken SC, Oehl-Jaschkowitz B, Hulsemann W, Habenicht R, Klopocki E, Mundlos S, Spielmann M. 2014. Deletions of exons with regulatory activity at the DYNC111 locus are associated with split-hand/split-foot malformation: array CGH screening of 134 unrelated families. *Orphanet journal of rare diseases* 9:108.
- Van Bortle K, Nichols MH, Li L, Ong CT, Takenaka N, Qin ZS, Corces VG. 2014. Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. *Genome biology* 15(6):R82.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S,

- McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-1351.
- Vietri Rudan M, Barrington C, Henderson S, Ernst C, Odom DT, Tanay A, Hadjur S. 2015. Comparative Hi-C reveals that CTCF underlies evolution of chromosomal domain architecture. *Cell Rep* 10(8):1297-1309.
- Visel A, Minovitsky S, Dubchak I, Pennacchio LA. 2007. VISTA Enhancer Browser--a database of tissue-specific human enhancers. *Nucleic acids research* 35(Database issue):D88-92.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153(4):910-918.
- Weedon MN, Cebola I, Patch AM, Flanagan SE, De Franco E, Caswell R, Rodriguez-Segui SA, Shaw-Smith C, Cho CH, Lango Allen H, Houghton JA, Roth CL, Chen R, Hussain K, Marsh P, Vallier L, Murray A, International Pancreatic Agenesis C, Ellard S, Ferrer J, Hattersley AT. 2014. Recessive mutations in a distal PTF1A enhancer cause isolated pancreatic agenesis. *Nature genetics* 46(1):61-64.
- Wieczorek D, Pawlik B, Li Y, Akarsu NA, Caliebe A, May KJ, Schweiger B, Vargas FR, Balci S, Gillessen-Kaesbach G, Wollnik B. 2010. A specific mutation in the distant sonic hedgehog (SHH) cis-regulator (ZRS) causes Werner mesomelic syndrome (WMS) while complete ZRS duplications underlie Haas type polysyndactyly and preaxial polydactyly (PPD) with or without triphalangeal thumb. *Human mutation* 31(1):81-89.
- Wittkopp PJ, Kalay G. 2012. Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nature reviews Genetics* 13(1):59-69.

## 5 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Professor Dr. Stefan Mundlos bedanken, der mich bei meinen wissenschaftlichen Interessen stets unterstützte und es mir ermöglichte, meinen Forschungsschwerpunkt auf die angeborenen Handfehlbildungen auszurichten.

Danken möchte ich den Kollegen und Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Genetik und des Max-Planck-Institutes für molekulare Genetik. Die Zusammenarbeit im Rahmen der durchgeführten Projekte war sehr bereichernd, sowohl in fachlicher als auch in persönlicher Hinsicht.

Herzlich danken möchte ich Frau Prof. Dr. Denise Horn, die meine klinische Ausbildung in der medizinischen Genetik betreut hat und eine tolle Lehrerin ist. Einen herzlichen Dank richte ich auch an Herrn Professor Dr. Peter Nick Robinson für die fruchtbare Kooperation und anregenden Diskussionen in den letzten Jahren. Weiterhin geht ein ganz besonderer Dank an Frau Dr. Ricarda Flöttmann und Frau Prof. Dr. Eva Klopocki für die tolle Zusammenarbeit. Fabienne Pritsch sowie Randi Koll gebührt ein großes Dankeschön für ihr tatkräftiges Engagement, das zum Gelingen der Projekte beitrug.

Ein ganz besonderer Dank geht an Bjort Kragesteen und Naeimeh Tayebi für ihre Hilfe und Unterstützung.

Großer Dank gilt meinen Kollegen am MPI: Dr. Daniel Ibrahim, Dr. Martin Franke, Dr. Saniye Sprenger, Dr. Hendrikje Hein, Dr. Dario Garcia Lupianez, Dr. Guillaume Andrey, Prof. Dr. Sigmar Stricker, Sinje Geuer, Anja Will, Dr. Julia Grohmann, Pedro Vallecillo-Garcia, Ivana Jerkovic, Jürgen Stumm, Izabella Harabula und Katerina Kraft! Jeder einzelne ist ein Grund, warum die Arbeit Freude bereitet hat! Danke an die gesamte Arbeitsgruppe, für immer bereitwillige Hilfe und die schöne Zeit!

Schließlich möchte ich mich auch bei den vielen Kollegen an der Charité bedanken, die mit zum Erfolg meiner Arbeit beitrugen, Prof. Dr. Uwe Kornak, Dr. Björn Fischer, Dr. Marten Jäger und Dr. Nadja Ehmke.

Durch die Forschungsförderung der Charité und das Clinical Scientist Programm der Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies (BSRT) standen mir finanzielle Mittel zur Verfügung, die zur Verwirklichung der Projekte unerlässlich waren. Auch hierfür möchte ich mich bedanken.

Ich bedanke mich bei den Patienten, ohne deren Kooperationsbereitschaft die Durchführung meiner wissenschaftlichen Projekte nicht möglich gewesen wäre. Ich würde mir wünschen, dass meine klinische Arbeit und die molekularen Ergebnisse einige ihrer Fragen beantworten konnten.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Eltern bedanken, die mich in all meinen Vorhaben immer unterstützten und für mich da sind. Ohne Euch wäre diese Arbeit unmöglich und sinnlos.

## 6 Erklärung

### Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift