

**Der Zebrafisch (*Danio rerio*) als *in vivo* Modell  
zur Untersuchung der Entstehung von Kraniosynostosen**

---

**The zebrafish (*Danio rerio*) as an *in vivo* model to study the emergence of  
craniosynostosis**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin

vorgelegt von  
**RABEA BLÜMEL**  
geboren in Essen

Würzburg, 2020

*„Inmitten des Wirrwarrs gilt es, das Einfache zu finden.“*

Albert Einstein

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Betreuer: Prof. Dr. Eva Klopocki

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Müller

3. Betreuer: Prof. Dr. Tilmann Schweitzer

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

---

AFFIDAVIT

I hereby confirm that my thesis entitled 'The zebrafish (*Danio rerio*) as an *in vivo* model to study the emergence of craniosynostosis' is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

---

Place, Date

---

Signature

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Der Zebrabärbling (*Danio rerio*) als *in vivo* Modell Zur Untersuchung der Entstehung von Kraniosynostosen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

---

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

BLÜMEL, R., ZINK, M., KLOPOCKI, E. & LIEDTKE, D. 2019. On the traces of *tcf12*: Investigation of the gene expression pattern during development and cranial suture patterning in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*, 14, e0218286.

---

# INHALT

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
1.1 Die Anatomie und Entwicklung des Schädeldachs von Vertebraten .....	5
1.2 Kraniosynostosen .....	9
1.3 Die Transkriptionsfaktoren TCF12 und TWIST1 .....	12
1.4 Tiermodelle für die Suturenentwicklung .....	16
1.5 Der Zebrafisch als Modellorganismus: genetische Modifizierungen .....	20
1.5.1 Gen Editierung mittels CRISPR/Cas9.....	22
1.5.2 Transgenese mit dem Tol2 Transposon System.....	27
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	30
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>32</b>
2.1 Material.....	32
2.1.1 Fischhaltung.....	32
2.1.2 Bakterienstamm.....	33
2.1.3 Reagenzien, Chemikalien und Puffer .....	33
2.1.4 Kit-Systeme und Reporter Assays .....	34
2.1.5 Enzyme .....	34
2.1.6 Antikörper.....	34
2.1.7 Vektoren.....	34
2.1.8 Geräte und Materialien .....	35

---

2.1.9 Programme und Datenbanken .....	35
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	40
2.2.3 Klonierungsstrategien.....	42
2.2.4 Methoden <i>Danio rerio</i> .....	54
2.2.5 Histologie.....	58
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>62</b>
3.1 Expressionsnachweis von <i>tcf12</i> im Zebrafisch.....	62
3.2 Analysen potentieller <i>tcf12</i> Enhancer Elemente im Zebrafisch .....	77
3.3 Die Auswirkung von <i>tcf12</i> und <i>twist1</i> Knockouts auf den Zebrafisch .....	80
3.3.1 Etablierung und Analyse verschiedener <i>tcf12</i> Knockout-Linien.....	80
3.3.2 Etablierung und Analyse von <i>twist1a</i> und <i>twist1b</i> Knockout-Linien .....	88
3.3.3 Analyse der Auswirkung von Doppel-/Dreifachmutationen in <i>tcf12</i> und <i>twist1a/twist1b</i> .....	94
3.4 Vergleichende funktionelle Analysen der Transaktivierung von mutiertem <i>TCF12</i> im Menschen und im Zebrafisch mittels Dual-Glo® Luciferase Assay System .....	95
3.4.1 <i>TCF12</i> Mutationen in der bHLH-Domäne verhindern die Transaktivierung an das E-Box Motiv .....	96
3.4.2 Eine Co-Transfektion von <i>TWIST1</i> reduziert die Transaktivierung von TCF12 .....	98
3.4.3 <i>tcf12</i> Mutationen der Knockout-Zebrafischlinien bewirken unterschiedliche Reduktion der Transaktivierungsfähigkeit von Tcf12 .....	100
3.4.4 Twist1a und Twist1b reduzieren die Transaktivierung von Tcf12 im Zebrafisch gleichermaßen.....	101
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>105</b>
4.1 Analyse der räumlichen und zeitlichen <i>tcf12</i> Expression im Zebrafisch .....	106
4.1.1 Analyse der endogenen <i>tcf12</i> Expression.....	106

---

4.1.2 <i>in vivo</i> Charakterisierung der <i>tcf12:EGFP</i> Expression .....	107
4.1.2.1 <i>tcf12</i> Expression in neuronalen Geweben .....	110
4.1.2.2 <i>tcf12</i> Expression in Muskeln.....	110
4.1.2.3 <i>tcf12</i> Expression in weiteren Geweben.....	111
4.1.2.4 <i>tcf12</i> Expression während der Schädelentwicklung.....	111
4.2 <i>In vivo</i> Analysen von <i>tcf12</i> Enhancer Elementen.....	114
4.3 Die Auswirkung von <i>tcf12</i> und <i>twist1</i> Mutationen auf den Zebrafisch .....	117
4.3.1 Analyse der <i>tcf12</i> Knockout-Linien.....	117
4.3.2 Analyse der <i>twist1</i> Knockout-Linien .....	122
4.3.3 Analyse der <i>tcf12;twist1</i> Doppel- /Dreifachmutanten.....	124
4.4 Funktionelle Analyse der Auswirkung von <i>TCF12</i> Mutationen in Mensch und Zebrafisch.....	127
4.4.1 Analyse der vier <i>TCF12</i> Patienten Varianten .....	127
4.4.2 Regulation der Transaktivierung von TCF12 durch TWIST1 im Menschen....	130
4.4.3 Einordnung der funktionellen Konsequenzen der drei <i>tcf12</i> Knockout-Mutationen.....	135
4.4.4 Regulation der Transaktivierung von Tcf12 durch Twist1 im Zebrafisch.....	136
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>138</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>PUBLIKATION UND KONGRESSBEITRÄGE .....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>XI</b>
A) Primer-Sequenzen.....	XI
B) Detektion von <i>tcf12</i> Transkripten mittels <i>in-situ</i> Hybridisierungs-Proben .....	XIII
C) Vektorkarten .....	XIV

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Schädeldachs eines Säuglings.....	6
Abbildung 2: Intramembranöse Ossifikation an der Schädelplatte.....	8
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Wirkmechanismus der Transkriptionsfaktoren TCF12 und TWIST1 während der Suturenentwicklung.....	16
Abbildung 4: Vergleichende Übersicht der Anatomie des Schädeldachs und der Schädelnähte des Menschen und vier verschiedener Vertebraten, die als Modellorganismen für Kraniosynostosen dienen. ....	17
Abbildung 5: Übersicht der drei Phasen des CRISPR/Cas Mechanismus. ....	23
Abbildung 6: Funktionsweise der Genomeditierung mit dem CRISPR/Cas9-System. ....	26
Abbildung 7: Vergleich von adulten Zebrafischen der WT-Stämme AB und <i>mitfa</i> <sup>w2/w2</sup> ; <i>mpv17</i> <sup>b18/b18</sup> .....	32
Abbildung 8: Schematische Darstellung der BP-Reaktion zur Generierung des Eingangsvektors pENTR- <i>tcf12</i> Promoter .....	47
Abbildung 9: Schematische Darstellung der LR-Reaktion zum Erstellen des Expressionsvektors <i>ptcf12:EGFP</i> . ....	48
Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung des Vektors pZED ( <i>Zebrafisch Enhancer Detection</i> ). ....	49
Abbildung 11: Nachweis der <i>tcf12</i> Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie in Geweben adulter Zebrafische.....	63
Abbildung 12: <i>Whole-mount</i> RNA <i>in-situ</i> Hybridisierungen von <i>tcf12</i> an 24hpf (A, A'), 48hpf (B, B') und 72hpf (C, C') alten <i>mitfa</i> <sup>w2/w2</sup> ; <i>mpv17</i> <sup>b18/b18</sup> Zebrafisch WT Embryonen. ....	64
Abbildung 13: Darstellung des Reportergeren-Konstruktes <i>-2,1tcf12:EGFP</i> und des Kreuzungsschemas zur Etablierung der <i>Tg(-2.1tcf12:EGFP)</i> Zebrafischlinie.....	66
Abbildung 14: Gegenüberstellung der endogenen <i>tcf12</i> Expression und der EGFP Expressionsmuster transgener <i>Tg(-2.1tcf12:EGFP)</i> Embryonen.....	67
Abbildung 15: Vergleich der Expressionsmuster von 72hpf alten <i>Tg(-0.2tcf12:EGFP)</i> (A) und <i>Tg(-2.1tcf12:EGFP)</i> Embryonen (B). ....	69
Abbildung 16: Analyse der <i>tcf12</i> Expression über die Zeit hinweg vom Larvalstadium bis hin zu adulten Zebrafischen.....	72

Abbildung 17: Analyse des Wachstums der Schädelplatten und der Ausbildung der Schädelnähte in WT Fischen des Stammes <i>mitfa</i> <sup>w2/w2</sup> ; <i>mpv17</i> <sup>b18/b18</sup> .....	73
Abbildung 18: <i>tcf12:EGFP</i> Expression während der Entwicklung des Schädeldachs und der Schädelnähte in transgenen Zebrafischen mit einer Gesamtlänge von 8-13mm (30-45dpf).....	75
Abbildung 19: <i>tcf12:EGFP</i> Expression während der Entwicklung des Schädeldachs und der Schädelnähte in transgenen Zebrafischen mit einer Gesamtlänge von 14-18mm (50-90dpf). ....	76
Abbildung 20: Lokalisation EGFP exprimierender Zellen entlang der Schädelknochen und im Bereich der Suture in transgenen Zebrafischen.....	77
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Lage und Konservierung der drei analysierten <i>tcf12</i> -CNEs.....	78
Abbildung 22: <i>in vivo</i> Analyse der drei potentiellen <i>TCF12</i> Enhancer Elemente <i>tcf12</i> -CNE1-3 im Zebrafisch.....	80
Abbildung 23: Übersicht der Generierung von Zebrafisch Knockout-Linien mit dem CRISPR/Cas9 System.....	81
Abbildung 24: Übersicht der Mutationen der <i>tcf12</i> Knockout-Linien.....	83
Abbildung 25: Partielle unilaterale Fusion innerhalb der Koronarnaht eines <i>tcf12</i> <sup>Ex8+/-</sup> Fisches.....	85
Abbildung 26: Auffällige Schädelphänotypen der <i>tcf12</i> Knockout-Linien.....	87
Abbildung 27: Vergleich der endogenen Expression von <i>twist1a</i> und <i>twist1b</i> mit <i>tcf12</i> in verschiedenen Stadien und Geweben des Zebrafisches.....	88
Abbildung 28: Vergleich der räumlichen und zeitlichen Expression von <i>twist1a</i> , <i>twist1b</i> und <i>tcf12</i> mittels <i>Whole-mount RNA in-situ</i> Hybridisierungen.....	89
Abbildung 29: Mutationen der <i>twist1a</i> und <i>twist1b</i> Knockout-Linien.....	91
Abbildung 30: Übersicht der detektierten Anomalien in den Schädelnähten von <i>twist1b</i> <sup>+/-</sup> Mutanten.....	93
Abbildung 31: Prinzip des Dual-Glo® Luciferase Reporterassays.....	96
Abbildung 32: Darstellung der mittels Reporterassay untersuchten <i>TCF12</i> Varianten ...	97
Abbildung 33: Untersuchung der funktionellen Auswirkung fünf verschiedener <i>TCF12</i> Varianten von Patienten mit Koronarnahtsynostosen mittels Dual-Glo® Luciferase Reporterassay.....	98

---

Abbildung 34: TCF12 Transaktivierung bei Co-Transfektion mit <i>TWIST1</i> mittels Dual-Glo® Luciferase Reporterassay.....	99
Abbildung 35: Analyse der Luciferase-Aktivität von TCF12 bei Co-Transfektion verschiedener Konzentrationen von <i>TWIST1</i> .....	100
Abbildung 36: Funktionelle Auswirkung der <i>tcf12</i> Mutationen der stabilen Zebrafisch Knockout-Linien .....	101
Abbildung 37: Untersuchung der Tcf12 Transaktivierung bei Co-Transfektion mit <i>twist1a</i> und <i>twist1b</i> mittels Dual-Glo® Luciferase Reporterassay.....	103
Abbildung 38: Embryonaler Ursprung der Knochenelemente des Schädeldachs in verschiedenen Vertebraten .....	126
Abbildung 39: Lokalisation der mittels Reporterassay untersuchten <i>TCF12</i> Patienten Varianten auf Gen- und Protein- Ebene.....	128
Abbildung 40: Regulation der Transaktivierung der Reportergenexpression durch TCF12 WT und TCF12 Mut Proteine.....	129
Abbildung 41: Erklärungsansätze für die Reduktion der Transaktivierung des Reportergens bei Co-Transfektion von <i>TCF12</i> und <i>TWIST1</i> .....	132

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Zusammenfassung der Untersuchung der WT und <i>tcf12</i> Knockout-Linien zu Auffälligkeiten innerhalb der Schädelnähte.....	84
Tabelle 2: Zusammenfassung der Untersuchung der <i>twist1a/b</i> Knockout-Linien zu Auffälligkeiten innerhalb der Schädelnähte.....	92
Tabelle 3: Zusammenfassung der Untersuchung der <i>tcf12;twist1</i> Doppel-/Dreifach-Knockout-Linien zu Auffälligkeiten innerhalb der Schädelnähte.....	94
Tabelle 4: Übersicht der Detektierten <i>tcf12:EGFP</i> Expression in <i>-2.1tcf12:EGFP</i> Fischen über die Entwicklung hinweg.....	109
Tabelle 5: Auswirkung der Mutation <i>tcf12<sup>sa14175</sup></i> auf die kodierenden Transkripte (Ensembl Version GRCz11).....	118

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
*	Stopcodon
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
<b>A</b>	
a	anterior
A	Adenin
A	Auge
AS	Aminosäuren
AD1	Aktivierungsdomäne1
AD2	Aktivierungsdomäne2
att	<i>attachment sites</i>
<b>B</b>	
Bb	Branchialbögen
Bf	Brustflosse
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
bp	Basenpaar(e)
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
<b>C</b>	
C	Cytosin
Cas	CRISPR-assoziierte (Nukleasen)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CNE	<i>conserved non-coding elements</i>
CNS	<i>central nervous system</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>D</b>	
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpf	<i>days post fertilization</i>
Dm	<i>Dura mater</i>
<b>E</b>	
E	Epiphyse
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
EMSA	Elektrophoretische Mobilitäts Shift Assays
engl	englisch
EtOH	Ethanol
Exo	Exonuklease I
<b>F</b>	

F	Frontalknochen
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	engl. <i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
for	<i>forward</i>
<b>G</b>	
g	Gramm
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
<b>H</b>	
H	Herz
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
Hhb	Hinterhauptbein
hpf	<i>hours post fertilization</i>
HR	homologe Rekombination
<b>I</b>	
I	Interfrontalnaht
ID	<i>inhibitor of DNA-binding</i>
IHC	Immunhistochemisch
<b>J</b>	
<b>K</b>	
K	Koronarnaht
<b>L</b>	
L	Linse
lat	lateinisch
<b>M</b>	
M	Mesenchym
M	Marker
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
Mh	Mittelhirn
min	Minute
mM	Millimolar
MNG	Mittel-Nachhirngrenze
MSCs	<i>mesenchymal stem cells</i>
<b>N</b>	
n.a.	nicht auffällig
NHEJ	nicht-homologes <i>end-joining</i>
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
Nr	Neuralrohr
<b>O</b>	
oV	otisches Vesikel
<b>P</b>	
p	posterior
P	Parietalknochen
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit Tween20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pn	Pronephros
Ps	Periost
<b>R</b>	
Rep	Repressordomäne
rev	<i>reverse</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
Rh	Rautenhirn
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RUNX	<i>runt-related transcription factor 1</i>
<b>S</b>	
s	Sekunden
S	Sagittalnaht
SAP	<i>Shrimp</i> Alkalische Phosphatase
s.f.	steril filtriert
sgRNA	<i>single guide</i> RNA
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
SSCT	SSC mit Tween20
Sk	Schwanzknospe
Som	Somiten
<b>T</b>	
TALEN	<i>transcription activator-like effector nuclease</i>
T	Thymin
TCF12	<i>transcription factor 12</i>
Tg	Transgen
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
tracrRNA	<i>transactivating</i> CRISPR RNA
tRNA	Torular yeast RNA
TWIST1	<i>twist family bHLH transcription factor 1</i>
<b>U</b>	
Uk	Unterkiefer
<b>V</b>	
vgl	vergleiche
Vh	Vorderhirn
vM	ventrales Mesoderm.
<b>W</b>	
WT	Wildtyp
<b>X</b>	
<b>Y</b>	
<b>Z</b>	
ZED	<i>Zebrafish Enhancer Detection</i>
ZIRC	<i>Zebrafish International Resource Center</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung des Schädeldachs beginnt beim Menschen bereits in der frühen Embryogenese und ist erst im Erwachsenenalter abgeschlossen. Das Wachstum der Schädelknochen muss sich während der Entwicklung fortwährend dem Gehirnwachstum anpassen. An den Stellen, wo zwei Schädelknochen aufeinandertreffen, formen sich Schädelnähte, die aus mesenchymalem Bindegewebe bestehen und als Wachstumsfugen des Schädels dienen. Tritt eine frühzeitige Verknöcherung innerhalb einer oder mehrerer Schädelnähte auf, spricht man von einer Kraniosynostose. Als Konsequenz wird ein weiteres Knochenwachstum verhindert, sodass sich das Neurokranium in dieser Region nicht dem expansiven Wachstum des Gehirns anpassen kann. Dies geht in der Regel mit einem kompensatorischen Wachstum des Schädels und infolgedessen mit kraniofazialen Dysmorphien und einem erhöhten intrakraniellen Druck einher. Klinische Studien und Forschungen an Modellorganismen konnten bereits eine Vielzahl an Genen mit der Entstehung von Kraniosynostosen assoziieren, darunter die Transkriptionsfaktoren *TCF12* und *TWIST1*. Beim Menschen sind heterozygote Mutationen in *TCF12* und *TWIST1* mit Kraniosynostosen der Koronarnaht assoziiert. Bei Mäusen hingegen führt eine heterozygote *Tcf12* Mutation nur in Kombination mit einer heterozygoten *Twist1* Mutation zu Fusionen der Koronarnaht.

Der Zebrafisch (*Danio rerio*, überwiegend auch Zebrafisch genannt) weist eine bemerkenswerte Ähnlichkeit bezüglich der Anatomie und Morphologie des Schädeldachs zum Menschen auf. Um die genaue Funktion von *TCF12* bei der Ausbildung der Schädelnähte zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Zebrafisch als *in vivo* Modell für die Entstehung *tcf12*-induzierter Kraniosynostosen etabliert. Zu Beginn der Arbeit wurde das Expressionsmuster von *tcf12* über die Entwicklung hinweg analysiert. Ein besonderer Fokus lag dabei auf einem Expressionsnachweis während der Entwicklung der Schädelplatten und der Schädelnähte. Ein erster Expressionsnachweis von *tcf12* mittels PCR-Analysen und *Whole-mount* RNA *in-situ* Hybridisierungen zeigte eine breite Expression von *tcf12* ab dem 1-3 Somiten Stadium an. Für tiefergehende *in vivo* Analysen wurden im Zuge dieser Arbeit *tcf12:EGFP* Reportergermlinien generiert. Mit diesen gelang ein Nachweis der *tcf12* Expression entlang der Wachstumsfronten der Schädelplatten, innerhalb der Schädelnähte sowie im Periost und der *Dura mater*.

Mit den *tcf12:EGFP* Fischen als Referenz wurde in weiterführenden Experimenten die Aktivität drei hochkonservierter CNEs (engl. *conserved non-coding elements*) *in vivo* im Zebrafisch untersucht. Zwei der CNEs konnten als *tcf12* Enhancer verifiziert werden, die eine Genexpression während der Neurogenese des zentralen Nervensystems (ZNS) steuern. Die beiden Enhancer-Elemente zeichnen sich durch eine hohe Konservierung vom Menschen bis hin zum Zebrafisch aus.

Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber einem Funktionsverlust von *TCF12* und *TWIST1* in Mensch und Maus sollte die Auswirkung eines Knockouts der orthologen Gene auf die Entwicklung der Schädelnähte des Zebrafisches untersucht werden. Mittels CRISPR/Cas9 wurden verschiedene Knockout-Linien für die Gene *tcf12*, *twist1a* und *twist1b* generiert. Analysen der Knockoutmutanten zeigten, dass ein heterozygoter Verlust von *tcf12* und *twist1b* in seltenen Fällen zu partiellen Fusionen der Koronarnähte im Zebrafisch führt. Des Weiteren konnte bei *tcf12* und *twist1b* Einzel- und Doppelmutanten ein abnormes Wachstum der Schädelplatten im Bereich der Suturen beobachtet werden. Die Expressionsstudien und die Analysen der Knockoutmutanten deuten auf eine Regulation von *TCF12* bei der Differenzierung der Stammzellen sowie der Proliferation der Osteoblasten innerhalb der Schädelnähte hin.

Um die Auswirkung von *TCF12* Mutationen auf funktioneller Ebene zu untersuchen wurden im Verlauf dieser Arbeit Luciferase-Reporter Assays durchgeführt. Anhand dieser konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen, die die *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Domäne beeinträchtigen, die Transaktivierungsfähigkeit von *TCF12* aufheben. Co-Transfektions-Experimente mit *TWIST1* offenbarten eine Regulation der Transaktivierung von *TCF12* durch *TWIST1*, sowohl im Menschen, als auch im Zebrafisch. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die genauen Expressionsorte von *TCF12* während der Morphogenese des Schädeldachs nachgewiesen und die Funktion von *TCF12* und seinem Interaktionspartner *TWIST1* bei der Entstehung von Kraniosynostosen weiter aufgeklärt werden.

## SUMMARY

The morphogenesis of the calvaria is initiated during early embryogenesis and completed during adulthood. The growth of the skull must continuously adapt to the growth of the developing brain. Where two cranial bones meet, fibrous sutures form. The cranial sutures consist of connective tissue and serve as growth sites of the skull. A premature closure (fusion) of one or several of the cranial sutures is a condition called craniosynostosis. Further bone growth in this area is prevented and the neurocranium cannot adapt to the expansive growth of the brain. The result is a compensatory growth of the skull leading to craniofacial dysmorphisms and also, in more severe cases, to an increased intracranial pressure. Clinical studies and research on model organisms have been able to identify a large number of genes involved in suture development and craniosynostosis, including the transcription factors *TCF12* and *TWIST1*. In humans, heterozygous mutations in both, *TCF12* and *TWIST1*, are associated with craniosynostosis. In mice, haploinsufficiency of *Tcf12* alone does not lead to coronal suture fusion. Only loss of *Twist1* along with loss of *Tcf12* results in craniosynostosis of the coronal suture.

Zebrafish (*Danio rerio*) show a remarkable similarity regarding the anatomy and morphology of the skull vault to that of humans. To unravel the function of *tcf12* in cranial suture development, this study aimed to establish a zebrafish *in vivo* model for *tcf12* induced craniosynostosis. First, the expression pattern of *tcf12* was analyzed throughout zebrafish development. Special focus was placed on examining the expression of *tcf12* during development of the skull plates and the cranial sutures.

PCR-analysis and *whole-mount* RNA *in-situ* hybridization revealed a broad *tcf12* expression in different tissues beginning from the 1-3-somites stage. For more in-depth *in vivo* analyses, transgenic *tcf12:EGFP* reporter lines were generated. During cranial vault development, the transgenic fish showed a high amount of *tcf12* expressing cells along the growth fronts of the skull plates, within the cranial sutures as well as in the periosteum and the *Dura mater*.

In addition, with the *tcf12:EGFP* fish as a reference, we tested the transcriptional activity of three highly conserved non-coding elements (CNEs) in zebrafish *in vivo*. We could validate two of the CNEs as *tcf12* enhancer elements driving gene expression in the central

nervous system during neurogenesis. The two CNEs show a high conservation between humans and zebrafish.

Due to the different sensitivities to loss of *TCF12* and *TWIST1* in humans and mice, the effect of a gene knockout of the orthologous genes on the development of the sutures should be examined in zebrafish. Therefore, various knockout lines for the genes *tcf12*, *twist1a* and *twist1b* were generated using CRISPR/Cas9. Analyses of the knockout mutants showed that, in a few cases, a heterozygous loss of *tcf12* or *twist1b* led to partial fusions of the coronal sutures in zebrafish. Furthermore, abnormal growth of the skull plates in the area of the sutures could be observed in *tcf12* and *twist1b* single and double knockout mutants. The expression studies and the analyses of the knockout mutants indicate a regulation of *TCF12* in the differentiation of stem cells and in the proliferation of osteoblasts within the cranial sutures.

In order to investigate the effects of *TCF12* mutations on a functional level, luciferase reporter assays were performed. Based on the reporter assays it was demonstrated that mutations impairing the basic helix-loop-helix (bHLH) domain compromise the transactivation ability of *TCF12* remarkably. Co-transfection experiments with *TWIST1* revealed regulation of the transactivation of *TCF12* by *TWIST1*, both in humans and in zebrafish.

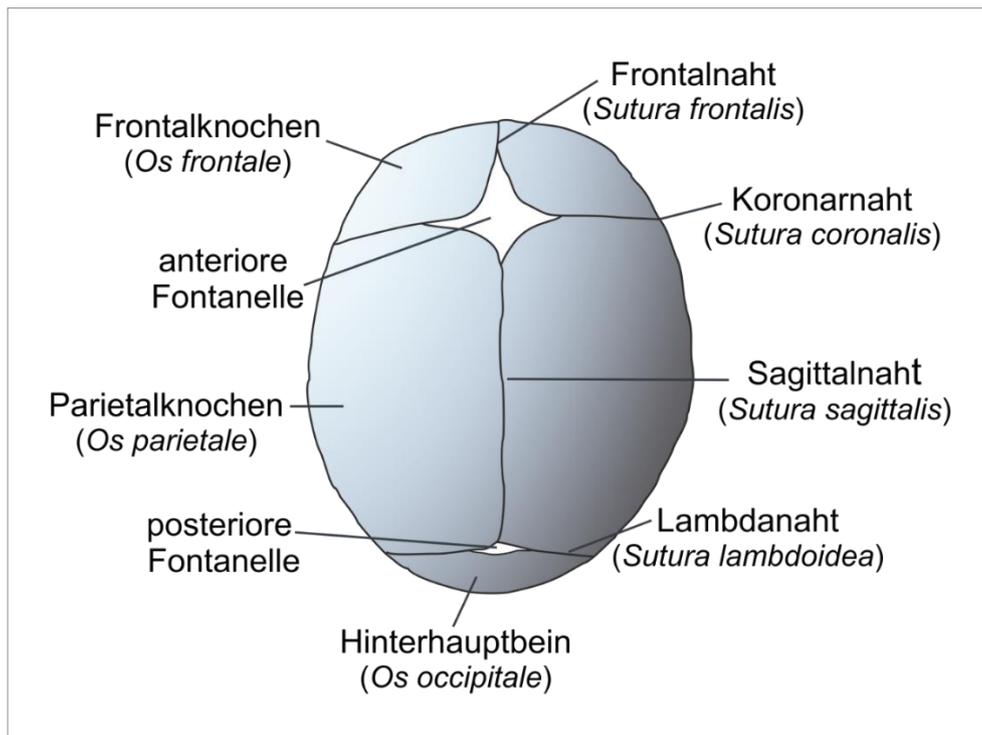
Within the scope of this work, the exact expression patterns of *TCF12* could be demonstrated during the morphogenesis of the cranial vault. Moreover, the function of *TCF12* and its interaction partner *TWIST1* could be further clarified in the development of craniosynostosis.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Die Anatomie und Entwicklung des Schädeldachs von Vertebraten

Der Schädel von Wirbeltieren (Vertebrata) setzt sich aus dem Gesichtsschädel (lat. *Viscerocranium*) und dem Hirnschädel (lat. *Neurocranium*) zusammen. Das Viszerokranium wiederum besteht aus den Augen- und Nasenhöhlen sowie dem Ober- und Unterkiefer, die durch das Kiefergelenk miteinander verbunden werden. Das Neurokranium umgibt und schützt das Gehirn und wird in das Schädeldach (lat. *Calvaria*) und die Schädelbasis (lat. *Basis cranii*) unterteilt (Jin et al., 2016). Die Hauptaufgabe des Schädels ist der Schutz des wohl wichtigsten Organs des Menschen, dem Gehirn.

In Abbildung 1 ist eine Übersicht des Schädeldachs eines Säuglings dargestellt. Dieses besteht aus fünf Knochen: dem paarigen Stirnbein (auch Frontalknochen, lat. *Os frontale*), dem paarigen Scheitelbein (auch Parietalknochen, lat. *Os parietale*) und dem Hinterhauptbein (lat. *Os occipitale*). Die Schädelknochen werden an den Rändern durch Schädelnähte, auch Suturen genannt, miteinander verbunden. Die Suturen enthalten mesenchymales Bindegewebe und dienen zum einen als Wachstumsfugen des Schädels und ermöglichen zum anderen einen gewissen Grad an mechanischer Bewegung. Die Hauptsuturen des Schädeldachs sind die Frontalnaht (auch metopische Naht, lat. *Sutura frontalis*), die Kranznähte (auch Koronarnähte, lat. *Sutura coronalis*), die Sagittalnaht (lat. *Sutura sagittalis*) und die Lambdanaht (lat. *Sutura lambdoidea*) (Senarath-Yapa et al., 2012). Neugeborene besitzen neben den Suturen noch bindegewebige Areale, die Fontanellen, an denen mindestens drei Schädelplatten aufeinandertreffen. Man unterscheidet zwischen der anterior gelegenen Fontalle, bei der sich die beiden Frontal- und Parietalknochen treffen und der posterior gelegenen Fontanelle, bei der die beiden Parietalknochen auf das Hinterhauptbein treffen (siehe Abbildung 1). Die Schädelnähte und insbesondere die Fontanellen erlauben bei der Geburt eine beträchtliche Verformung des Schädels, sodass der verhältnismäßig große Kopf des Säuglings den Geburtskanal passieren kann (Jin et al., 2016).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Schädeldachs eines Säuglings**

Eine dorsale Aufsicht auf das Schädeldach eines Neugeborenen gibt eine Übersicht über die Lage der fünf Schädelknochen, der vier verschiedenen Schädelnähte und der beiden Fontanelle.

Die Morphogenese des Schädeldachs ist ein Entwicklungsprozess, der in der frühen Embryogenese beginnt und erst im Erwachsenenalter abgeschlossen ist. Der Prozess der Knochenbildung wird als Ossifikation bezeichnet. Allgemein wird zwischen zwei Arten der Ossifikation unterschieden: der intramembranösen und der chondralen Ossifikation. In beiden Fällen werden die Knochenelemente aus mesenchymalen Stammzellen (engl. *mesenchymal stem cells*, MSCs) gebildet. Der überwiegende Teil der Knochen, darunter die Schädelbasis und die Röhrenknochen, wird durch die chondrale Ossifikation gebildet. Durch die intramembranöse Ossifikation werden platte Knochen gebildet, zu denen die Schädelknochen zählen (Marks, 1996, Kanczler and Oreffo, 2008).

### **Chondrale Ossifikation**

Bei der chondralen Ossifikation wird der Knochen nicht direkt aus mesenchyalem Bindegewebe, sondern über eine Zwischenstufe aus Knorpel gebildet. Diese Form der Ossifikation wird daher auch als indirekte Ossifikation bezeichnet. Im Laufe der Entwicklung wird das Knorpelgewebe schrittweise durch Knochen ersetzt. Bei der chondralen Ossifikation verdichten sich mesenchymale Zellen zunächst am zukünftigen

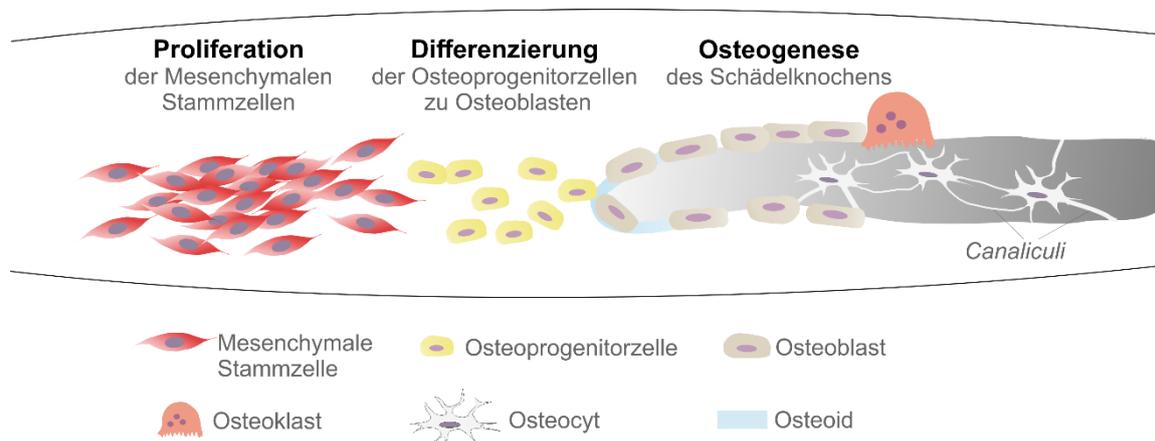
Ort der Knochenelemente und differenzieren zu Kollagen Typ II exprimierenden Chondroblasten (Kanczler and Oreffo, 2008). Diese differenzieren anschließend zu Chondrozyten, welche neben verschiedenen Kollagenen auch Proteoglykane exprimieren und infolgedessen eine Knorpelmatrix ausbilden. Im Zentrum der Knorpelmatrix (Diaphyse) hören die Chondrozyten auf zu proliferieren und werden hypertroph. Perichondrale Zellen an den hypertrophen Chondrozyten differenzieren zu Osteoblasten und bilden eine Knochenmanschette, die im weiteren Verlauf das Periost (Knochenhaut) bildet. Die hypertrophen Chondrozyten exprimieren angiogene Faktoren, um Blutgefäße in den Knorpel zu rekrutieren (Kanczler and Oreffo, 2008). Es folgt eine Degeneration der Chondrozyten und die Bildung einer mineralisierenden Matrix. Durch die Blutgefäße gelangen Chondroklasten in die Matrix, die einen Abbau der verkalkten Knorpelsubstanz regulieren. In die dadurch entstehenden Zwischenräume wandern weitere Blutgefäße sowie Bindegewebe ein. Der mineralisierende Knorpel wird durch Osteoklasten abgebaut und durch einwandernde Osteoblasten durch Knochen ersetzt (Einhorn, 2005). Durch eine stetige Synchronisation von Chondrozyten-Proliferation und -Hypertrophie, Apoptose und vaskulärer Invasion innerhalb der Wachstumsfuge wird in den Röhrenknochen das Längenwachstum gesteuert (Kanczler and Oreffo, 2008, Hunziker, 1994).

### **Intramembranöse Ossifikation**

Die intramembranöse Ossifikation, aus der neben den Schädelknochen auch verschiedene Knochen des Gesichtsschädels, Teile des Unterkiefers und des Schlüsselbeins hervorgehen, zeichnet sich durch eine Knochenbildung direkt aus MSCs aus (Percival and Richtsmeier, 2013). Die MSCs, aus denen die Schädelknochen gebildet werden, können ihren Ursprung entweder im Mesoderm oder der Neuralleiste haben (McBratney-Owen et al., 2008, Noden and Trainor, 2005).

Eine Übersicht der intramembranösen Ossifikation an den Schädelknochen ist in Abbildung 2 dargestellt. Aus den MSCs gehen Osteoprogenitorzellen hervor, die zu Osteoblasten ausdifferenzieren. Die Osteoblasten synthetisieren organische Knochenmatrix, Osteoid genannt, die hauptsächlich aus Typ I Kollagenen besteht, sowie anderen Knochenproteinen wie dem Bone Sialoprotein, Osteopontin, Osteocalcin und Proteoglycanen (Opperman, 2000). Die Knochenmatrix bildet die Grundsubstanz für den entstehenden Knochen. Sie lagert sich weiter an und bildet Knochen trabekel aus, kleine

Bälkchen, die zu einer gitterartigen Struktur angeordnet werden. Diese Matrix wird immer weiter verdickt und expandiert in ihrer Form (Richtsmeier and Flaherty, 2013). Da Knochen nur appositionell, nicht aber interstitiell wachsen können, müssen während des Wachstums stetig weitere Osteoprogenitorzellen zu dem wachsenden Knochengewebe rekrutiert werden. Die Osteoblasten werden schrittweise in die mineralisierende Matrix eingelagert und differenzieren zu Osteozyten. Osteozyten sind sternförmige Zellen, die über Knochenkanälchen innerhalb der mineralisierten Matrix, den *Canaliculi*, den Erhalt der Knochenmatrix regulieren (Franz-Odendaal et al., 2006, Kawasaki et al., 2009). Die *Canaliculi* stellen Zugangswege für Osteoprogenitorzellen und Osteoklasten dar, die für den Knochenauf- und abbau (auch *remodeling* genannt) benötigt werden (Richtsmeier and Flaherty, 2013).



**Abbildung 2: Intramembranöse Ossifikation an der Schädelplatte**

Die Mesenchymalen Stammzellen proliferieren, kondensieren und differenzieren zu Osteoprogenitorzellen aus. Die Osteoprogenitorzellen werden zu dem wachsenden Knochen rekrutiert und differenzieren zu Osteoblasten aus. Diese sekretieren Osteoid, werden schrittweise in die mineralisierende Knochenmatrix eingelagert und differenzieren anschließend zu Osteozyten. Der weitere Auf- und Abbau am bestehenden Knochen wird von Osteoprogenitorzellen und Osteoklasten über die *Canaliculi* gesteuert.

Die Suturen selbst besitzen kein intrinsisches Wachstumspotential, sondern neues Knochengewebe wird an den Wachstumsfronten der Schädelplatten als Reaktion auf externe Stimuli ausgebildet. Daher ist es essentiell, dass die Schädelnähte selbst nicht verknöchern, solange das Wachstum des Schädeldachs stattfindet (Opperman, 2000).

## 1.2 Kraniosynostosen

Bei der Geburt sind die Schädelplatten von Neugeborenen durch die Suturen und Fontanellen deutlich voneinander separiert. Diese offenen Regionen werden in der nachfolgenden Entwicklung durch ein schnelles Wachstum der Schädelknochen entlang der Ränder der Fontanellen geschlossen, sodass die Schädelplatten nur noch durch die Suturen voneinander abgegrenzt werden. Die Frontalnaht verknöchert beim Menschen als erste zwischen dem 3. und 9. Lebensmonat (Vu et al., 2001). Bei ca. 10% der Bevölkerung verknöchert die Frontalnaht nicht, sondern bleibt offen (Kokich, 1986). Die Koronarnähte sowie die Sagittal- und Lambdanaht fusionieren zwischen dem 22. und 39. Lebensjahr (Cohen, 1993). Das Wachstum der Schädelknochen passt sich fortwährend dem Gehirnwachstum an. Der Stimulus für das Wachstum wird dabei primär von dem wachsenden Gehirn abgegeben. Dies geschieht in Form von Signalen, die die *Dura mater* aussendet (Jin et al., 2016, Caetano-Lopes et al., 2007). Die Suturen reagieren auf diese Signale durch intramembranöses Knochenwachstum an den Rändern der Schädelplatten. Tritt eine frühzeitige Verknöcherung an zwei Knochenfronten innerhalb der Schädelnähte auf, spricht man von einer prämaturnen Nahtsynostose oder Kraniosynostose. Als Konsequenz wird ein weiteres Knochenwachstum verhindert, sodass das Neurokranium in dieser Region nicht mehr fähig ist, sich dem expansiven Wachstum des Gehirns anzupassen. Dies führt in der Regel zu einem kompensatorischen Wachstum des Schädels, das häufig mit kraniofazialen Dismorphien entsprechend der jeweiligen betroffenen Suture einhergeht (Opperman, 2000).

Die Prävalenz von Kraniosynostosen liegt bei 1:2.000 - 1:2.500 Lebendgeburten (Katsianou et al., 2016). Neben Schädeldeformationen können sie mit einem erhöhten intrakraniellen Druck, Beeinträchtigung des Sehvermögens und der Atemwege sowie neurologischen Schädigungen, wie verminderter geistiger Fähigkeit, assoziiert sein (Katsianou et al., 2016). Kraniosynostosen können sowohl isoliert, als auch syndromal, d.h. kombiniert mit weiteren klinischen Auffälligkeiten, vorliegen. Dabei handelt es sich häufig um skelettale Auffälligkeiten, bei denen insbesondere die Extremitäten betroffen sind. Diese Formen der Kraniosynostosen werden unter den Akrozephalo-Syndaktylien zusammengefasst. Dabei treten Kraniosynostosen gemeinsam mit Syndaktylien oder Polydaktylien auf. Häufige Syndrome dieser Gruppe stellen das Apert-, Crouzon-, Saethre-Chotzen- sowie das Pfeiffer-Syndrom dar (Messing-Jünger, 2018). Die überwiegende

Mehrheit der Kraniosynostosen tritt mit ca. 85 % isoliert auf (nicht-syndromal) (Heuze et al., 2014).

Die Morphogenese des Schädeldachs unterliegt einem sehr komplexen regulatorischen Netzwerk, das die Suturen, die osteogenen Fronten der Schädelknochen, die *Dura mater* und auch das Gehirn miteinschließen (Opperman et al., 2002, Opperman et al., 1995, Ogle et al., 2004, Wu and Gu, 2019). Klinische Studien konnten bereits eine Vielzahl an Genen identifizieren, die an der Pathogenese von Kraniosynostosen beteiligt sind und somit einen wertvollen Einblick in die Signalwege geben, die die Morphologie der Suturen und des Schädels steuern. Zu den wichtigsten Signalwegen, zählen der FGF-, TGF- $\beta$ -/BMP- und WNT-Signalweg. Eine Beeinträchtigung innerhalb dieser Signalwege kann zu einer verfrühten Fusion der Schädelnähte führen.

### **Der FGF-Signalweg**

FGFs (engl. *fibroblast growth factors*) sind Wachstumsfaktoren, die durch Bindung an die FGF Rezeptoren (FGFRs) viele verschiedene Signalwege steuern. Sie sind unter anderem an der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung beteiligt, sowie bei der Wundheilung und der Embryogenese. Studien in Mäusen konnten eine Expression von *FGFR1-3* während der Entwicklung der Schädelnähte nachweisen (Johnson et al., 2000, Kim et al., 1998). Mutationen in dem Liganden *FGF-9* sind beim Menschen mit Kraniosynostosen assoziiert (Rodriguez-Zabala et al., 2017). In der Maus führt eine Überexpression des Liganden *Fgf-2* zu Synostosen der Koronarnaht (Greenwald et al., 2001). Mutationen in den *FGF* Rezeptoren können mit einer Beeinträchtigung der Liganden-Bindedomäne einhergehen, die zu einer gestörten Rezeptoraktivität führt (Katsianou et al., 2016, Anderson et al., 1998, Yu et al., 2000). Verschiedene Punktmutationen in den *FGFRs* konnten mit der Entstehung von Kraniosynostosen in Verbindung gebracht werden. Mutationen in *FGFR2* sind ursächlich für die meisten Fälle des Apert-, Crouzon- und Pfeiffer-Syndroms, die mit Fusionen der Koronarnähte einhergehen (Katsianou et al., 2016). Mutationen in *FGFR1* sind ebenso mit dem Pfeiffer-Syndrom assoziiert (Muenke et al., 1994), während Mutationen in *FGFR3* mit dem Muenke-Syndrom einhergehen (Muenke et al., 1997). Der FGF-Signalweg spielt sowohl bei der intramembranösen als auch bei der chondralen Ossifikation eine wichtige Rolle (Marie, 2015). Dabei ist er bei der Regulation der Differenzierung von Mesenchymalen Zellen in Osteoblasten oder Chondroblasten beteiligt (Goetz and Mohammadi, 2013).

Studien in Zebrafischen konnten zeigen, dass der Fgf-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Knorpelgewebes im Kopf sowie bei der Morphogenese des Neurokraniums spielt (Walshe and Mason, 2003, McCarthy et al., 2016).

### **Der TGF- $\beta$ -/BMP-Signalweg**

In Mausmodellen konnten Oppermann et al. anhand verschiedener Studien in Organkulturen zeigen, dass die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 (engl. *transforming growth factor beta* 1-3) in den Suturen und der *Dura mater* exprimiert werden und dass TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 an der Regulation der Morphogenese der Suturen beteiligt sind (Opperman et al., 1999, Opperman et al., 2002, Opperman et al., 1998). Alle drei TGF- $\beta$ s konnten bei Ratten darüber hinaus im Bereich der Wachstumsfronten der Schädelplatten an vollständig ausgebildeten Suturen nachgewiesen werden (Opperman et al., 1997). Obwohl in vielen Studien gezeigt werden konnte, dass die TGF- $\beta$  Wachstumsfaktoren eine wichtige Funktion bei der Suturenentwicklung einnehmen, wurden bisher keine Mutationen mit der Entstehung von Kraniosynostosen im Menschen assoziiert. Mutationen in den Rezeptoren TGF- $\beta$ R1 und TGF- $\beta$ R2 hingegen konnten bei Patienten identifiziert werden, die neben kardiovaskulären und kraniofazialen Auffälligkeiten auch Kraniosynostosen entwickelten (Loeys et al., 2005).

BMPs (engl. *bone morphogenetic proteins*) gehören der TGF- $\beta$ -Superfamilie an und sind an der Regulation der Osteogenese beteiligt. Sie konnten mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert werden, darunter Skelett- und Gefäßerkrankungen (Katsianou et al., 2016). BMPs sind entscheidende Faktoren für die Morphogenese des Schädels (Foppiano et al., 2007) und können sowohl in offenen, als auch in fusionierten Suturen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Fusion der Schädelnähte spielen (Whitton et al., 2016, Kim et al., 1998). Mutationen in *MSX2*, einem Transkriptionsfaktor, der durch BMP aktiviert wird, sind mit syndromalen Kraniosynostosen assoziiert (Jabs et al., 1993).

### **Der WNT-Signalweg**

Die 19 Mitglieder der *WNT*-Familie kodieren für 350-400 Aminosäuren lange Glykoproteine (Wang et al., 2014). Der WNT-Signalweg gehört den evolutionär hoch konservierten Signalwegen an und ist unter anderem an der Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung, der Migration und der Morphogenese der

Neuralleistenzellen beteiligt (Logan and Nusse, 2004). Die Signalübertragung der WNT Proteine erfolgt über den kanonischen  $\beta$ -catenin Signalweg sowie über zwei nicht-kanonische Signalwege über die Freisetzung intrazellulären Kalziums und die planare Zellpolarität. Alle drei Signalwege sind in die Regulation der kraniofazialen Entwicklung involviert (Katsianou et al., 2016). In Mäusen führen Mutationen in den *Wnt3/Wnt9* Antagonisten und dem Co-Rezeptor *Lrp6* zu Spaltbildungen im Gesicht und einer abnormalen Entwicklung der Mittelgesichtsanatomie (Song et al., 2009). Eine Inaktivierung von  $\beta$ -catenin in Neuralleistenzellen geht in Mäusen mit schweren Störungen der kraniofazialen Entwicklung einher (Brault et al., 2001). Studien in Zebrafischen konnten nachweisen, dass die Wnt- und Bmp-Signalwege bei der Regeneration von Knochen involviert sind (Stewart et al., 2014, Wehner et al., 2014).

### 1.3 Die Transkriptionsfaktoren TCF12 und TWIST1

Die Transkriptionsfaktoren TCF12 und TWIST1 gehören der Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine an. Diese Proteine zeichnen sich durch das HLH-Motiv aus, welches aus einer basischen Arginin-/Lysin-reichen N-terminalen Sequenz besteht, gefolgt von zwei durch eine Schleifenstruktur (*loop*) miteinander verbundenen  $\alpha$ -Helices. Die basische Region ist für die Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors mit der DNA erforderlich, während das HLH-Motiv eine Dimerisierung mit anderen bHLH Proteinen vermittelt (Massari and Murre, 2000).

Die bHLH Proteine werden gemäß ihrer Gewebespezifität, ihres Dimerisierungspotentials und ihrer DNA-Bindespezifität in sieben Klassen unterteilt. Proteine der Klasse I, auch E-Proteine genannt, werden ubiquitär exprimiert und können sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden. Zu dieser Gruppe zählt neben TCF3 (E12, E47) und TCF4 (E2-2) auch TCF12. Die Bindungsspezifität von Klasse I bHLH Proteinen beschränkt sich auf E-Box-Motive mit der kanonischen Konsensus Sequenz CANNTG (Wang and Baker, 2015). Proteine der Klasse II, zu der unter anderem MYOD, NEUROD und TWIST1 zählen, zeigen eine gewebespezifischere Expression als Klasse I Proteine und dimerisieren bevorzugt mit E-Proteinen. Mit wenigen Ausnahmen, zu denen TWIST1 zählt, sind sie unfähig Homodimere auszubilden (Murre et al., 1989). Heterodimere bestehend aus Klasse I und Klasse II Proteinen können sowohl an kanonische als auch an nicht-kanonische E-Box Motive binden. Klasse III umschließt unter anderen die Transkriptionsfaktoren der MYC-Familie. Sie besitzen eine Leucin-Zipper Domäne,

angrenzend an die bHLH Domäne. Proteine der Klasse IV (MAD, MAX und MXI) bilden sowohl untereinander als auch mit Proteinen der MYC-Familie Dimere aus. Die Klasse V umfasst HLH Proteine, denen die basische Domäne fehlt, sodass eine DNA-Bindung der Heterodimere verhindert wird. Proteine dieser Klasse werden daher auch als ID Proteine (engl. *inhibitor of DNA-binding*) bezeichnet (Murre et al., 1994). Klasse VI Proteine zeichnen sich durch ein Prolin in der basischen Region aus, während Proteine der Klasse VII eine PAS (Per-Arnt-Sim) -Domäne am C-terminalen Ende des HLH Motivs besitzen (Massari and Murre, 2000).

### **TCF12**

TCF12 (auch bekannt unter HEB oder HTF4) wird als Mitglied der E-Protein Familie in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Bei Menschen und Mäusen konnte eine Expression unter anderem im Gehirn, dem Herzen, der Skelettmuskulatur, dem Thymus und der Niere nachgewiesen werden (Hu et al., 1992, Wu et al., 2012). TCF12 spielt in vielen entwicklungspezifischen Prozessen wie der Neurogenese (Ravanpay and Olson, 2008), der T-Zell Entwicklung (Barndt et al., 2000, Barndt et al., 1999), der Bildung des Mesoderms (Li et al., 2017) und auch der osteogenen Differenzierung (Yi et al., 2017) eine wichtige Rolle.

Bei der Maus konnten Mutationen in *Tcf12* mit der Entstehung von Hirntumoren assoziiert werden (Wu et al., 2012). Beim Menschen treten *TCF12* Mutationen gehäuft in glialen Tumoren auf und gehen mit einem aggressiveren Tumorwachstum einher (Labreche et al., 2015). Weitere Studien in Mäusen und Ratten zeigten, dass ein Verlust von *Tcf12* zu einer Reduktion der Gehirngröße führt (Ravanpay and Olson, 2008, Uittenbogaard and Chiaramello, 2002, Mesman and Smidt, 2017) und erst kürzlich haben Studien gezeigt, dass *Tcf12* eine entscheidende Rolle bei der osteogenen Differenzierung von Knochenmark-Stammzellen via der BMP und Erk1/2 Signalwege einnimmt (Yi et al., 2017). In verschiedenen Geweben bildet TCF12 mit unterschiedlichen HLH-Proteinen Heterodimere aus. Während der Knochenentwicklung bindet TCF12 bevorzugt an TWIST1 (Yi et al., 2017, Sharma et al., 2013), während der Gehirnentwicklung an NEUROD2 (Ravanpay and Olson, 2008) und bei der Muskelentwicklung an MYOD (Parker et al., 2006, Langlands et al., 1997). Diese unterschiedlichen Bindungsaffinitäten gewährleisten eine spezifischere Expression von TCF12 in unterschiedlichen Geweben.

Im Jahre 2013 konnten Sharma et al. *TCF12* Mutationen mit der Entstehung von Kraniosynostosen der Koronarnähte in Verbindung bringen (Sharma et al., 2013). Anhand von Exom Sequenzierungen von Kraniosynostose Patienten identifizierten sie 38 heterozygote Mutationen im *TCF12* Gen. In den nachfolgenden Jahren konnten viele weitere *TCF12* Mutationen bei Patienten mit uni- oder bilateralen Kraniosynostosen der Koronarnähte identifiziert werden (di Rocco et al., 2014, Goos et al., 2016, Goumenos et al., 2019, Le Tanno et al., 2014, Paumard-Hernandez et al., 2015, Piard et al., 2015, Yilmaz et al., 2019). Bei dem Großteil der nachgewiesenen Mutationen handelt es sich um Punktmutationen. Bei Mutationen im *TCF12* Gen können neben den Kraniosynostosen klinische Auffälligkeiten auftreten, die sich phänotypisch mit denen des Saethre-Chatzen-Syndroms überschneiden. Das klinische Bild des Saethre-Chatzen-Syndroms zeigt sich sehr variabel, geht jedoch in der Regel mit uni- oder bilateralen Fusionen der Koronarnähte einher, sowie mit Fehlbildungen der distalen Gliedmaßen (Polydaktylien, Brachydaktylien und Syndaktylien) (el Ghouzzi et al., 1997). Die Intelligenz ist bei den meisten Patienten normal, leichte bis schwere Entwicklungsverzögerung wurden vereinzelt beschrieben (Gallagher et al., 1993).

*TCF12* Mutationen gehen mit einer unvollständigen Penetranz von 50-60% einher (Paumard-Hernandez et al., 2015, Sharma et al., 2013). Bei wenigen Patienten konnte eine Lernschwäche oder autistische Störung nachgewiesen werden (Tammimies et al., 2015, Wilkie et al., 2017).

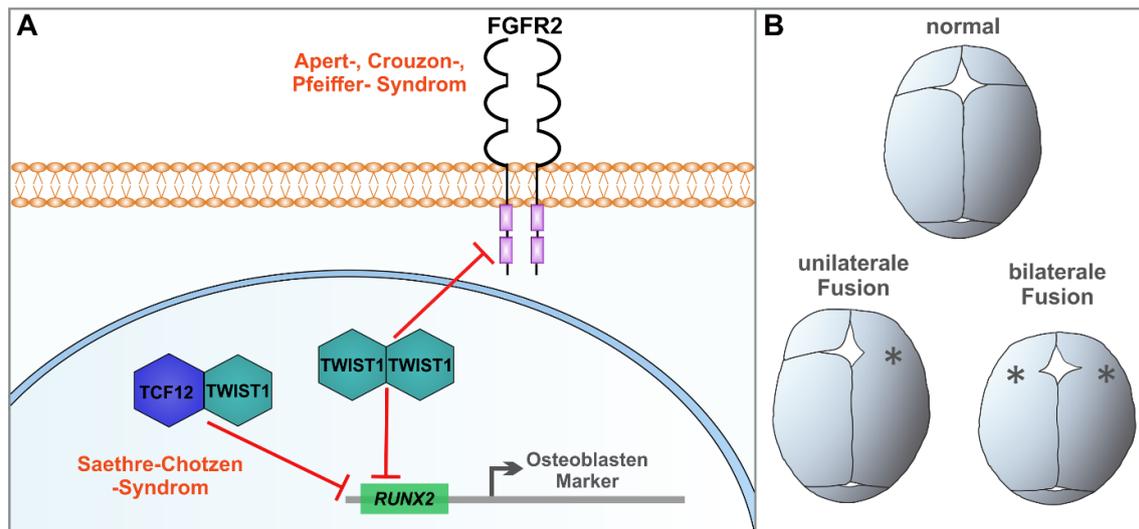
## **TWIST1**

TWIST1 ist ein multifunktionales Protein, das ebenso wie TCF12 an vielen verschiedenen entwicklungspezifischen Prozessen beteiligt ist. TWIST1 wurde erstmals in der Taufliege *Drosophila melanogaster* als wichtiger Faktor für die Gastrulation und die Bildung des Mesoderms identifiziert (Simpson, 1983, Thisse et al., 1987). Bei Säugern besteht die Funktion von TWIST1 in erster Linie darin, die Differenzierung mesenchymaler Zelllinien zu inhibieren, vor allem in Knochen und Muskelgeweben (Franco et al., 2011). In Mäusen wurde TWIST1 erstmals als Inhibitor der Myogenese und der Osteogenese beschrieben (Hebrok et al., 1994, Lee et al., 1999). *Twist1* Nullmutanten sind embryonal letal und zeigen einen fehlerhaften Verschluss des Neuralrohrs (Chen et al., 2007, Chen and Behringer, 1995).

Gemeinsam mit Mutationen in *FGFR2*, *FGFR3* und *EFNB1* zählen Mutationen in *TWIST1* zu den häufigsten Ursachen für Kraniosynostosen beim Menschen (Johnson and Wilkie, 2011). Mutationen in *TWIST1* sind, ebenso wie Mutationen in *TCF12*, mit dem Saethre-Chotzen-Syndrom assoziiert (siehe Abbildung 3). Eine Expression von *Twist1* konnte bei Mäusen innerhalb der osteogenen Fronten und der Suturen nachgewiesen werden (Johnson et al., 2000, Rice et al., 2000, Oshima et al., 2002). Nachfolgende Studien zeigten darüber hinaus, dass *TWIST1* innerhalb der osteogenen Front bevorzugt Homodimere ausbildet, während es innerhalb der Suturen vorrangig Heterodimere mit E-Proteinen ausbildet (Connerney et al., 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *TWIST1* Homodimere die Expression von *FGFR2* hemmen (Miraoui et al., 2010).

### **Das Zusammenspiel von *TCF12* und *TWIST1* während der Suturenentwicklung**

In Abbildung 3 ist der Wirkmechanismus von *TCF12* und *TWIST1* während der Entwicklung des Schädeldachs und der Schädelnähte gemäß dem heutigen Stand der Forschung abgebildet. Während eine Haploinsuffizienz von *TCF12* und *TWIST1* beim Menschen jeweils zu uni- oder bilateralen Koronarnahtsynostosen führt (siehe Abbildung 3B), zeigen Mäuse eine geringere Sensitivität gegenüber *Tcf12* und *Twist1* Mutationen. Sharma et al. stellten fest, dass ein heterozygoter Verlust von *Tcf12* in Mäusen nicht, wie beim Menschen, zu Fusionen innerhalb der Koronarnähte führt (Sharma et al., 2013). Ein heterozygoter Knockout von *Twist1* führt in Mäusen zu partiellen unilateralen Koronarnahtsynostosen (Sharma et al., 2013). Ein kombinatorischer Verlust von *Tcf12* und *Twist1* führt zu dem schwersten Phänotyp mit bilateralen Fusionen in den Koronarnähten der Mäuse. Infolgedessen gilt *Twist1* als wichtiger Interaktionspartner von *Tcf12* während der Entwicklung der Schädelnähte (siehe Abbildung 3A).

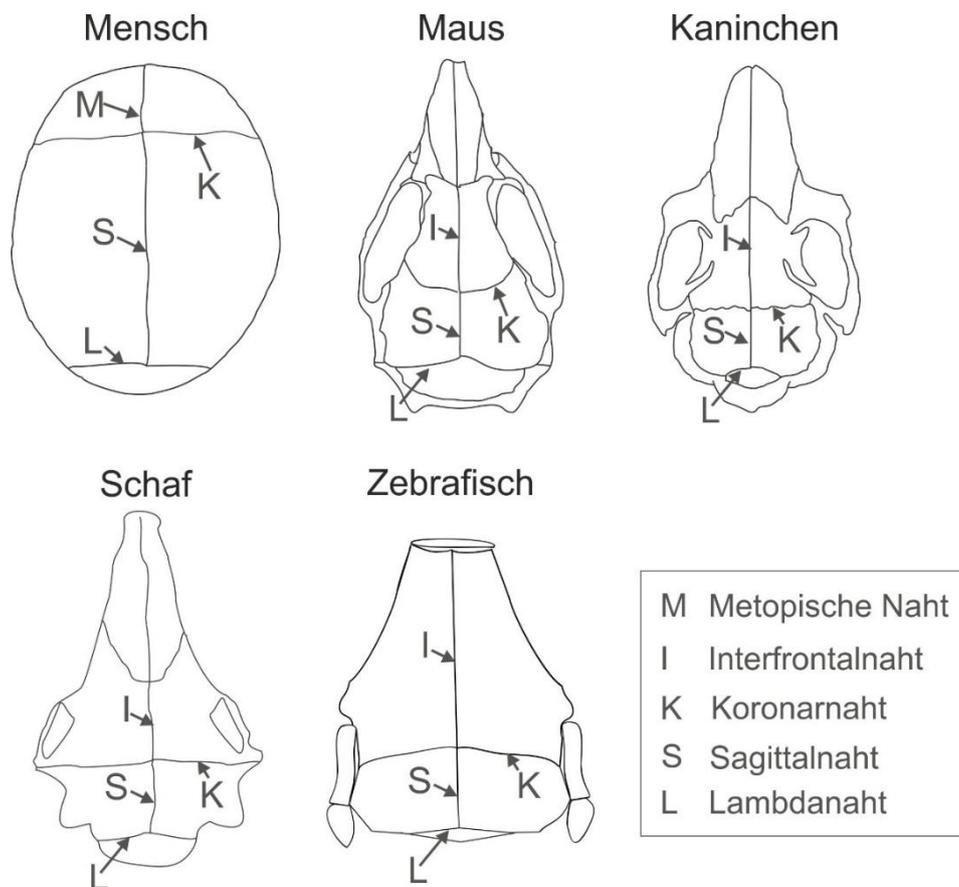


**Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Wirkmechanismus der Transkriptionsfaktoren TCF12 und TWIST1 während der Suturenentwicklung.**

(A) TWIST1 Homodimere inhibieren *RUNX2*, einen Masterregulator der Osteogenese. Studien in Mäusen legen die Vermutung nahe, dass auch TCF12/TWIST1 Heterodimere eine Hemmung von *RUNX2* regulieren (Sharma et al., 2013). TWIST1 wirkt ebenfalls hemmend auf den FGFR2-Signalmechanismus (Miraoui et al., 2010). Mutationen in *FGFR2* sind mit dem Apert-, Crouzon- und Pfeiffer-Syndrom assoziiert, Mutationen in *TWIST1* und *TCF12* mit dem Saethre Chatzen Syndrom. Eine Haploinsuffizienz von *TCF12* und *TWIST1* kann jeweils zu uni- oder bilateralen Fusionen der Koronarnähte führen (B). Die Sterne kennzeichnen jeweils die fehlende Koronarnäht.

## 1.4 Tiermodelle für die Suturenentwicklung

Die Signalwege, die die Suturenentwicklung steuern und auch die Physiologie der Suturen weisen eine hohe evolutionäre Konservierung auf (Teng et al., 2019, Rachwalski et al., 2019, Grova et al., 2012). Durch die Etablierung verschiedener Tiermodelle werden die Signalmechanismen, die bei der Entstehung von Kraniosynostosen involviert sind, fortwährend genauer untersucht. Neben den pathologischen Mechanismen konzentrieren Studien sich ebenfalls auf eine Untersuchung der normalen Morphogenese des Schädeldachs und der Schädelnähte. Zu den verwendeten Modellorganismen zählen neben der Maus auch Ratten, Schafe und Kaninchen, sowie Nichtsäugetiere wie Hühner, Frösche und der Zebrafisch. Dabei bringt jeder Modellorganismus unterschiedliche Vor- und Nachteile für die Studien an Kraniosynostosen mit. Im Folgenden wird eine Übersicht über bedeutende Studien in Mäusen, Kaninchen, Schafen und dem Zebrafisch zur Erforschung von Kraniosynostosen gegeben. Abbildung 4 zeigt eine Gegenüberstellung des Schädeldachs und der Schädelnähte der Modellorganismen Maus, Kaninchen, Schaf und Zebrafisch zu denen des Menschen.



**Abbildung 4: Vergleichende Übersicht der Anatomie des Schädeldachs und der Schädelnähte des Menschen und vier verschiedener Vertebraten, die als Modellorganismen für Kraniosynostosen dienen.**

Dargestellt ist eine dorsale Ansicht der Schädeldächer eines Menschen, einer Maus, eines Kaninchens, eines Schafs und des Zebrafisches. Die Lage der Schädelnähte ist jeweils gekennzeichnet. Die Abbildungen der dargestellten Schädeldächer entsprechen nicht den tatsächlichen Größenverhältnissen.

### Mäuse

Mäuse weisen eine große Ähnlichkeit hinsichtlich der kraniofazialen Entwicklung mit dem Menschen auf, was sie zu einem sehr beliebten Modellorganismus für Kraniosynostosen macht. Sie besitzen eine Interfrontalnaht, die zwischen den Frontalknochen gelegen ist und der metopischen Naht des Menschen entspricht. Darüber hinaus besitzen sie, ebenso wie der Mensch, zwei Koronarnähte, eine Sagittalnaht und eine Lambdanaht (siehe Abbildung 4). Ebenso wie die metopische Naht im Menschen verschließt sich auch der posteriore Teil der Interfrontalnaht bei Mäusen zwischen dem Embryonalstadium 7 und 12 (Lenton et al., 2005). Im Gegensatz zum Menschen verschließen sich die restlichen Suturen der Maus nicht.

Studien in Mäusen haben wesentlich zum Verständnis des Zusammenspiels verschiedener Faktoren und Signalwege bei der Verknöcherung der Schädelnähte beigetragen. So konnte die Bedeutung des TGF- $\beta$ - Signalwegs für die Aufrechterhaltung der Schädelnähte beispielsweise erstmals in Mäusen nachgewiesen werden (Mehrara et al., 2002, Opperman et al., 1999, Opperman et al., 2002) (siehe Kapitel 1.2).

Zahlreiche Knockout-Modelle wurden für verschiedene Gene generiert, die bei isolierten Kraniosynostosen identifiziert wurden. Darüber hinaus wurden im Laufe der Entwicklung ebenfalls Mausmodelle generiert, die mit den verschiedenen Kraniosynostose-Syndromen wie dem Apert (Wang et al., 2005), dem Crouzon (Carlton et al., 1998), dem Pfeiffer (Zhou et al., 2000) und dem Saethre-Chatzen Syndrom (Carver et al., 2002, Behr et al., 2011) assoziiert sind. Innerhalb der letzten Jahre wurden Mausmodelle zunehmend als Plattform zum Test neuer therapeutischer Strategien zur Heilung von Kraniosynostosen verwendet (Lee et al., 2019, Rachwalski et al., 2019). Ein Mausmodell für das Crouzon-Syndrom beispielsweise, welches durch *FGFR2* Mutationen hervorgerufen wird, wird als etabliertes Modell für molekulare und pharmakologische Tests zur Behandlung der Kraniosynostosen verwendet (Perlyn et al., 2006).

### **Kaninchen**

Kaninchen dienen bereits seit den 90er Jahren als Modellorganismen zur Untersuchung der Verknöcherung der Suturen. Verwendet wurde insbesondere ein Stamm einer reinweißen Kaninchenrasse (Weißer Neuseeländer), die von Mooney et al. gezüchtet wurde. Kaninchen dieses Stammes zeichnen sich durch kongenitale nicht-syndromale Koronarnahtsynostosen aus, die der Pathologie humaner Kraniosynostosen im Menschen entspricht (Mooney et al., 1996). Da Kaninchen im Verhältnis zu Mäusen und Ratten deutlich größer sind, eignen sie sich besonders für chirurgische Experimente. So haben Mooney et al. in Studien an den Kaninchen mit familiärer Kraniosynostose untersucht, ob die *Dura mater* eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Suturen spielt (2001). Dazu haben sie Kaninchen mit Koronarnahtsynostosen die *Dura mater* von wildtypischen Kaninchen transplantiert, nachdem die fusionierte Suturen operativ entfernt wurde. Als Resultat zeigte sich eine verringerte erneute Fusion dieser Nähte. Mit ihren Transplantations-Experimenten konnten sie zeigen, dass die *Dura mater* einen entscheidenden Beitrag zu der Aufrechterhaltung der darüber liegenden Suturen trägt. Darüber hinaus werden an Kaninchen neue Strategien erforscht, um die Risiken einer

postoperativen erneuten Fusion der betroffenen Schädelnaht zu minimieren (Grova et al., 2012).

### **Schafe**

Schafe werden vor allem für intrauterine Studien herangezogen. Sie besitzen, verglichen mit anderen Modellorganismen, eine vergleichsweise lange Trächtigkeitsdauer von 140 Tagen. Die Bildung des Schädeldachs erfolgt in fetalen Lämmern bereits sehr früh (Grova et al., 2012, Stelnicki et al., 1998a, Stelnicki et al., 1998b). Stelnicki et al. führten *in utero* Manipulationen an Lämmern durch, bei denen sie Teile der offenen Koronarnähte entfernten und in diese Regionen demineralisiertes Schafsknochen Pulver gaben, welches BMP-2 und TGF- $\beta$  enthielt. Bereits bei 90 Tage alten Föten konnte eine Fusion der Koronarnaht nachgewiesen werden. Bei 140 Tage alten Föten wurden charakteristische kraniofaziale Anomalien beobachtet, hervorgerufen durch die Koronarnahtfusionen (Stelnicki et al., 1998b). In Anlehnung an diese Studien wurden weitere Untersuchungen an Schafen durchgeführt, bei denen die Auswirkung von intrauterinen Wachstumseinschränkungen untersucht und neue therapeutische Ansätze verfolgt wurden (Bradley et al., 2000).

### **Zebrafische**

Obwohl die Schädelform des Zebrafisches auf den ersten Blick sehr unterschiedlich zu der des Menschen ist, zeigt sich eine große Ähnlichkeit in der Anatomie und der Morphologie des Schädeldaches und der Suturen (Kague et al., 2012, Grova et al., 2012). Der Zebrafisch besitzt ebenso eine Interfrontalnaht, zwei Koronarnähte, eine Sagittalnaht und eine Lambdanaht (siehe Abbildung 4). Im Zebrafisch bleiben die Suturen über das gesamte Leben hinweg offen. Dieser Zustand ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass der Zebrafisch sein Leben lang wächst. Auch die molekularen Signalwege sowie die zellulären Prozesse, die der Schädelentwicklung unterliegen weisen nachweislich eine hohe Konservierung bis hin zum Fisch auf (Topczewska et al., 2016, Quarto and Longaker, 2005). Obwohl Zebrafische dünnere Knochen als Landwirbeltiere besitzen, in denen weniger Osteozyten eingelagert werden, sind die in Kapitel 1.1 beschriebenen Mechanismen der Ossifikation von höheren Vertebraten bis hin zum Zebrafisch konserviert (Witten et al., 2017, Bergen et al., 2019).

Die Morphogenese des Schädeldachs von Zebrafischen wurde in verschiedenen Studien eingehend untersucht (Topczewska et al., 2016, Kague et al., 2012, Quarto and Longaker, 2005). Darüber hinaus sind nicht-invasive Methoden zur Visualisierung des Wachstums des Schädels über die Entwicklung hinweg bis hin zu einer zellulären Auflösung bereits etabliert (Bensimon-Brito et al., 2016, Walker and Kimmel, 2007). Knochenelemente können auf einfache Weise *in vivo* mittels fluoreszierender Farbstoffe wie Calcein (Du et al., 2001) und Alizarinrot (Adkins, 1965) sichtbar gemacht werden. Bildgebende Verfahren wie  $\mu$ CT Scans oder Spektral-Domänen-OCTs (SD-OCT) zur Untersuchung von Knochen- und Knorpelstrukturen konnten innerhalb des letzten Jahrzehnts für adulte Fische und Zebrafischembryonen adaptiert werden (Siccardi et al., 2010, Fieramonti et al., 2012, Carnovali et al., 2019).

Eine große Anzahl genetisch relevanter Zebrafisch Knockout Mutanten wurde bereits für verschiedenste Knochenerkrankungen wie Osteoporose (Bergen et al., 2019), Osteogenesis Imperfekta (Charles et al., 2017, Asharani et al., 2012) oder dem Stickler Syndrom (Lawrence et al., 2018) etabliert. Diese konnten bedeutend zu dem heutigen Verständnis der dynamischen Regulation der Knochenbildung und Mineralisierung sowie dem Knochenumbau beigetragen. Auch für Kraniosynostosen wurde der Zebrafisch bereits erfolgreich als Modellorganismus etabliert. Laue et al. konnten nachweisen, dass sowohl bei Menschen, als auch im Zebrafisch eine Mutation innerhalb des *cyp26b1* Gens, welches ein wichtiger Bestandteil des Retinolsäure-Signalwegs darstellt, zu kraniofazialen Fehlbildungen, einschließlich Fusionen innerhalb der Koronarnähte, führt (2011). Durch eine stetige Weiterentwicklung von Tools wie der CRISPR/Cas9 Technologie wird die Generierung neuer Tiermodelle für menschliche Erkrankungen immer effektiver und kostengünstiger, wodurch nicht nur die Grundlagenforschung bedeutend profitiert, sondern auch die Forschung und Entwicklung von Gentherapien.

## **1.5 Der Zebrafisch als Modellorganismus: genetische Modifizierungen**

Seit der Veröffentlichung des menschlichen Referenzgenoms im Jahre 2003 (Lander et al., 2001, International Human Genome Sequencing, 2004) konnten in kürzester Zeit spezifische Gene mit der Entstehung menschlicher Krankheiten verknüpft werden. Die genaue Funktion dieser Gene blieb jedoch trotz alledem oft unklar. Studien an

Modellorganismen haben das Wissen über die Funktionsweise und die Regulation vieler Gene maßgeblich vorangebracht. Der Zebrafisch ist aufgrund einer kurzen Generationszeit und seiner transparenten Embryonen ein beliebter Modellorganismus (Kimmel et al., 1995). Er gehört der Familie der karpfenartigen Fische (*Cyprinidae*) an und ist in langsam fließenden oder stehenden Gewässern in Pakistan, Nordindien, Nepal und Bangladesch beheimatet. Durch eine hohe Reproduktionsfähigkeit gehen aus jeder Verpaarung bis zu 300 Embryonen hervor. Die Entwicklung findet *ex utero* statt, was eine einfache Manipulation der Embryonen erlaubt. Diese entwickeln sich im Vergleich zu anderen Vertebraten sehr schnell und bereits 72 Stunden nach der Befruchtung sind bei Zebrafischen die wichtigsten Organe ausgebildet (Rissone and Burgess, 2018).

Seit den 80er Jahren wird der Zebrafisch als genetisches Modell zur Analyse der Funktion konservierter Gene verwendet (Streisinger et al., 1981). Insbesondere die Veröffentlichung des Zebrafischgenoms im Jahre 2013 hat die Effektivität der Erforschung genetischer Erkrankungen mit dem Zebrafisch erheblich begünstigt (Howe et al., 2013b). Für das Referenzgenom wurde der Fischstamm *Tübingen* verwendet, der weitläufig für die Identifikation von Mutationen genutzt wird, die die Embryogenese beeinträchtigen (Howe et al., 2013b, Haffter et al., 1996). Ca. 70% der menschlichen Gene besitzen mindestens ein orthologes Gen im Zebrafisch. Da es in den echten Knochenfischen (Teleostei) vor ca. 400 Millionen Jahren zu einer Genomduplikation kam, sind für viele orthologe Gene in Säugetieren zwei paraloge Kopien im Zebrafisch vorhanden (Hoegg et al., 2004, Meyer and Schartl, 1999, Meyer and Van de Peer, 2005). Die ersten erfolgreichen genetischen Studien mit dem Zebrafisch erfolgten durch Arbeiten, bei denen Chemikalien oder Insertionsmutagenese-Techniken zur Anwendung kamen (Haffter and Nusslein-Volhard, 1996, Golling et al., 2002, Varshney et al., 2013). Anschließend wurden Techniken entwickelt, mit denen Gen Knockdowns und eine gezielte Genomeditierung möglich wurden. Die ersten Knockdown Experimente wurden mit Morpholinos durchgeführt. Bei diesen handelt es sich um modifizierte Antisense Oligonukleotide, die nach einer Mikroinjektion in Zebrafischembryonen einen transienten dosisabhängigen Knockdown des Zielgens herbeiführen (Nasevicius and Ekker, 2000, Eisen and Smith, 2008, Bill et al., 2009). Durch die Verwendung von TALENs (engl. für *transcription activator-like effector nuclease*) (Huang et al., 2011, Sander et al., 2011) und Zink Finger Endonukleasen (Doyon et al., 2008, Meng et al., 2008) ließen sich

Mutationen erstmals zielgerichtet in das Genom des Zebrafisches und anderer Modellorganismen einbringen.

Im Jahre 2013 hat die Genomeditierung durch die Etablierung der CRISPR/Cas9 Technologie einen entscheidenden, transformierenden Fortschritt gemacht (Cong et al., 2013, Jinek et al., 2013, Doudna and Charpentier, 2014). Mit ihr wurde eine effizientere und kostengünstige Methode entwickelt, mit der sich Gene in menschlichen Zellen sowie in vielen anderen Zelltypen und Organismen genetisch modifizieren lassen.

Mit Hilfe dieser Technologien konnte der Zebrafisch als Modell zur Erforschung verschiedenster genetischer Erkrankungen wie Muskelerkrankungen (Bassett et al., 2003), Kardiomyopathien (Sehnert et al., 2002, Xu et al., 2002), Krebs (Amsterdam et al., 2009, Frazer et al., 2009) oder neurologischen Syndromen (Best and Alderton, 2008) etabliert werden. Darüber hinaus konnten aufgrund einer hohen Ähnlichkeit hinsichtlich der Physiologie und der Funktion des Skeletts und des Knochengewebes (siehe Kapitel 1.4) auch verschiedenste Zebrafischmutanten generiert werden, die das klinische Erscheinungsbild von Patienten mit Skeletterkrankungen widerspiegeln, wie Osteogenesis Imperfekta (Fisher et al., 2003), Osteoarthritis (Juryneć et al., 2018) oder Skoliose (Gray et al., 2014).

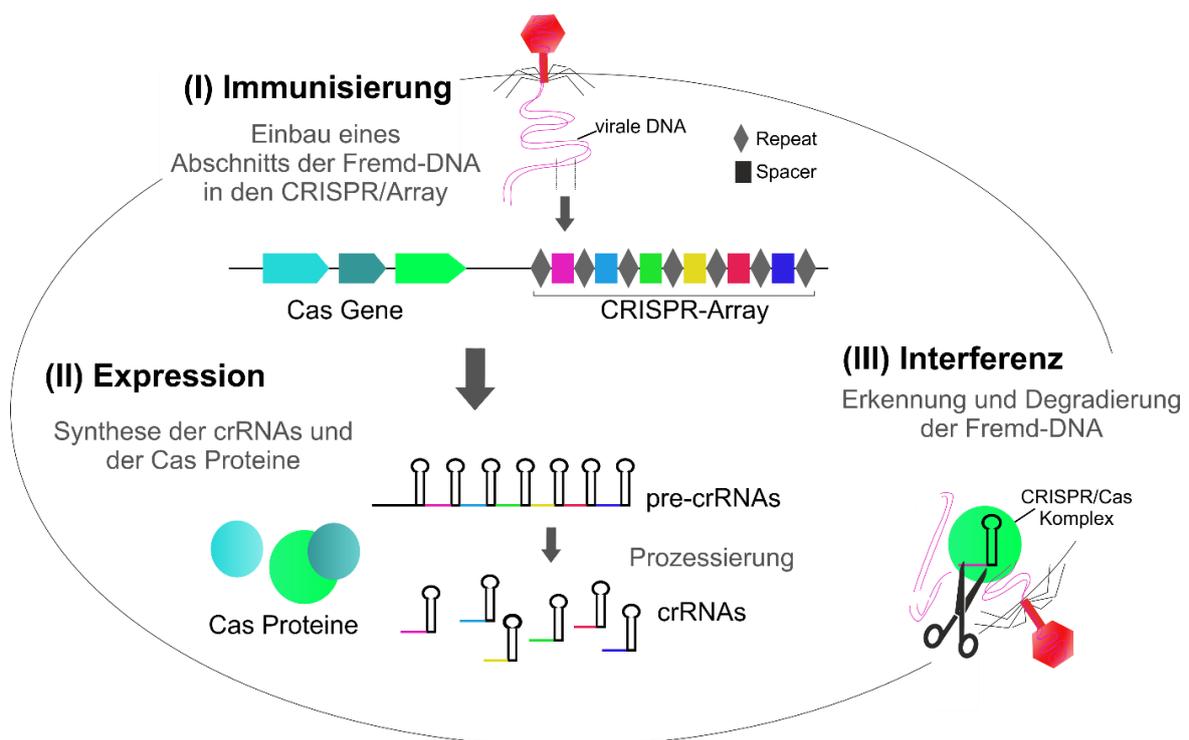
Im Folgenden werden die zwei in dieser Arbeit verwendeten Mechanismen zur Genomeditierung vorgestellt: das CRISPR/Cas9-System und die Transgenese.

### **1.5.1 Gen Editierung mittels CRISPR/Cas9**

Das CRISPR/Cas System ist ein adaptives Immunsystem, das Bakterien vor Viren und Plasmiden schützt. Der CRISPR-Lokus wurde zum ersten Mal im Jahr 1987 bei der Sequenzierung des Genoms von *E. coli* entdeckt (Ishino et al., 1987) und als repetitive DNA-Sequenzen (*Repeats*) beschrieben, die durch singuläre Sequenzen (*Spacer*) voneinander getrennt sind. Aufgrund der charakteristischen Struktur wurde der Lokus als *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) bezeichnet. Durch weitere Forschung konnten in den darauffolgenden Jahren homologe Sequenzen in weiteren Bakterien und Archaeen entdeckt werden (Groenen et al., 1993, Mojica et al., 1995, Masepohl et al., 1996). Im Jahre 2005 kamen mehrere Forschergruppen zu der Erkenntnis, dass die *Spacer*-Sequenzen Homologien zu DNA-Sequenzen aus dem Genom von Viren und Plasmiden aufweisen (Bolotin et al., 2005, Mojica et al., 2005, Pourcel et al., 2005). Zwei Jahre später konnten Barrangou et al. erstmals experimentell nachweisen,

dass es sich bei dem CRISPR/Cas9 System um ein erworbenes Immunsystem von Bakterien handelt, mit dem invasive Nukleinsäuren erkannt und eine Resistenz gegen die Fremd-DNA erworben wird (2007).

Die adaptive Immunabwehr der Bakterien erfolgt in drei Schritten: (I) Immunisierung; (II) Expression und Prozessierung der crRNAs (CRISPR-RNAs); (III) Interferenz (siehe Abbildung 5). Im ersten Schritt erfolgt der Einbau eines kurzen Abschnitts der invasiven DNA-Sequenz in den CRISPR-Array. Schritt zwei umfasst die Synthese der crRNAs durch Transkription einer Vorläufer-RNA (engl. *precursor crRNA*, pre-crRNA) von dem CRISPR-Lokus und die anschließende Prozessierung zu einer reifen crRNA, die komplementär zu Abschnitten der Fremd-DNA ist. Beim dritten Schritt bilden die crRNAs mit Cas-Proteinen (Endonukleasen) einen Ribonukleoprotein-Komplex aus, der die Fremd-DNA erkennt und über einen crRNA-vermittelten Mechanismus mittels Doppelstrangbrüchen degradiert (Doudna and Charpentier, 2014).



**Abbildung 5: Übersicht der drei Phasen des CRISPR/Cas Mechanismus.**

(I) Bei einer initialen Infektion durch einen Virus oder ein Plasmid werden DNA-Abschnitte (Spacer) der Fremd-DNA in den CRISPR-Array integriert. Die Spacer-Sequenzen werden von Repeatsequenzen flankiert. (II) Im nächsten Schritt erfolgt die Transkription der Vorläufer (engl. *Precursor*) crRNAs (pre-crRNAs) und deren Prozessierung zu individuellen reifen crRNAs. (III) Bei einer Zweitinfektion findet eine crRNA-vermittelte DNA-Interferenz statt. Der CRISPR/Cas Komplex erkennt und degradiert die Fremd-DNA.

Es wird zwischen drei verschiedenen CRISPR/Cas Systemen unterschieden, die sich anhand der beteiligten Cas-Proteine sowie der Erkennungssequenzen auf der Ziel-DNA unterscheiden (Makarova et al., 2011a, Makarova et al., 2011b). Bei den TypI und TypII Systemen spielt das *protospacer adjacent motif* (PAM), ein kurzes Sequenz-Motiv in unmittelbarer Nähe der Zielsequenz, eine entscheidende Rolle für die Erkennung und Bindung der invasiven DNA (Doudna and Charpentier, 2014, Mojica et al., 2005, Shah et al., 2013, Horvath et al., 2008). Während die TypI und TypIII Systeme einen großen Komplex aus Cas-Proteinen benötigen (Brouns et al., 2008, Haurwitz et al., 2010, Hale et al., 2009), wird für die RNA-gesteuerte Erkennung der Fremd-DNA des TypII Systems nur ein Cas-Protein benötigt (Jinek et al., 2012, Gasiunas et al., 2012). Diese Eigenschaft stellte sich als besonders vorteilhaft für den Einsatz der CRISPR/Cas Technologie für die Genomeditierung heraus, wodurch besonders das Typ II CRISPR System von *Streptococcus pyogenes* für die Genommodifikation Anwendung gefunden hat.

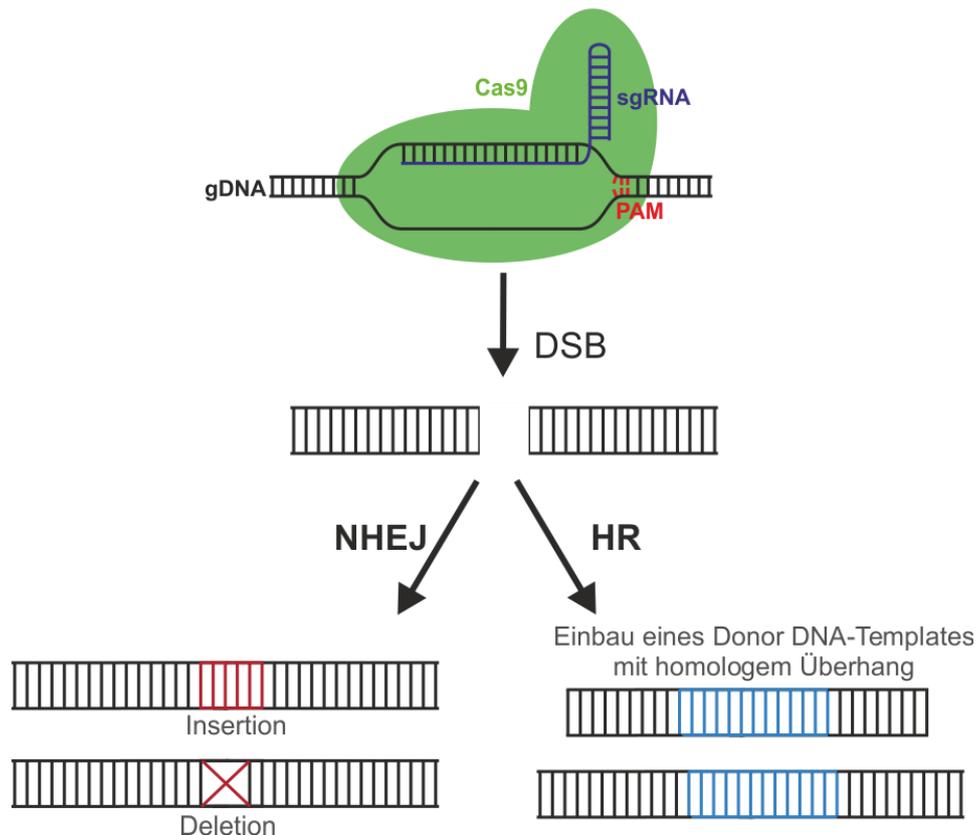
Bei dem CRISPR/Cas System von *S. pyogenes* bildet die crRNA gemeinsam mit einer *transactivating* CRISPR RNA (tracrRNA) einen Komplex aus (Deltcheva et al., 2011). Dieser tracrRNA:crRNA Duplex wiederum bildet einen Komplex mit dem Cas9 Protein aus und führt diesen zur Zielsequenz, die daraufhin von der Cas9 Endonuklease gespalten wird.

Auf der Grundlage des CRISPR/Cas-Systems entwickelten Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna ein effektives Werkzeug für zielgerichtete Genommodifikationen (Jinek et al., 2012). Sie fusionierten die crRNA und tracrRNA zu einer synthetischen *single guide* RNA (sgRNA) und modifizierten deren „*Spacer*“-Sequenz so, dass sie einen beliebigen genetischen Ziellokus erkennt und dort einen Doppelstrangbruch in die DNA einfügt. Die Besonderheit dieser Methode ist, dass für eine gezielte Editierung spezifischer Gensequenzen nur eine sgRNA und das Cas9 Protein benötigt werden, was die Methode nicht nur einfach, sondern auch besonders kostengünstig macht. Es ist daher nicht überraschend, dass die CRISPR/Cas9-Technik bereits wenige Monate nach der Veröffentlichung von Charpentier und Doudna von Wissenschaftlern auf der ganzen Welt auf verschiedene humane Zelllinien (Cong et al., 2013, Mali et al., 2013), Mäuse (Wang et al., 2013), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) (Friedland et al., 2013), den Zebrafisch (Hwang et al., 2013) und verschiedene Nutzpflanzen (Li et al., 2013a, Shan et al., 2013) angewandt wurde. Neben einzelnen sgRNAs ist es außerdem möglich, gleichzeitig multiple sgRNAs zusammen mit der Cas9 Endonuklease in Zellen oder Organismen

einzubringen. Auf diesem Weg können größere Deletionen in ein Zielgen oder multiple Mutationen simultan in mehrere Gene eingebracht werden (Li et al., 2013b, Wang et al., 2013, Jao et al., 2013, Cong et al., 2013, Ota et al., 2014).

Der mittels CRISPR/Cas9 eingebrachte Doppelstrangbruch kann von den Zellen anhand von zwei unterschiedlichen Mechanismen repariert werden: dem Nicht-Homologen End-Joining (NHEJ) und der Homologen Rekombination (HR) (Symington, 2014) (siehe Abbildung 6). Beim NHEJ werden kleinere Insertionen und Deletionen (Indels) in die Zielsequenz eingefügt. Diese gehen mit Deletionen oder Insertionen von Aminosäuren einher oder führen zu einer Leserasterverschiebung, die zum Einbau eines frühzeitigen Stopcodons innerhalb der cDNA-Sequenz des Ziel-Gens führen kann (Lieber, 2010, Hsu et al., 2013). Im idealen Fall führt die DNA Reparatur mittels NHEJ zu einem Funktionsverlust (engl. *Knockout*) des Gens. Die Reparatur des DSBs mittels HR beruht auf dem Einbau eines homologen Donor DNA-Templates in die Zielsequenz. Dieser Mechanismus kann genutzt werden, um zielgerichtet spezifische Punktmutationen oder sogar ganze Reportergene in die DNA-Sequenz zu integrieren (engl. *Knock-in*). Dazu werden neben der sgRNA und der Cas9 mRNA die gewünschten homologen Donor Templates Co-injiziert (Auer et al., 2014, Sander and Joung, 2014). Die in dieser Arbeit eingebrachten CRISPR Knockout-Mutationen wurden über den NHEJ-Mechanismus repariert.

## CRISPR/Cas9 induzierte Genomeditierung



**Abbildung 6: Funktionsweise der Genomeditierung mit dem CRISPR/Cas9-System.**

Der CRISPR/Cas9 Komplex wird von der sgRNA zur komplementären Ziel-DNA Sequenz geleitet. Die Cas9 Endonuklease erkennt das PAM-Motiv (5'-NGG-3') *downstream* der Zielsequenz und induziert einen DSB. Der DSB kann entweder über das Nicht-Homologe End-Joining (NHEJ) oder eine Homologe Rekombination (HR) repariert werden. Eine Reparatur mittels NHEJ resultiert in ungerichteten Insertionen oder Deletionen, die meist zu einem Verlust der Genfunktion führen (*Knockout*). Bei einer HR können mit Hilfe von Donor-Templates spezifische DNA Sequenzen in den Bereich des DSB integriert werden (*Knock-in*).

Studien an Zebrafisch Knockout-Mutanten haben das Verständnis verschiedener genetischer Krankheiten einschließlich Skelett- und Schädelkrankungen erheblich bereichert. So werden heute bereits *sp7* Knockout-Mutanten für die Erforschung von Osteogenesis Imperfekta (Kague et al., 2016), *col11a2* Mutanten für die Entstehung von Osteoarthritis (Lawrence et al., 2018) und *cyp26b1* Mutanten für die Auswirkung von Retinolsäure auf die Entstehung von Kraniosynostosen (Laue et al., 2011) verwendet.

Die schnelle Generierung von Knockoutmutanten mit der CRISPR/Cas9 Technologie erlaubte die Entwicklung groß angelegter Screenings zur Identifizierung neuer Kandidatengene für genetische Erkrankungen in Vertebraten. Shah et al. zeigten, dass mit der CRISPR/Cas9 Technologie in kürzester Zeit multiple Gen-Loci im Zebrafisch mutiert

und bereits durch Screenings in der F<sub>0</sub>-Generation nach bekannten pathogenen Phänotypen neue Gene identifiziert werden können, die in entwicklungspezifische Prozesse in Vertebraten involviert sind. Auch die phänotypischen Screenings für Mutanten werden kontinuierlich weiterentwickelt. So können Hörstörungen im Zebrafisch durch spezifische Hörreaktionstests untersucht werden (Bhandiwad et al., 2013), Kardiomyopathien durch standardisierte Quantifizierungen der Herztätigkeit (Hoage et al., 2012, Zhang et al., 2018) und skelettale Phänotypen durch MicroCT-basierte Phänotypisierungen (Hur et al., 2017) und automatisierte Hochdurchsatz Screenings mittels *Time-Gated Optical Projection Tomography* (TGOPT) (Fieramonti et al., 2012).

### **1.5.2 Transgenese mit dem Tol2 Transposon System**

Bei der Transgenese werden isolierte genetische Elemente (Transgene) in das Genom eines Organismus eingebracht. Auf diese Weise werden sogenannte transgene Tiere erzeugt. Werden die eingebrachten DNA-Elemente an die Nachkommen weitergegeben, spricht man von einer stabilen transgenen Linie. Transgene Modellorganismen eröffnen die Möglichkeit, maßgeschneiderte Tiermodelle für spezifische biologische Fragestellungen zu generieren. Die ersten transgenen Tiere wurden bereits in den 80er Jahren generiert, darunter Kaninchen, Schafe, Schweine (Hammer et al., 1985), Kühe (Roschlau et al., 1989), Ziegen (Denman et al., 1991) und Mäuse (Palmiter et al., 1982). Transgene Tiere sind ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung genetischer und entwicklungspezifischer Fragestellungen (Rocha-Martins et al., 2015, Gama Sosa et al., 2010), sowie für die Entwicklung pharmazeutischer Produkte (Bolon, 2004). Sie werden darüber hinaus im Bereich der Ökotoxikologie verwendet, um die Auswirkung von Chemikalien auf die Gesundheit zu untersuchen (Lee et al., 2015, Boverhof et al., 2011). In der Landwirtschaft finden transgene Tiere heute vor allem unter dem Aspekt der Ertragssteigerung und des Wachstums (Lai et al., 2006, Brophy et al., 2003, Damak et al., 1996, Leggatt et al., 2017) sowie der Resistenz gegenüber Krankheiten (Crittenden and Salter, 1990, Richt et al., 2007) eine sehr breite Verwendung.

Transgene Zebrafische finden insbesondere bei der Analyse der Expression von Genen Anwendung, die während der Entwicklung in Vertebraten eine entscheidende Rolle spielen. Die Transparenz der Zebrafischembryonen stellt einen besonderen Vorteil für die Transgenese dar, da sie eine Nachverfolgung der Entwicklung aller Zellen und im

weiteren Verlauf aller Organe von der befruchteten Eizelle bis zum adulten Tier ermöglichen.

Die ersten stabilen transgenen Zebrafischlinien wurden Ende der 80er Jahre generiert (Stuart et al., 1988, Stuart et al., 1990). In diesen Versuchen konnten Stuart et al. nachweisen, dass Plasmid-DNA, die in das Zytoplasma befruchteter Eizellen injiziert wird, in das Genom des Individuums integriert und an die Nachkommen weitergegeben wird (1988). In diesen Anfangszeiten war die Identifizierung der transgenen Tiere in der F<sub>1</sub>-Generation sehr aufwändig, da hunderte potentiell transgene Fische aufgezogen und anschließend mittels Southern Blot analysiert werden mussten. Mitte der 90er Jahre wurden mit den Genen *LacZ* und *GFP* die ersten Reporter-gen-Assays entwickelt, mit denen eine schnelle und kostengünstige Identifizierung der transgenen Tiere möglich war. Das Reporter-gen *LacZ*, das für eine  $\beta$ -Galactosidase kodiert, die mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid (*x-Gal*) nachgewiesen werden kann, fand als erstes Anwendung (Lin et al., 1994). Kurze Zeit später kam auch das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Reporter-gen zum Einsatz, das für seinen Nachweis kein exogenes Substrat benötigt und zudem deutlich sensitiver ist (Amsterdam et al., 1995). Infolgedessen hat sich das *GFP* als Reporter-gen für transgene Zebrafischlinien durchgesetzt.

Im Zuge dieser Arbeit wurden transgene *tcf12:EGFP* Zebrafischlinien generiert, mit denen die Expression des Gens *tcf12* über die Entwicklung hinweg nachverfolgt wurde (siehe Kapitel 3.1). Darüber hinaus wurden transgene Fische generiert, mit denen die Aktivität drei potentieller *tcf12* Enhancer Elemente untersucht wurde (siehe Kapitel 3.2).

Da durch Injektion einfacher Plasmid DNA oder bakterieller artifizierlicher Chromosomen (BACs) lediglich eine geringe Integrationsrate von 5-20% in das Genom erreicht werden kann (Stuart et al., 1988, Culp et al., 1991), wurden Methoden entwickelt, die eine höhere Integration garantieren. Zu diesen zählen retrovirale Vektoren und Transposons, die effizienter in das Host-Genom integriert werden können und darüber hinaus keine chromosomalen Rearrangements verursachen (Kawakami, 2005).

Als Transposons bezeichnet man kodierende DNA-Abschnitte, die innerhalb des Genoms ihre Position verändern können. Für die Generierung stabiler transgener Zebrafischlinien werden in erster Linie das *Sleeping Beauty* Transposon (Izsvak et al., 2000) und das Tol2-Transposon (Kawakami et al., 2000) verwendet. Das Tol2 Element wurde in dem japanischen Reifisch Medaka (*Oryzias latipes*) identifiziert und isoliert, in dem es eine

Mutation im Tyrosinase-Gen verursachte, die die Pigmentierung der Fische störte (Koga et al., 1996, Inagaki et al., 1998). *Tol2* ist 4,7kb lang und besteht aus zwei terminal invertierten Repeats (TIRs) variabler Länge, die das *Transposase* Gen flankieren (Koga, 2004, Munoz-Lopez and Garcia-Perez, 2010). Mit dem Tol2-System können über 10kb große DNA-Fragmente in das Ziel-Genom eingebracht werden (Balciunas et al., 2006). Transposon-basierte Vektoren werden neben dem Zebrafisch auch in vielen weiteren Modellorganismen verwendet, darunter dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Hamlet et al., 2006), der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Urasaki et al., 2008) und in Hühnern (Sato et al., 2007) sowie verschiedenen Zelllinien (Kawakami and Noda, 2004), darunter menschliche Stammzellen (Munoz-Lopez and Garcia-Perez, 2010). Zur Erzeugung der transgenen Linien im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls das Tol2-System verwendet.

### **Transgene Zebrafischmodelle für die Knochenentwicklung**

Um die komplexen Interaktionen verschiedener Gewebe und die ihnen zugrunde liegenden Signalwege während der Skelettentwicklung zu ergründen, wurden im Laufe der Jahre verschiedene transgene Zebrafischlinien generiert, die eine Nachverfolgung der Zellen des sich entwickelnden Skelettsystems über die Entwicklung hinweg erlauben (Bergen et al., 2019, Carnovali et al., 2019). DeLaurier und Kollegen generierten eine Reporterlinie für den Transkriptionsfaktor *sp7*, auch bekannt unter dem Namen Osterix, der als wichtiger Osteoblastenmarker gilt (2010). Mit dieser Linie konnten sie zum einen die Expression des Transkriptionsfaktors während der Skelettogenese nachweisen und zum anderen zeigen, dass *sp7* eine wichtige Rolle bei der Knochenregeneration spielt. Mit der transgenen Linien *smyhc:gfp*, die Muskelfasern markiert, und der *sp7:gfp* Reporterlinie gelang es Bergen et al. die endochondrale Ossifikation des Kiefers und die intramembranöse Knochenbildung des Operculums zu visualisieren (2019). Mit Knorpel-spezifischen Reporterlinien für *col2a1a* konnte eine gestörte Gewebeentwicklung bei Behandlung der Fische mit bestimmten Chemikalien nachgewiesen werden (Carnovali et al., 2019). Mit der Zebrafischlinie *sp7:EGFP* und der Medakalinie *osx:mCherry* lässt sich die Osteoblasten Differenzierung während der kraniofazialen Entwicklung auf zellulärer Ebene nachverfolgen (DeLaurier et al., 2010, Renn and Winkler, 2009). Paul et al. untersuchten mit Hilfe verschiedener Reporterlinien, darunter *runx2:GFP*, *sp7:GFP* und *osteocalcin:GFP*, das Zusammenspiel dieser Faktoren bei der Regeneration der Kieferknochen in WT Fischen und in *ihha<sup>hu2131</sup>*

Mutanten (2016). So konnten auch transgene Zebrafischlinien entscheidend zu unserem heutigen Verständnis der Physiologie und der Pathologie des Skeletts und der einzelnen Knochenelemente beitragen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe von Modellorganismen konnte unser Verständnis über die Entwicklung der Schädelnähte und der ihr zugrundeliegenden Regulationsmechanismen entscheidend bereichert werden. Durch neueste Methoden der Genomeditierung werden stetig individuelle Gen-Knockoutmodelle zur Untersuchung der Entstehung von Kraniosynostosen entwickelt. Das Ziel dieser Arbeit ist es, unter Verwendung des Zebrafisches als Modellorganismus, die Expression und Funktion des Transkriptionsfaktors *TCF12* und seinem Interaktionspartner *TWIST1* bei der Suturenentwicklung weiter aufzuklären. *TCF12* konnte im Jahr 2013 erstmals mit der Entstehung von Kraniosynostosen in Verbindung gebracht werden (Sharma et al., 2013). Durch Studien in Mausmodellen wird eine gemeinsame Regulation von *TCF12* und *TWIST1* während der Morphogenese des Schädeldachs angenommen. Da bisher nur wenig über die Expression von *TCF12* bekannt ist, soll diese im Zebrafisch untersucht werden. Dazu soll ein endogener Expressionsnachweis zunächst über PCR-Analysen und *Whole-mount RNA in-situ* Hybridisierungen erfolgen. Bei einem erfolgreichen Nachweis sollen für tiefergehende *in vivo* Expressionsstudien transgene *pcf12:EGFP* Reporterlinien generiert werden. Diese sollen die Expressionsorte von *pcf12* über die Entwicklung hinweg aufdecken, wobei ein besonderer Fokus auf der Morphogenese des Schädeldachs und der Suturen liegt.

Über die letzten Jahre hat sich der Zebrafisch als wertvolles Modell für *in vivo* Studien zur Identifizierung von hoch konservierten Elementen herausgestellt. Mit dem ZED-Vektor, einem Werkzeug, das für die schnelle und zuverlässige Analyse von Enhancer Elementen im Zebrafisch entwickelt wurde, sollen potentielle Enhancer von *TCF12* analysiert werden. Als Referenz soll die *pcf12:EGFP* Reporterlinie verwendet werden.

Neben Expressionsstudien sollen im Rahmen dieser Arbeit auch funktionelle Studien durchgeführt werden. Dazu soll der Zebrafisch als *in vivo* Modell für *TCF12* und *TWIST1* induzierte Kraniosynostosen etabliert werden. Um den Einfluss von *pcf12* und *twist1* auf die Suturenentwicklung im Zebrafisch zu untersuchen, sollen mit dem CRISPR/Cas9-

System verschiedene Knockout-Linien für die orthologen Zebrafisch Gene *tcf12*, *twist1a* und *twist1b* generiert werden.

Des Weiteren soll innerhalb dieser Arbeit ein Luciferase Reporter Assay entwickelt werden, mit dem sich die funktionellen Konsequenzen von *TCF12* Varianten in einem Zellkultursystem untersuchen lassen. Wenn in der molekulargenetischen Diagnostik von Kraniosynostose Patienten Genvarianten in *TCF12* identifiziert werden, ist eine Einstufung der Pathogenität basierend auf Datenbanken und Vorhersageprogrammen nicht immer eindeutig. Der Reporter Assay soll eine bessere Aussage über die funktionellen Konsequenzen der identifizierten Genvarianten erlauben. Zusätzlich sollen auch die mittels CRISPR/Cas9 induzierten Mutationen der Zebrafisch Knockout-Linien mit dem Reporter Assay funktionell untersucht werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Fischhaltung

Die Zebrafischembryonen stammen aus Eigenzuchten des Labors und gehören den Wildtyp (WT)-Stämmen *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup> (ZFIN ID: ZDB-GENO-121010-3) und AB an (siehe Abbildung 7). Zebrafische des Stammes AB zeichnen sich durch ein charakteristisches Muster von blauen und schwarzen horizontalen Streifen aus, welches durch drei verschiedene Pigmentzelltypen hervorgerufen wird: schwarze Melanozyten, gelbe Xanthophoren und reflektierende Iridophoren (Rawls et al., 2001). Die Zebrafische des Stammes *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup> hingegen besitzen keine Melanozyten und Iridophoren (White et al., 2008), wodurch sie optisch transparent sind und dadurch eine nicht- invasive Beobachtung der Skelettentwicklung zulassen.



**Abbildung 7: Vergleich von adulten Zebrafischen der WT-Stämme AB und *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup>**

Fische des Stammes AB besitzen Melanozyten, Xanthophoren und Iridophoren. Optisch transparente Fische des Stammes *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup> zeichnen sich durch einen Verlust von Melanozyten und Iridophoren aus. Maßstab 1cm.

Die Aufzucht und Haltung der Fische erfolgte bei 28,5°C gemäß Standardbedingungen nach Westerfield (2000). Die Entwicklungsstadien der Fische wurden nach Kimmel et al. bestimmt und im Folgenden als hpf (engl. *hours post fertilization*) und dpf (engl. *days post fertilization*) angegeben (Kimmel et al., 1995). Alle Experimente, die Versuchstiere einschließen, wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes

durchgeführt und von der Regierung von Unterfranken genehmigt (Genehmigungs-Nummern 55.2 2532-2-428 und 55.2 2532-2-13). Die Zebrafisch Knockout-Linie *tcf12*<sup>sa14175/+</sup> wurde von dem *Zebrafish International Resource Center* (ZIRC) unter der Linienbezeichnung sa14175 bezogen. Bereitgestellt wurden Individuen der F<sub>1</sub>-Generation, unter denen sich wildtypische Fische und Fische mit der Nonsense-Mutation c.66T>A (p.Tyr22\*) befanden.

### 2.1.2 Bakterienstamm

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) des Stammes DH5 $\alpha$  der Firma Life Technologies verwendet.

### 2.1.3 Reagenzien, Chemikalien und Puffer

1xPBS	Merck
5xDNA Loading Buffer	Bioline
5x Sequenzierpuffer	PerkinElmer
Acti-stain™ 488 Phalloidin	Cytoskeleton
Alizarinrot S	Sigma-Aldrich
Ammonium Acetate Stop Solution (mMESSAGE mMACHINE Kit)	Ambion/ Thermo Fisher Scientific
BigDye® Terminator	Applied Biosystems
Ethanol	Chemikalien Schellert
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	Affymetrix
Fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran	Sigma-Aldrich
FuGENE® HD Transfektionsreagenz	Roche
HDGreen Plus	Intas
Heparin	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems
HyperLadder™ 100bp	Bioline
HyperLadder™ 1kb	Bioline
KCl	Roth
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
LB-Medium	Roth
MEM-Medium	Sigma-Aldrich
Mowiol	Roth
NaCl	Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Roth
NBT/BCIP	Roche
OCT Medium	Sakura Finetek
Mango Taq DNA Polymerase	Bioline
Methanol	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd	Roth

Phenolrot	Roth
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Qiazol	Qiagen
RNase freie torula RNA	Sigma-Aldrich
Sheep Serum	Sigma-Aldrich
Tissue-Tek®Cryomold®	Sakura Finetek
Tris-HCl	Roth
Tris-Na-Citrat-Dihydrat	Merck
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich
Tween20	Roth

#### 2.1.4 Kit-Systeme und Reporter Assays

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega
FIREScript RT cDNA synthesis KIT	Solis Biodyne
GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich/Merck
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich/Merck
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich/Merck
Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific
Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific
MAXIscript™ T7 Transcription Kit	Ambion/ Thermo Fisher Scientific
mMESSAGE mMACHINE Kit	Ambion/ Thermo Fisher Scientific
RNeasy Mini Kit	Quiagen
TA Cloning™ Kit	Thermo Fisher Scientific

#### 2.1.5 Enzyme

<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase	NEB
Mango Taq DNA Polymerase	Bioline
Platinum Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Schientific
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
T4-DNA-Ligase	NEB

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden über die Firma NEB bezogen.

#### 2.1.6 Antikörper

Huhn $\alpha$ -GFP Antikörper, ab13970	Abcam
Alexa Fluor Ziege $\alpha$ -Huhn Antikörper, ab175477	Abcam

#### 2.1.7 Vektoren

<b>CRISPR/Cas9 Plasmidkonstrukte</b>	
pDR274	Addgene
pCS2-nCas9n	Addgene
<b>Tol2 Transgenese</b>	

pCS-TP	Kawakami Labor (Kawakami et al., 2004) ( <a href="http://kawakami.lab.nig.ac.jp/trans.html">http://kawakami.lab.nig.ac.jp/trans.html</a> )
<b>Gateway®-Klonierung</b>	
pDONR™221	Thermo Fisher Scientific
pDONRP4-P1R	Lawson Labor ( <a href="https://www.umassmed.edu/lawson-lab/">https://www.umassmed.edu/lawson-lab/</a> )
pENTR- <i>egfp</i>	
pTolR4R2pA	
<b>Dual-Glo Luciferase Assay</b>	
pGL4.27	Promega
pGL4.74	Promega
pIS14-TCF12 WT	Emmanuelle Huillard (Sorbonne Université, Paris)

### 2.1.8 Geräte und Materialien

96-Well Messplatte	Greiner Bio-One
ABI 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Deckgläser	Roth
Diamantmesser	Dianova
FemtoJet 4i Druckluftinjektor	Eppendorf
Injektionsnadeln	Harvard Apparatus
Janus Pipettierroboter	PerkinElmer
EM UC7 Mikrotom	Leica
MC170 HD Mikroskopkamera	Leica
Mikroinjektor FemtoJet and Microinjection 5242	Eppendorf
Mikromanipulator MM 33	Märzhäuser Wetzlar
Mithras LB 940 Luminometer	Berthold Technologies
PELCO Flacheinbettungsform	Plano
Pipetten	Brand
Pipettierroboter Typ Janus	Perkin Elmer
Reaktionsgefäße (0,2 und 1,5ml)	Eppendorf
S8 APO Stereomikroskop	Leica
Superfrost plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler Mastercycler nexus gradient	Eppendorf
Vakuumzentrifuge Concentrator plus	Eppendorf
Vertical Pipette Puller 720	Kopf
Wasserbad WNB 45	Memmert
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal
Zentrifuge Heraeus Fresco 21 centrifuge	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.9 Programme und Datenbanken

ATGpr	<a href="https://atgpr.dbcls.jp/">https://atgpr.dbcls.jp/</a>
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
CorelDraw X6 Graphics Suite (Corel Corporation)	

ECR Browser	<a href="https://ecrbrowser.dcode.org/">https://ecrbrowser.dcode.org/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
ImageJ (version 1.50g; Fiji bundle)	<a href="https://fiji.sc/">https://fiji.sc/</a>
Primer3Plus	<a href="https://primer3plus.com/">https://primer3plus.com/</a>
SnapGene	<a href="https://www.snapgene.com/">https://www.snapgene.com/</a>
VISTA Enhancer Browser	<a href="https://enhancer.lbl.gov/">https://enhancer.lbl.gov/</a>
Zfin	<a href="https://zfin.org/">https://zfin.org/</a>
ZiFiT Targeter Software	<a href="http://zifit.partners.org/ZiFiT/">http://zifit.partners.org/ZiFiT/</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Die Idee der PCR-Reaktion wurde von Kary Mullis im Jahr 1983 zum ersten Mal erdacht und im Jahr 1987 von ihm und seinem Kollegen Faloona veröffentlicht (Mullis and Faloona, 1987). Wie der Name sagt, handelt es sich bei der PCR um eine Kettenreaktion, bei der die Produkte des vorangegangenen Zyklus als Template für den nachfolgenden Zyklus dienen und die DNA-Fragmente somit exponentiell angereichert werden.

Zu den Hauptbestandteilen der PCR-Reaktion gehören die zu amplifizierende DNA-Sequenz, zwei flankierende Primer, die komplementär zur Zielsequenz sind, die DNA-Nukleotide, eine DNA-Polymerase und ein dazugehöriger Puffer. Die meist verwendete Polymerase ist die Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* abstammt. In dieser Arbeit wurde neben der Mango Taq DNA Polymerase und der Platinum Taq DNA Polymerase zusätzlich die Q5 High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Die Q5 High-Fidelity DNA Polymerase zeichnet sich durch eine 3'→5' Exonuklease Aktivität aus, mit der falsch eingebaute Mono Nukleotidbasen erkannt und ersetzt werden. Als weiteres Reagenz muss, sofern nicht im Puffer vorhanden, MgCl<sub>2</sub> zum Reaktionsgemisch zugegeben werden, welches als Co-Factor der Taq Polymerase dessen Aktivität erhöht.

Ein Standard PCR-Ansatz sieht wie folgt aus:

DNA-Template	1-3µl [50ng/µl]
5x Reaktionspuffer	5µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1µl
dNTP Mix (jede Base 2,5mM)	1µl
Forward Primer [10µM]	0,75µl
Reverse Primer [10µM]	0,75µl
Taq Polymerase	0,25µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 25µl

Die Thermocycler-Bedingungen für einen Standard PCR-Ansatz lauten wie folgt:

Temp.	Zeit	
94°C	5min	
94°C	20sek	35x
56°C	20sek	
72°C	20min	
72°C	1min	
4°C	∞	

Einer PCR-Reaktion liegen drei Schritte zugrunde, mit denen die DNA-Sequenz in einem zyklischen Prozess vervielfältigt wird: die Denaturierung, das Annealing und die Elongation. Die Denaturierung erfolgt bei 95 °C und dient der Auftrennung der DNA-Doppelhelix in ihre Einzelstränge. Für das Annealing wird die Temperatur auf 50-60°C herabgesetzt. Bei diesem Schritt binden die PCR-Primer an die für sie komplementären einzelsträngigen DNA-Abschnitte. Bei der Elongation wird die Temperatur wieder auf 72°C angehoben. Bei diesem Schritt synthetisiert die DNA-Polymerase von den Primern ausgehend die jeweils komplementären DNA-Stränge. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese überprüft.

### 2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Auftrennung von DNA Fragmenten. Die Proben werden in die Taschen eines Agarosegels geladen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe hin aufgetrennt. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wandern die Nukleinsäuren zur positiv geladenen Anode. Kürzere DNA Fragmente wandern schneller durch das Agarosegel, während lange Fragmente eine geringere Mobilität aufweisen und dadurch langsamer laufen, was eine Größenauftrennung der Fragmente zur Folge hat.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 0,8-1%igen TAE-Agarosegelen bei 120-150V. Für die Detektion der Fragmente im Agarosegel wurde der Fluoreszenzfarbstoff HDGreen Plus hinzugefügt. Als Ladepuffer diente ein 5x DNA Loading Buffer und als Größenstandard eine 100bp bzw. 1kb Hyper Ladder. Die Detektion der DNA erfolgte mittels Ultraviolettem Licht an einem Transilluminator.

### 2.2.1.3 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger, beruht auf der Kettenabbruch-Synthese, die im Jahr 1977 von Frederic Sanger und Alan Coulson entwickelt wurde und über die Zeit hinweg zahlreiche Modifikationen erfahren hat (Sanger et al., 1977). Eine DNA-Doppelhelix wird mittels PCR amplifiziert mit dem Unterschied, dass neben den vier Nukleotiden zusätzlich 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTP) dem Reaktionsansatz zugegeben werden. Sobald ein ddNTP eingebaut wird, stoppt die Polymerisationsreaktion (Kettenabbruch), da aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Die ddNTPs sind jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Die entstehenden Syntheseprodukte werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA Sequenz mit einem Laseranregungs- und Detektionssystem ermittelt.

Als Template für die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen dienten PCR Produkte. Diese wurden vor der Sequenzierungsreaktion mit Exonuklease I (Exo) und Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) verdaut (ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent), um überschüssige Primer und Nukleotide zu hydrolisieren.

Reaktionsansatz für den ExoSAP Verdau:

Komponenten	6,1µl Ansatz
PCR Produkt	1,5µl
Exonuklease I [10U/µl]	0,3µl
Shrimp Alkalische Phosphatase [1U/µl]	0,3µl
ddH <sub>2</sub> O	5,5µl

Thermocycler-Bedingungen für den Exo SAP Verdau:

Temp.	Zeit
37°C	30min
85°C	15min
95°	3min

Direkt im Anschluss wurde die Sequenzierreaktion angesetzt. Dazu wurden die folgenden Komponenten den Reaktionsansätzen zugesetzt:

Komponenten	3,4µl Ansatz
5x Sequenzierpuffer	2µl
Big Dye	1µl
Forward/Reverse Primer	0,3µl

Thermocycler-Bedingungen für die Sequenzierungs-PCR:

Temp.	Zeit	
96°C	2min	28x
96°C	20sek	
56°C	20sek	
60°C	3min	
60°C	10min	
4°C	∞	

Die Sequenzierungsreaktionen wurden anschließend über eine Ethanolfällung aufgereinigt, wodurch Salze und nicht eingebauten ddNTPs beseitigt werden. Pro Sequenzieransatz wurde der folgende Reaktionsansatz hinzugegeben:

Komponenten	3,4µl Ansatz
100mM EDTA, pH 8,0	2µl
3M Natrium-Acetat, pH 5,2	2µl
Glykogen [20mg/ml]	1µl
ddH <sub>2</sub> O	10µl

Die Ansätze wurden in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und mit 60µl kaltem EtOH (-20°C) versetzt. Anschließend wurden sie für 5min auf 4°C bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand abgehoben und 180µl 70% EtOH (RT) zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4°C für 5min bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand erneut abgenommen und das DNA Pellet für ca. 15min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 35µl Hi-Di Formamide gelöst und mit einem ABI 3130xl Genetic Analyzer sequenziert. Überschritt die Probenzahl 24 Proben, wurden die Ansätze alternativ mit einem Janus Pipettierroboter gefällt.

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Humane Zelllinien

Für die Luciferase-Reporter-Analysen wurden menschliche embryonale Nierenzellen der Linie HEK293T der Firma DSMZ verwendet.

### 2.2.2.2 Kultivierung von HEK293T Zellen

Die Kultivierung der adhärenenten HEK293T Zellen erfolgte in MEM-Medium +10% Fetales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS). Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Zum Teilen oder Überführen der Zellen wurden diese nach Abnahme des Mediums mit 10ml 1xPBS gewaschen und mit 2ml einer Trypsin-EDTA-Lösung für ca. 5min bei 37°C vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Nach der Trypsinierung wurden die Zellen mit 10ml neuem Medium vom Boden der Zellkulturflaschen gespült und durch Auf- und Abpipettieren separiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde im Anschluss mit frischem Medium in neue Zellkulturflaschen überführt.

### 2.2.2.3 Luciferase-Reporter-Analysen

Die Luciferase-Reporter-Analysen basieren auf der Messung des Lumineszenzsignals zweier verschiedener Luciferasen: der Firefly Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* und der Renilla Luciferase der Seefeder *Renilla reniformis*. Neben einem unterschiedlichen evolutionären Ursprung weisen beide Luciferasen außerdem verschiedene Enzymstrukturen und Substrate auf. Diese Unterschiede erlauben dem Dual-Glo® Luciferase Assay System eine einfache und schnelle Quantifizierung des Lumineszenz Signals beider Reportergene nacheinander in einem einzelnen Ansatz. Die erzeugte Lumineszenz ist dabei direkt proportional zur Enzymaktivität der Luciferase.

Die Aktivität der wildtypischen und mutierten *TCF12* Reportergen Konstrukte wurde durch Expression der Firefly Luciferase bestimmt, während die Renilla Luciferase als interne Kontrolle für die Effizienz der Zelltransfektion und das Zellwachstum diente.

### Zelltransfektion

Für jedes Experiment wurden  $1,5 \cdot 10^5$  HEK293T Zellen in 12-Well Platten eingesät und nach 24h mit dem FuGENE® HD Transfektionsreagenz gemäß Herstellerangaben transfiziert. Das Gesamtvolumen pro Transfektionsansatz betrug jeweils 50µl mit einer Gesamtkonzentration von 1,1µg. Die Kultivierung der Zellen bis zur Messung der Luciferase Aktivität erfolgte für 24h im Brutschrank (37°C).

Die jeweiligen Transfektionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Zellen ohne Transfektion	pIS14 0,77µg	pIS14 0,07µg	pIS14 0,07µg
	pGL427-Ebox-Luc 0,3µg	pGL427-Ebox-luc 0,3µg	pGL427-Ebox-luc 0,3µg
	PGL474-Renilla 0,03µg	PGL474-Renilla 0,03µg	PGL474-Renilla 0,03µg
		pIS14- <i>TCF12</i> -WT 0,7µg	pIS14- <i>TCF12</i> -Mutiert 0,7µg

Die Zellen in Ansatz 1 wurden nicht transfiziert und dienten somit als Wachstumskontrolle sowie als Kontrolle für die allgemeine Hintergrundlumineszenz bei der Luciferase Messung. Ansatz 2 diente als Negativ-Kontrolle für die Lumineszenz des pGL427-Ebox-Luc Reportervektors. Dieser enthält die cDNA-Sequenz der Luciferase. pIS14 ist ein Leervektor, welcher keine *TCF12* cDNA-Sequenz enthält. Als Positiv-Kontrolle diente Ansatz 3 mit dem Vektor pIS14-*TCF12*-WT, welcher die cDNA Sequenz von *TCF12* enthält. Ansatz 4 steht stellvertretend für alle Ansätze der zu testenden *TCF12* Mutationen und enthält den Vektor pIS14-*TCF12*-Mutiert mit der jeweiligen Mutation, welche mittels Mutagenese in den Vektor eingebracht wurde (siehe Kapitel 2.2.3.9). Bei den Co-Transfektions-Experimenten mit *TWIST1* wurden jeweils 0,35µg der pIS14-*TCF12* und pIS14-*TWIST1*-WT Vektoren eingesetzt, sodass die Gesamtkonzentration weiterhin 1,1µg betrug. Die Zellyse und Messung der Luciferase-Aktivität wurden mit dem Dual-Glo Luciferase Assay System nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### Messung der Luciferase Aktivität

Nach erfolgter Zellyse wurden je 20µl des Lysats in ein Well einer 96-Well Messplatte überführt und die Lumineszenzen mit einem Mithras LB 940 Luminometer gemessen. Im ersten Messschritt wurde nach Zugabe von 80µl des Luciferase Assay Reagent II und nach einer Inkubation für 2sek die Firefly Luciferase Aktivität für eine Dauer von 10sek bestimmt. Bei der zweiten Messung wurde nach Zugabe von 50µl des Stop&Glo Reagent und einer Inkubation von 2sek die Lumineszenz der Firefly Luciferase abgestoppt und die Aktivität der Renilla Luciferase ebenfalls über einen Zeitraum von 10sek gemessen.

### Auswertung der Luciferase Messungen

Der Quotient der beiden Messungen (Firefly Aktivität/ Renilla Aktivität) ergibt die relative Luciferase Aktivität der untersuchten Plasmidkonstrukte. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten in mindestens drei unterschiedlichen Experimenten. Der gemessene Hintergrund (Ansatz 1: Zellen ohne Transfektion) wurde bei der Negativkontrolle (Ansatz 2), der mutierten *TCF12* Plasmidkonstrukte (Ansatz 4) und der Positivkontrolle (Ansatz 3) jeweils rausgerechnet. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen zu gewährleisten, wurden alle Messungen jeweils ins Verhältnis zur Positivkontrolle (Ansatz 3: pIS14-*TCF12*-WT) gesetzt.

## **2.2.3 Klonierungsstrategien**

### **2.2.3.1 Kolonie-PCR**

Die Kolonie-PCR stellt eine schnelle und kostengünstige Methode dar, um innerhalb kürzester Zeit viele Kolonien auf eine erfolgreiche Klonierung hin zu screenen. Dazu werden Kolonien, die nach einer Transformation auf selektiven Agar-Platten gewachsen sind, mit einer sterilen Pipettenspitze „gepickt“ und zum „animpfen“ jeweils eines Standard PCR-Ansatzes verwendet (siehe 2.2.1.1). Die Plasmid-DNA dient dabei als Template für die PCR-Reaktion. Die PCR-Produkte wurden entweder mittels Agarose-Gelelektrophorese und/oder über eine DNA-Sequenzierung überprüft (siehe Kapitel 2.2.1.2 und 2.2.1.3).

### **2.2.3.2 Restriktionsverdau**

Zur Analyse von Plasmiden und für die Klonierung mit Restriktionsschnittstellen wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen fragmentiert. Diese Enzyme spalten die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Für einen typischen Restriktionsverdau wurden 1µg DNA und 10U des Enzyms eingesetzt und gemäß den Herstellerangaben verfahren.

### **2.2.3.3 Ligation**

Bei einer Ligation werden DNA-Fragmente mit Hilfe einer Ligase enzymatisch miteinander verknüpft. Die DNA-Ligase erzeugt dabei eine kovalente Bindung von 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Termini der beiden DNAs. Mit einer Ligation wurden die zuvor durch Restriktionsverdau generierten Schnittstellen in DNA-Fragmenten (Inserts)

und Plasmiden miteinander verknüpft. Die Ligation erfolgte mit einer T4-DNA-Ligase gemäß den Angaben des Herstellers.

#### 2.2.3.4 Transformation

Die Transformation dient der Vervielfältigung von Plasmiden in chemisch kompetenten Bakterien. Dazu wurden 10-150ng Plasmid zu 70µl *Dh5α E. coli* Bakterien gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu gewährleisten, wurde der gesamte Ansatz einem Hitzeschock für 90sek bei 42°C ausgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 2min auf Eis abgekühlt, 1ml LB-Medium hinzugegeben und die Kultur für 90min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden schließlich bei 2500g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet im verbleibenden Medium resuspendiert. 60µl der Resuspensionslösung wurden auf LB-Agar-Selektionsplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

#### 2.2.3.5 Klonierung der CRISPR/Cas9 Plasmidkonstrukte

Für die Mutagenese der Gene *pcf12* und *twist1a/b* im Zebrafisch wurde das CRISPR/Cas9-System verwendet. Potentielle DNA-Zielsequenzen in kodierenden Bereichen dieser Gene wurden mit Hilfe der ZiFiT Targeter Software des Zinc Finger Consortiums identifiziert (Sander et al., 2010, Sander et al., 2007). Bei der Generierung von Knockout-Linien mit dem CRISPR/Cas9 System muss die Zielsequenz für die sgRNA einige Anforderungen erfüllen: zum einen muss sie am 3'-Ende das sogenannte *protospacer adjacent motif* (NGG) aufweisen, zum anderen wird am 5'-Ende ein GG-Dinukleotid für die Transkription der sgRNA mit der T7 RNA Polymerase benötigt, sodass die Zielsequenz dem Motiv 5'-GG-N<sub>18</sub>-NGG-3' entsprechen muss (Hwang et al., 2013, Jinek et al., 2012).

Mit dem Tool BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) wurde sichergestellt, dass keine weiteren ähnlichen Zielsequenzen im Genom vorliegen, die zu unerwünschten Mutationen, sogenannten *off target effects* (deutsch: Nicht-Ziel-Effekte) führen. Die Oligonukleotid-Sequenzen für die Herstellung der sgRNAs (engl. *single guide RNAs*) sind in Anhang A gelistet. Die Oligonukleotide wurden entsprechend dem folgenden Reaktionsansatz hybridisiert:

Komponenten	45µl Ansatz
Oligonukleotid 1	3µl
Oligonukleotid 2	3µl
ddH <sub>2</sub> O	39µl

Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler von 95°C auf 25°C abgesenkt in -5°C/2min Inkubationsschritten. Die miteinander hybridisierten Oligonukleotide wurden in den Vektor pDR274 einkloniert. Dazu wurde der Vektor zunächst mit dem Restriktionsenzym BsaI linearisiert. Der gesamte Restriktionsansatz (50µl) wurde anschließend auf ein 0,8% TAE-Agarosegel aufgetragen und die entsprechende Vektorbande (2147bp) ausgeschnitten und über das GenElute™ Gel Extraction Kit aufgereinigt. 5µl der hybridisierten Oligonukleotide wurden mit 45µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in folgendem Ansatz in den linearisierten pDR274 Vektor ligiert:

Komponenten	5µl Ansatz
pDR274 Vektor	1,5µl
hybridisierte Oligonukleotide	2,5µl
T4 DNA- Ligase Puffer	0,5µl
T4 DNA- Ligase	0,5µl

Die Ligation erfolgte für 2h auf RT. Der gesamte Ligationsansatz wurde anschließend in chemisch kompetente *Dh5α E. coli* Bakterien transformiert und über Nacht auf Kanamycin LB-Agarplatten selektioniert (siehe Kapitel 2.2.3.4). Mittels Kolonie-PCR wurden positive Kolonien anhand ihrer Bandengröße (ca. 310bp) auf einem 1% TAE-Agarosegel detektiert und von mindestens drei positiven Kolonien über Nacht Kulturen angesetzt, die am folgenden Tag mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit isoliert wurden. Im Anschluss wurde eine korrekte Sequenz der pDR274-CRISPR Plasmide (mit entsprechendem Insert) über eine Sanger-Sequenzierung bestätigt. Eine Vektorkarte der pDR274-CRISPR Plasmide befindet sich in Anhang C.

#### In vitro Transkription der sgRNAs

Für die Herstellung der sgRNAs wurde eine *in vitro* Transkription durchgeführt. Dafür wurden die pDR274-CRISPR Plasmide zunächst mit dem Restriktionsenzym DraI linearisiert und die linearisierten Plasmide über ein GenElute™ PCR Clean-Up Kit aufgereinigt. Die gRNAs wurden mittels MAXIscript™ T7 Transcription Kit nach Herstellerangaben synthetisiert und anschließend über eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

Zu dem gesamten sgRNA-Ansatz (20µl) wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß 115µl Nuklease-freies ddH<sub>2</sub>O und 15µl Ammonium Acetate Stop Solution gegeben. Der Ansatz wurde gevortext, 150µl Phenol und 150µl Chloroform hinzugegeben, erneut gevortext und für 5min bei 14000g auf 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde

abgenommen und in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, die Zwischenphase und die Phenolphase wurden verworfen. Es wurden erneut 150µl Chloroform hinzugegeben, der Ansatz gevortext, für 5 min bei 14000g auf 4°C zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und in eine neues Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 150µl Isopropanol hinzugegeben, der Reaktionsansatz gemischt und für 30min auf -20°C inkubiert. Der Ansatz wurde für 15 min bei 4°C auf maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das RNA-Pellet wurde in 25µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und die sgRNAs auf -20°C gelagert.

### Cas9 mRNA Synthese

Die Cas9 mRNA wurde aus dem Vektor pCS2-nCas9n hergestellt. Dazu wurde der Vektor zunächst mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert und der gesamte Ansatz auf ein 0,8% TAE-Agarosegel aufgetragen. Die entsprechende Vektorbande (ca.8200bp) wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und über das GenElute™ Gel Extraction Kit aufgereinigt. Die Cas9 mRNA wurde mit Hilfe des mMESSAGE mMACHINE Kits und der SP6 RNA Polymerase nach Herstellerangaben *in vitro* aus dem aufgereinigten pCS2-nCas9n Vektor transkribiert und über das RNeasy Mini Kit aufgereinigt. Die Cas9 mRNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **2.2.3.6 Gateway®-Klonierung der *ptcf12:EGFP* Reporter-gen-Konstrukte**

Die *ptcf12:EGFP* Reporter-gen-Konstrukte wurden mittels Gateway-Klonierung hergestellt. Die Gateway-Technologie (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific) stellt eine hoch effiziente und schnelle Klonierungsmethode dar und ist unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Die Methode beruht auf dem natürlich vorkommenden Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ, das dazu dient, seine DNA in das Genom des Bakteriums *E. coli* zu integrieren. Dieser reversible Integrationsprozess wird von zwei Enzymen katalysiert: der Integrase des Bakteriophagen λ und dem *E. coli* Protein IHF (*Integration Host Factor*). Die Rekombinations-Reaktion benötigt spezifische Rekombinationsstellen, sogenannte *attachment sites* (*att*-Stellen), zwischen denen die zu übertragenden DNA-Abschnitte eingefügt werden. Die Gateway-Klonierung besteht im Wesentlichen aus zwei Reaktionen: der BP-Reaktion und der LR-Reaktion. Bei der BP-Reaktion wird ein PCR-Produkt mit integrierten *attB*-Stellen in einen Eingangsvektor mit *attP*-Stellen rekombiniert. Die hierbei neu entstandenen Rekombinationsstellen des

Eingangsvektors werden als *attL*-Stellen bezeichnet. Bei der LR-Reaktion findet eine Rekombination zwischen den *attL*-Stellen der Eingangsvektoren mit den *attR*-Stellen des Zielvektors statt.

#### Amplifikation der *tcf12* Promotersequenz

Im ersten Schritt wurde eine ca. 2,1kb lange Sequenz unmittelbar 5' des Transkriptionsstartpunktes von *tcf12* (Ensembl: *tcf12-201* ENSDART0000009938.11 Dr11) aus genomischer Zebrafisch DNA über eine Gradienten-PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer besaßen spezifische *attB4*- und *attB1R*- Rekombinationsstellen, die Sequenzen sind in Anhang A gelistet. Die PCR-Reaktion wurde mit der Q5 High-Fidelity DNA Polymerase gemäß den Herstellerangaben angesetzt. Die Thermocycler-Bedingungen für die Gradienten-PCR lauteten wie folgt:

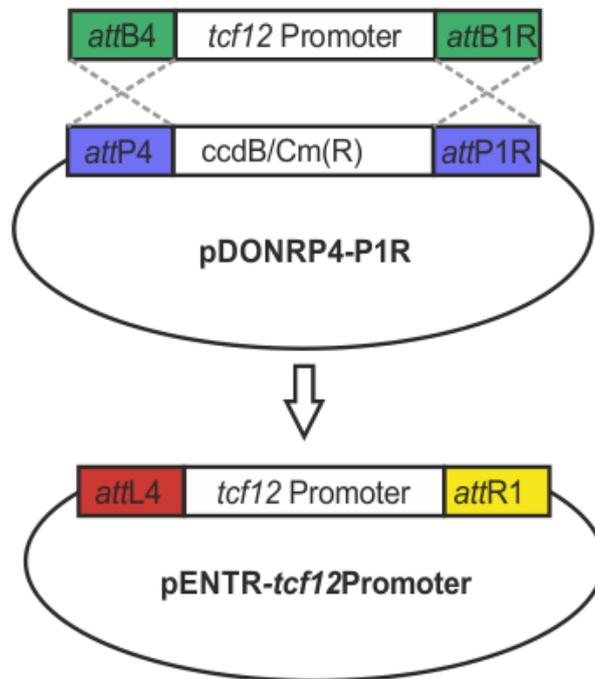
Temp.	Zeit	
98°C	30min	35x
98°C	10sek	
50/ 53/ 56°C	20sek	
72°C	2min	
72°C	10min	
4°C	∞	

Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf ein 0,8% TAE-Agarosegel geladen, die entsprechende DNA-Bande ausgeschnitten und über das GenElute™ Gel Extraction Kit aufgereinigt.

#### BP-Reaktion zur Erzeugung des Eingangsvektors pENTR-*tcf12*Promoter

Bei der BP-Reaktion erfolgt ein Austausch des im Donor-Vektor pDONR P4-P1R enthaltenen *ccdB*-Gens gegen das amplifizierte PCR-Produkt. Der Donor-Vektor enthält *attP*-Rekombinationsstellen an den Enden des *ccdB*-Gens, welche spezifisch mit den *attB*-Stellen des PCR-Produkts rekombinieren. Die Rekombinations-Reaktion wurde mit dem Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Transformation erfolgte in chemisch kompetente *Dh5α E. coli* Bakterien (siehe 2.2.3.4) und die Selektion über Nacht auf Kanamycinhaltigen LB-Agarplatten. Positive Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR verifiziert. Von drei der positiven Kolonien wurden Über Nacht Kulturen angesetzt, die am folgenden Tag mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit isoliert wurden. Der mittels BP-Reaktion entstandene Eingangsvektor wird im Folgenden

als pENTR-*tcf12*Promoter bezeichnet. Die pENTR-*tcf12*Promoter Vektoren wurden im Anschluss mittels Sanger-Sequenzierung überprüft (siehe 2.2.1.3).



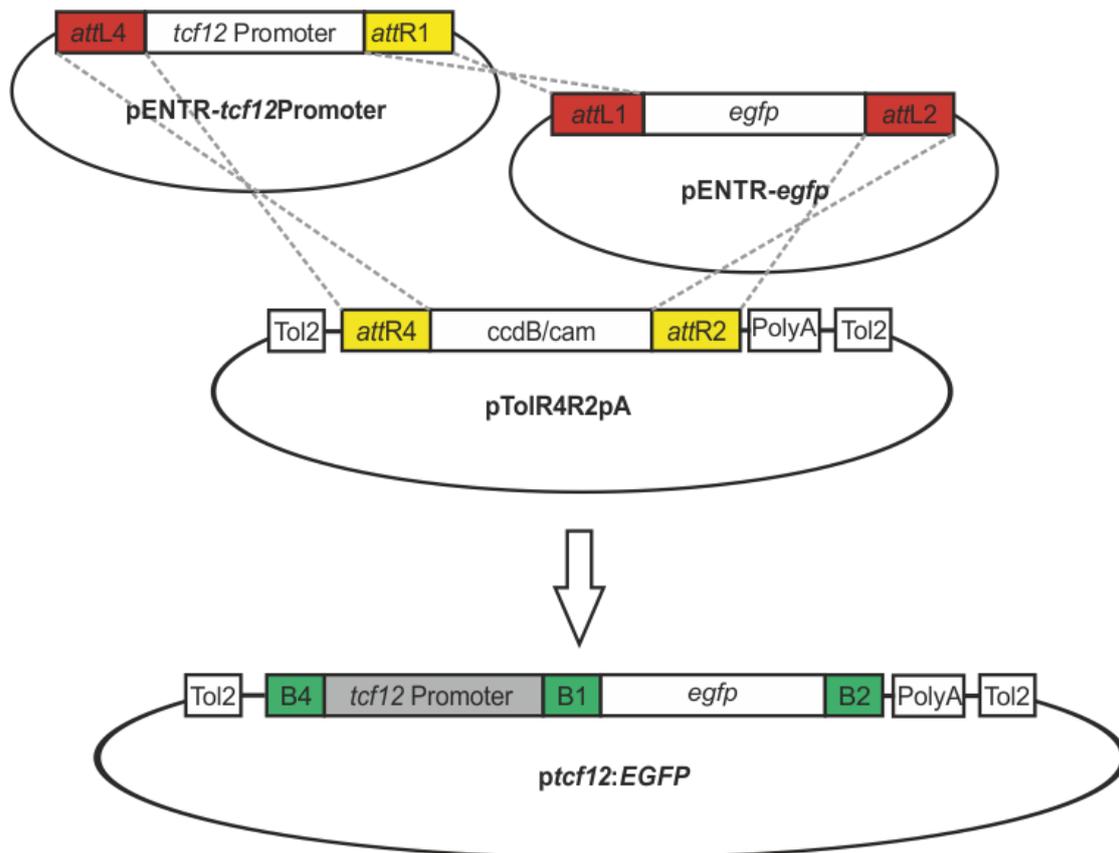
**Abbildung 8: Schematische Darstellung der BP-Reaktion zur Generierung des Eingangsvektors pENTR-*tcf12*Promoter**

Das PCR-Produkt, welches die *tcf12* Promoter-Sequenz enthält wird in den Donorvektor pDONRp4-p1R rekombiniert. Der neu entstandene Eingangsvektor wird als pENTR-*tcf12*Promoter bezeichnet.

#### LR-Reaktion zur Erzeugung des Expressions-Vektors *ptcf12:EGFP*

Mittels LR-Reaktion wurden die beiden Eingangsvektoren pENTR-*tcf12*Promoter und pENTR*egfp* in den Zielvektor pTolR4R2pA eingebracht, sodass der Expressions-Vektor *ptcf12:EGFP* entsteht. Der Vektor pENTR-*egfp* enthält das *enhanced* GFP (eGFP), eine molekularbiologisch modifizierte Variante des GFPs, dessen Fluoreszenz stärker ist als die des ursprünglichen GFPs. Der Zielvektor pTolR4R2pA enthält zwei Tol2-Transposonelemente, zwischen denen die Inserts der beiden Eingangs-Vektoren rekombinieren. Die Tol2-Transposonelemente können mittels Tol2 Rekombinasen ins Genom des Zebrafisches integriert werden, wodurch eine Etablierung transgener Zebrafischlinien ermöglicht wird (Kawakami, 2005). Bei der LR-Reaktion werden jeweils die *attL*-Sites mit den *attR*-Sites rekombiniert, wodurch im Expressions-Vektor erneut *attB*-Sites generiert werden. Die LR-Reaktion wurde mit dem Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Ansatz wurde in chemisch

kompetente *Dh5α E. coli* Bakterien transformiert und über Nacht auf Ampicillin-haltigen LB-Agaroseplatten selektioniert. Positive Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR verifiziert und in Über Nacht Kulturen auf 37°C schüttelnd inkubiert. Die Plasmide wurden über ein GenElute™ Plasmid Miniprep Kit präpariert und mittels Sanger Sequenzierung verifiziert.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der LR-Reaktion zum Erstellen des Expressions-Vektors *ptcf12:EGFP*.**

Die beiden Eingangsvektoren pENTR-*tcf12*Promoter und pENTR-*egfp* werden in den Zielvektor pTolR4R2pA rekombiniert, wodurch der Expressions-Vektor *ptcf12:EGFP* entsteht.

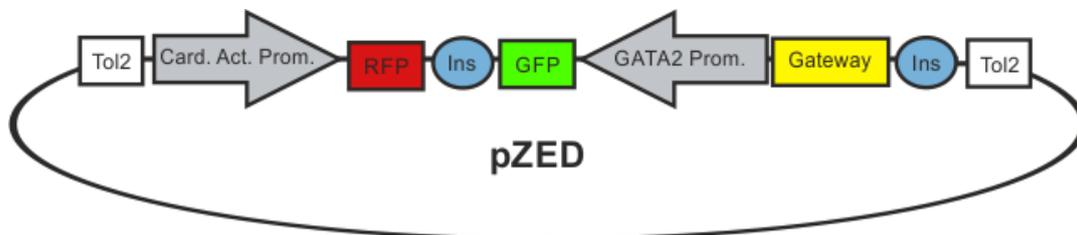
Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Restriktionsverdau des Expressions-Vektors *ptcf12:EGFP* zwei Vektoren generiert, die sich lediglich in der Sequenzlänge des *tcf12* Promoters unterscheiden. Durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *NheI* und *EcoRV* entstand der Vektor p-2.1*tcf12:EGFP*, der eine 2,1kb große *tcf12* Promoter-Sequenz besitzt, die das Reporter-gen *EGFP* treibt. Der zweite Vektor, p-0.2*tcf12:EGFP* entstand aus einem Restriktionsverdau des Ursprungsvektors *ptcf12:EGFP* mit den Enzymen *BbvCI* und *EcoRV* und besitzt eine 232bp große *tcf12* Promoter-Sequenz. Eine Vektorkarte der *ptcf12:EGFP* Vektoren befindet sich in Anhang C.

### Tol2 Transposase mRNA Synthese

Für die Synthese der Tol2 Transposase mRNA wurde der Vektor pCS-TP mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert (siehe 2.2.3.2). Die *in vitro* Transkription der mRNA erfolgte über das mMESSAGE mMACHINE kit und der SP6 RNA Polymerase. Die Tol2 mRNA wurde über das RNeasy Mini Kit aufgereinigt, mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **2.2.3.7 Gateway®-Klonierung der *ptcf12-CNE1-3* Reportergergen-Konstrukte**

Um die regulatorischen Fähigkeiten drei verschiedener CNE (engl. *Conserved Noncoding Elements*) Elemente *in vivo* im Zebrafisch zu testen, wurden die konservierten Bereiche mittels Gateway-Klonierung in den Vektor pZED (engl. *Zebrafish Enhancer Detection*) eingebracht (Bessa et al., 2009). Dieser Zielvektor besitzt Tol2-Stellen und eine *cardiac-actin:RFP* Kasette, die das rot fluoreszierende Protein (RFP) in den Muskeln treibt und als Effizienzkontrolle der Transgenese dient. Zusätzlich ist in den Vektor ein Minimalpromoter integriert, der *GFP* treibt und der Detektion der Aktivität der Enhancer-Elemente dient.



### **Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung des Vektors pZED (*Zebrafish Enhancer Detection*).**

Zum Nachweis der Enhancer-Aktivität besitzt der pZED Vektor einen Minimalpromoter (*GATA2* Prom), der das Reportergergen *GFP* treibt und dem eine Gateway-Eintrittsstelle vorgeschaltet ist. Diese Enhancer-Detektions-Kassette wird von Insulatorelementen (Ins) flankiert, welche Positionseffekte verhindern. Als interne Positivkontrolle der Transgenese dient ein Cardiac Actin Promoter, der RFP in den Muskelzellen des Zebrafisches treibt. Tol2-Transposase Erkennungsstellen (Tol2) erlauben eine Integration des Vektorkonstrukts in das Zebrafischgenom. Die Abbildung wurde verändert nach Bessa et al. 2009.

Im ersten Schritt wurden die drei CNE-Elemente mittels PCR-Reaktion aus gDNA des Zebrafisches amplifiziert. Die verwendeten Primer-Sequenzen mit den spezifischen *attB*-Rekombinationsstellen sind in Anhang A gelistet. Die Amplifikation erfolgte mit der Q5 High-Fidelity DNA Polymerase gemäß Herstellerangaben über eine Touch-Down PCR unter den folgenden Thermocycler-Bedingungen:

Temp.	Zeit	
98°C	3min	
98°C	20sek	x10 (-1°C/Zyklus)
65°C	30sek	
72°C	1min	
98°C	20sek	
55°C	30sek	x25
72°C	1min	
72°C	5min	
4°C	∞	

Die PCR Reaktionen wurden auf einem 1% TAE-Agarosegel überprüft, die DNA-Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und über ein GenElute™ Gel Extraction Kit aufgereinigt.

#### BP-Reaktion zur Erzeugung der Eingangsvektoren pDONR221-CNE1-3

Im nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte mittels Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix gemäß Herstellerangaben in den Eingangsvektor pDONR™221 rekombiniert. Die daraus resultierenden Vektoren werden als pDONR221-CNE1-3 bezeichnet. Die Transformation der Vektoren erfolgte in chemisch kompetente Dh5α *E. coli* Bakterien (siehe 2.2.3.4). Eine Selektion der Kolonien mit erfolgreich rekombinierten Vektoren erfolgte über Nacht auf Kanamycinhaltigen LB-Agarplatten. Von jeweils zwei der Kolonien wurden über Nacht Kulturen angesetzt, die am folgenden Tag mittels GenElute™ Plasmid Miniprep Kit isoliert wurden. Die durch die Rekombination entstandenen Vektoren wurden im Anschluss mittels Sanger-Sequenzierung überprüft (siehe 2.2.1.3).

#### LR-Reaktion zur Erzeugung des Expressions-Vektors *ptcf12*-CNE1-3

Bei der LR-Reaktion wurden die Eingangsvektoren pDONR221-CNE1-3 in den Zielvektor pZED rekombiniert, wodurch die Expressions-Vektoren *ptcf12*-CNE1-3 entstehen (Vektorkarten in Anhang C). Dazu wurde der Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix gemäß Herstellerangaben verwendet.

#### **2.2.3.8 TA-Klonierung der *in-situ* Hybridisierungs-Proben**

Die *tcf12* sowie die *twist1a/b* *in-situ* Hybridisierungs-Proben wurden mittels TA (Thymidin, Adenin) -Klonierung hergestellt. Bei dieser Klonierungsstrategie macht man sich die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase zunutze, einen Desoxyadenosin Überhang von

einer Base an das 3'-Ende eines PCR-Produkts zu hängen (Clark, 1988). Mit einer Standard PCR-Reaktion (siehe 2.2.1.1) wurden ca. 600bp der *pcf12* und *twist1a/b* cDNA-Sequenz amplifiziert. Die Primer-Sequenzen sind in Anhang A gelistet. Als DNA-Template diente cDNA, die aus Wildtyp Zebrafischen gewonnen wurde (siehe 2.2.4.3). Die PCR-Produkte wurden in den Vektor PCRII ligiert. Dieser Vektor besitzt 3' T-Überhänge, sodass PCR-Produkte mit komplementären A-Überhängen effizient in den Vektor ligiert werden können. Die PCR wurde mittels Touch-Down PCR unter folgenden Thermocycler-Bedingungen amplifiziert:

Temp.	Zeit	
98°C	3min	
98°C	20sek	x10 (-1°C/Zyklus)
65°C	30sek	
72°C	1min	
98°C	20sek	
55°C	30sek	x25
72°C	1min	
72°C	5min	
4°C	∞	

Die PCR Reaktionen wurden auf einem 1% TAE-Agarosegel überprüft und mittels GenElute™ PCR Clean-Up Kit aufgereinigt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem TA Cloning Kit gemäß dem Herstellerprotokoll in den PCRII Vektor inkloniert. Über eine Kolonie-PCR mit Sp6- und T7-Primern und anschließender Agarose-Gelelektrophorese wurden positive Kolonien, bei denen das Insert erfolgreich inkloniert wurde, anhand ihrer Größe identifiziert (siehe 2.2.3.1). Von drei der positiven Kolonien wurden Über Nacht Kulturen angesetzt, die am folgenden Tag mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit isoliert wurden. Die Vektoren wurden anschließend sequenziert (siehe 2.2.1.3).

#### Linearisierung der PCRII Plasmidkonstrukte

Neben komplementären RNA-Sonden (*antisense* Sonden) wurden als Negativkontrolle auch jeweils korrespondierende RNA-Sonden (*sense* Sonden) hergestellt, welche nicht an die Ziel-mRNA Sequenz binden können. Die Vektorkarten aller Plasmidkonstrukte befinden sich in Anhang C. Zur Herstellung der *antisense* und *sense* Sonden wurden die PCRII Plasmide zunächst mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Hind*II linearisiert. Pro

Ansatz wurden jeweils 3ng der Vektoren eingesetzt. Der vollständige Verdau wurde auf ein TAE-Agarosegel geladen und mittels GenElute™ Gel Extraction Kit aufgereinigt. Eine Vektorkarte der PCRII Plasmidkonstrukte befindet sich in Anhang C.

#### RNA-Proben Synthese mittels *in vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription der RNA-Proben wurde das DIG RNA Labeling Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden für die Herstellung der *sense* und *antisense* RNA-Sonden jeweils unterschiedliche RNA-Polymerasen verwendet (T7-/Sp6 Polymerase). Anschließend wurden die RNA-Proben mittels RNeasy Mini Kit aufgereinigt und in 50µl Rnase freiem ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Qualität der Proben wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde der gesamte Proben-Ansatz mit Hybridisierungs-Puffer auf 100µl aufgefüllt. Die RNA-Proben wurden auf -20°C gelagert.

#### **2.2.3.9 Zielgerichtete Mutagenese (*back-to-back* Primer Strategie) für Plasmide des Dual-Glo Luciferase Assay Systems**

Bei der zielgerichteten Mutagenese handelt es sich um eine Methode, mit der sich spezifische Veränderungen in doppelsträngige Plasmid-DNA einbringen lassen. Mit dieser Methode wurden die im Rahmen dieser Arbeit mittels Luciferase Assay untersuchten Mutationen (Punktmutationen, Insertionen, Deletionen) in den pIS14-*TCF12*-WT Vektor eingebracht.

Bei der zielgerichteten Mutagenese werden spezifisch konzipierte Primer erstellt, die die gewünschte Mutation enthalten und ansonsten komplementär zur DNA-Matrize des Plasmids sind. Die Primer werden so entworfen, dass ihre 5'-Enden Rücken-an Rücken angelagert werden (engl. *back-to-back*). Mit den spezifischen Primern wurde der pIS14-*TCF12*-WT Vektor mittels PCR-Reaktion amplifiziert. Die Primer-Sequenzen sind in Anhang A gelistet. Für die PCR Reaktion wurden die folgenden Komponenten eingesetzt:

Plasmid	2µl [10ng/µl]
5x Reaktionspuffer	10µl
dNTP Mix (jede Base 2,5mM)	4µl
Forward Primer [10µM]	2,5µl
Reverse Primer [10µM]	2,5µl
Q5 Polymerase	0,5µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 50µl

Die Reaktionsbedingungen für den Thermocycler lauteten wie folgt:

Temp.	Zeit	
98°C	30sek	25x
98°C	10sek	
Tm°C	30sek	
72°C	3min	
72°C	2min	

Um die wildtypischen Plasmide nach der Amplifikation aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde dieser mit der Endonuklease *DpnI* verdaut, welche methylierte DNA spaltet. Da die neu synthetisierten PCR-Produkte im Gegensatz zum Ursprungsvektor nicht methyliert sind, bleiben diese selektiv nach dem Endonuklease-Verdau im Reaktionsansatz zurück. Für den Verdau mit *DpnI* wurden 21,5µl des PCR-Ansatzes mit 1µl *DpnI* und 2,5µl Cut Smart Puffer für eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend für 20min bei 80°C abgestoppt. Die PCR-Reaktion wurde jeweils vor und nach dem *DpnI* Verdau auf einem 0,8% Agarose Gel kontrolliert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde anschließend über das GenElute™ PCR Clean-Up Kit aufgereinigt und nach einer Ligation in chemisch kompetente *Dh5α E. coli* Bakterien transformiert (siehe 2.2.3.3 und 2.2.3.4). Eine erfolgreiche Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR und anschließender Sequenzierung (siehe 2.2.3.1 und 2.2.1.3) bestätigt. Eine Vektorkarte der pIS14-*TCF12/TWIST1*-Konstrukte befindet sich in Anhang C.

### 2.2.3.9 Klonierung von Vektoren für das Dual-Glo Luciferase Assay System über Restriktionsschnittstellen

#### Klonierung von pGL427-Ebox-*TCF12*-Luc

Als bHLH-Transkriptionsfaktor bindet *TCF12* an E-Box-Motive mit der Nukleotidabfolge CANNTG. In ihren Studien konnten Hu et al. zeigen, dass *TCF12* eine besondere Affinität für die Sequenzabfolge CACCTG besitzt (1992). Über die Firma Eurofins Genomics wurde ein Genfragment bezogen, in dem die Konsensussequenz CACCTG in vier Wiederholungen mit jeweils 10 Nukleotiden Abstand vorliegt. An den Enden wurden dem Fragment zusätzlich die Nukleotid Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NheI* und *HindIII* eingefügt. Die gesamte 90bp lange Sequenz des Genfragments ist in Anhang A gelistet. Über die Restriktionsschnittstellen *NheI* und *HindIII* wurde das Fragment in den Vektor pGL427-Ebox-luc inkloniert (siehe Kapitel 2.2.3.2). Eine Sequenzierung mit den Primern pGL427\_cs\_for und pGL427\_cs\_rev bestätigte ein erfolgreiches Einbringen des

Genfragments in den Vektor. Eine Vektorkarte von pGL427-Ebox-*TCF12* befindet sich in Anhang C.

#### Klonierung von pIS14-*TWIST1* WT, pIS14-*tcf12* WT, pIS14-*twist1a/b* WT

Der Vektor pIS14-*TCF12* WT wurde von Emmanuelle Huillard (Sorbonne Université, Paris) bereitgestellt. Die wildtypischen Sequenzen der humanen *TWIST1* cDNA, sowie die cDNA Sequenzen der Zebrafisch Gene *tcf12* und *twist1a/b* wurden ebenfalls in den Vektor pIS14 einkloniert. Dazu wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdauers mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Spe*I zunächst die *TCF12* WT Sequenz aus dem Vektor pIS14-*TCF12* WT ausgeschnitten. Die cDNA-Sequenzen wurden vollständig mit Primern amplifiziert, denen die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI bzw. *Spe*I angehängt wurden. Die verwendeten Primer sind in Anhang A gelistet. Im Anschluss wurden die Vektoren mit den Primern pIS14\_Seq\_for und pIS14\_Seq\_rev über eine Sequenzierung verifiziert. Eine Vektorkarte der pIS14-*TCF12*/*TWIST1*-Konstrukte befindet sich in Anhang C.

## 2.2.4 Methoden *Danio rerio*

### 2.2.4.1 Mikroinjektionen

Die Mikroinjektionen zum Einbringen der verschiedenen DNA und RNA Konstrukte in Einzell-Embryonen wurden gemäß Stuart et al. und Westerfield durchgeführt (Stuart et al., 1988, Westerfield, 2000). Die Injektionsnadeln (1mm Außen- und 0,58mm Innendurchmesser) wurden mit einem *Vertical Pipette Puller* 720 hergestellt. Die Injektionen wurden mit einem FemtoJet 4i Druckluftinjektor und einem Manuellen Mikromanipulator MM 33 durchgeführt.

Eine Standard Injektionslösung für die eingebrachten Konstrukte sah wie folgt aus:

CRISPR/Cas9 Plasmidkonstrukte	<i>tcf12:EGFP</i> und <i>tcf12</i> -CNE Reporter-gen-Konstrukte
sgRNAs [25-50ng/μl]	Plasmidkonstrukte [25ng/μl]
Cas9 RNA [75-100ng/μl]	Tol2 Transposase mRNA [50ng/μl]
0,05% Phenolrot (pH7,0)	0,05% Phenolrot (pH7,0)
FITC-dextran [1mg/ml]	

Das Phenolrot dient der Visualisierung von der Injektionslösung. Die Identifizierung positiv injizierter Embryonen erfolgte jeweils im 24hpf Stadium. Bei den *tcf12:EGFP* Konstrukten diente ein GFP-Signal als Injektionskontrolle, bei den *tcf12-CNE1-3* Konstrukten ein transientes RFP-Signal in den Somiten, hervorgerufen durch die *cardiac-actin:RFP cassette* des ZED Vektors (Bessa et al., 2009). Bei den Knockout-Zebrafischlinien diente ebenfalls ein GFP Signal als Injektionskontrolle, hervorgerufen durch den grün fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran, welcher der Injektionslösung hinzugegeben wurde. Lediglich positiv injizierte Embryonen wurden für weitere Analysen und die Etablierung von transienten Linien bzw. Knockout-Linien großgezogen.

#### 2.2.4.2 gDNA Extraktion aus *Fin Clips* und ganzen Zebrafischlarven

Die Extraktion der genomischen DNA (gDNA) erfolgte entweder aus einem Teil der Schwanzflosse adulter Zebrafische (*Fin Clips*) oder aus ganzen Fischlarven. Für die *Fin Clips* wurde den adulten Zebrafischen mit einer sterilen Schere ein Teil der Schwanzflosse entfernt. Die *Fin Clips* oder die ganzen Fischlarven wurden einzeln in 0,2ml Reaktionsgefäße überführt, in welche 75µl des gDNA Extraktionspuffers vorgelegt wurden. Die Proben wurden bei 55°C über Nacht lysiert. Anschließend wurden die gDNAs über eine Ethanolfällung aufgereinigt. Dazu wurden die Proben in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt, jeweils 150µl 100% EtOH hinzugegeben und die Proben für 20-30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand abgenommen. Das gDNA Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das gDNA Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 15 min bei 37°C getrocknet. Die Pellets wurden in 20µl TE-Puffer resuspendiert und auf 4°C gelagert. Die Ausbeute der extrahierten gDNAs liegt nach der Extraktion, je nach Menge des eingesetzten Gewebes bei 200-700 ng/µl.

gDNA Extraktionspuffer:	10mM Tris pH 8,2
	10mM EDTA
	200mM NaCl
	0,5% SDS
	200 µg/ml Proteinase K

### 2.2.4.3 RNA Isolierung aus Zebrafischen und reverse Transkription

Im Folgenden wird die Gewinnung von RNA aus ganzen Zebrafischembryonen verschiedener Stadien sowie aus Geweben adulter Zebrafische für die weitere Verwendung in PCR-Analysen und Klonierungen beschrieben. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe einer Phenol Chloroform Extraktion. Dazu wurden die Zebrafischembryonen/Gewebe jeweils in 1,5ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend auf -80°C gelagert.

Die Embryonen/Gewebe wurden zunächst mit einem Pistill homogenisiert und zu dem Homogenisat anschließend 300µl Qiazol hinzugegeben. Das Homogenisat wurde für 5min bei RT inkubiert, anschließend für 15s gevortext und erneut für 5min auf RT inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation für 15s wurden 60µl Chloroform hinzugegeben und die Mischung erneut für 15s gevortext und für 3min auf RT inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation für 15min bei 12000g auf 4°C führt zu einer Phasentrennung, bei der sich in der oberen wässrigen Phase die RNA befindet. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2µl Glycogen versetzt, welches zu einer besseren Sichtbarkeit des RNA Pellets beiträgt. Nach Zugabe von 150µl Isopropanol wurde der Ansatz gemischt und für 5-15min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min auf 12000g bei 4°C. Anschließend wurde der Überstand erneut abgenommen und das RNA Pellet mit 1ml 75% EtOH gewaschen und für 10 min auf 12000g auf 4°C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt und das RNA Pellet anschließend für 2-5min bei 55°C an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 20µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und auf -20°C gelagert.

Die reverse Transkription der RNAs erfolgte mit dem FIREScript RT cDNA synthesis KIT gemäß den Herstellerangaben. Die cDNAs wurden bis zu ihrer Verwendung auf -80°C gelagert.

### 2.2.4.4 Whole-mount RNA *in-situ* Hybridisierungen an Zebrafischembryonen

Mit einer *in-situ* Hybridisierung wird RNA in Geweben und Zellen mit spezifischen RNA-Sonden sichtbar gemacht. Zum Nachweis von *tcf12* und *twist1a/b* in Zebrafischembryonen wurden die 11-72hpf alten Embryonen zunächst dechorionisiert, bevor sie in 4% Paraformaldehyd bei 4°C über Nacht fixiert wurden. Nach der Fixierung wurden die Embryonen bis zur weiteren Verwendung in 100% MetOH gelagert. Über eine umgekehrte MetOH/s.f. PBST Reihe (100%, 75%, 50%, 25% MetOH) wurden die Embryonen wieder in s.f. PBST überführt. Im Anschluss wurden sie zweimal für 5min in

s.f. PBST gewaschen und anschließend in Proteinase K inkubiert (2µl Proteinase K [10mg/ml] in 2 ml s.f. PBST), um eine bessere Penetration der Sonde zu ermöglichen. Die Inkubationszeiten des Proteinase K Verdau wurden dem Entwicklungsstadium und damit der Größe der Embryonen entsprechend gewählt:

Entwicklungsstadium	Proteinase K Inkubation
11hpf & 20hpf	3min
24hpf & 26hpf	4min
48hpf	12min
72hpf	25min

Nach dem Verdau mit Proteinase K wurden die Embryonen zweimal kurz mit Glycin in s.f. PBST gewaschen [2mg/ml] und 20min in 4% Paraformaldehyd in s.f. PBST nachfixiert. Es folgten fünf Waschschrte in s.f. PBST für jeweils 5min.

Für die Prähybridisierung der RNA-Sonden wurden die Embryonen für 1-4h im Hybridisierungs-Puffer auf 65°C inkubiert. Die einzelsträngigen RNA-Sonden wurden 1:100 im Hybridisierungs-Puffer verdünnt und für 10min auf 80°C inkubiert. Der Hybridisierungs-Puffer wurde durch 500µl der verdünnten RNA-Sonde ersetzt und die Embryonen über Nacht bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Die folgenden Waschschrte wurden ebenfalls bei 65°C im Wasserbad durchgeführt: 2x 30min in 50% Formamide/2xSSCT; 1x 30min in 2xSSCT; 2x 30min in 0,2xSSCT. Nach einem weiteren Waschschrte in PBST für 1min auf RT wurden unspezifische Bindungsstellen mit einem Blockpuffer für 1-4h (PBST mit 5% Sheep Serum) geblockt. Der Blockpuffer wurde durch eine Antikörperlösung ersetzt (anti-Digoxigenin bzw. anti-Fluorescein, Verdünnung 1:2000 in Blockpuffer), in der die Embryonen bei 4°C über Nacht inkubiert wurden. Nach der Antikörperdetektion wurden die Embryonen 6x für 20min in PBST und schließlich zweimal für 5min im Färbepuffer gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen unter Lichtausschluss für bis zu 48h in einer Färbelösung (20µl NBT/BCIP in 1ml Färbepuffer) auf RT inkubiert, bis eine spezifische Blaufärbung erkennbar war. Um die Färbung abzustoppen, wurden die Embryonen 3x 5min in PBST gewaschen. Die gefärbten Embryonen wurden in 100% MetOH bei -20°C gelagert. Die Analyse und Aufnahmen der *Whole-mount* RNA *in-situ* Hybridisierungen erfolgten an einem S8 APO Stereomikroskop mit einer MC170 HD Mikroskopkamera.

---

**Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:**

Hybridisierungs-Puffer:	25mL 100% Formamide 12,5mL 20x SSC 250µL 20% Tween20 150µL Heparin 250mg RNase freie torula RNA pH6.0 mit ddH <sub>2</sub> O auf 50ml auffüllen
PBST:	5,8g NaCl 145mg KCl 1g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 150mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5ml 20% Tween-20 mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen und anschließend steril filtrieren
20x SSC:	175,3g NaCl 88,2g Tris-Na-Citrat-Dihydrat mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen
1x SSCT:	10mL 20x SSC 500µL 20% Tween 20 mit ddH <sub>2</sub> O auf 100ml auffüllen
Färbepuffer:	1ml 5M NaCl 5mL 1M Tris-HCl pH9,5 0,25mL 20% Tween 20 mit ddH <sub>2</sub> O auf 50ml auffüllen

**2.2.4.5 Präparation der Schädelplatten von Zebrafischen**

Adulte Zebrafische wurden gemäß Matthews und Varga (2012) mit Tricaine euthanisiert und über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyde fixiert. Anschließend wurden die Fische zweimal für mindestens 30min in PBS gewaschen. Die Köpfe wurden abgetrennt und die Schädeldächer präpariert. Direkt im Anschluss wurde eine Alizarinrot Färbung durchgeführt (siehe 2.2.5.3).

**2.2.5 Histologie****2.2.5.1 Kunststoffeinfbettung von Zebrafisch Schädeldächern**

Nachdem die Zebrafisch Schädeldächer präpariert und mit Alizarinrot S gefärbt wurden (siehe 2.2.4.5 und 2.2.5.3), wurden sie fünfmal für 3min in dH<sub>2</sub>O gewaschen und über die folgende aufsteigende EtOH-Reihe entwässert und anschließend in Epon überführt:

---

30%EtOH	30min
50%EtOH	30min
70%EtOH	30min
90%EtOH	30min
100%EtOH	30min
100%EtOH	30min
100%EtOH	30min
100%EtOH : Epon (1:1)	2h
Epon	2h
Epon	ÜN

Alle Waschschritte erfolgten auf RT. Anschließend wurden die Schädelplatten in einer PELCO Flacheinbettungsform in Epon ausgerichtet und für mindestens 48h bei 60°C polymerisiert. Mit einem EM UC7 Mikrotom wurden mit einem histologischen Diamantmesser 5µm große Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden an einem S8 APO Stereomikroskop mit einer MC170 HD Mikroskopkamera und an einem Nikon A1+ Konfokalmikroskop aufgenommen.

### 2.2.5.2 Immunhistochemische (IHC) Färbungen an Cryostatschnitten

Für eine genaue Lokalisation EGFP-positiver Zellen im Schädeldach von adulten *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Individuen wurden Gefrierschnitte von präparierten Schädelplatten angefertigt. Der Nachweis der EGFP-positiven Zellen erfolgte mit Hilfe einer IHC Färbung gegen GFP.

Für die Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die präparierten Schädelplatten von adulten *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Zebrafischen in 30% Sucrose bei 4°C über Nacht gelagert. Dieser Schritt wird als Kryoprotektion bezeichnet. Er gewährleistet, dass das Gewebe entwässert wird, sodass sich keine Eiskristalle in der extrazellulären Matrix der Zellen bilden, wodurch das Gewebe geschädigt und die Biomechanik verändert werden würde. Die Schädelplatten wurden am folgenden Tag in OCT Medium in gewünschter Orientierung ausgerichtet und eingebettet und auf -20°C gelagert. Mit einem Kryostat wurden 6µm dicke Schnitte der Schädelplatten angefertigt. Diese wurden auf Superfrost plus Objektträger übertragen und für mindestens 1h auf Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung auf -20°C gelagert.

Zum Nachweis des EGFP-Signals mittels IHC Färbung wurden die Präparate 3x für 5 min in Tris-HCl Puffer (pH 7,6) gewaschen. Das Blocken und die Inkubationen mit den Antikörpern erfolgten im Blockpuffer. Zur Detektion des EGFP-Signals wurde als Primärantikörper ein Huhn anti-GFP Antikörper (Verdünnung 1:300) und als

Sekundärantikörper ein Alexa Fluor Ziege anti-Huhn Antikörper (Verdünnung 1:1000) verwendet. Die Präparate wurden für 30 min auf Raumtemperatur geblockt und anschließend für 1,5h mit dem Primärantikörper gefärbt. Durch mehrmaliges Waschen wurden nicht gebundene Reste des Primärantikörpers ausgewaschen. Direkt im Anschluss wurden die Präparate für 1h im Dunkeln mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem mehrmaligem Waschen wurden die Präparate zur Visualisierung der Zellstrukturen und Zellkerne in Acti-stain™ 488 Phalloidin (Verdünnung 1:100) zusammen mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Verdünnung 1:1000) für 30 min in PBST inkubiert. Nach 3x 5min Waschen in PBST wurden die Objektträger in Mowiol eingedeckelt und auf -20°C gelagert. Die Analyse der Präparate erfolgte an einem Nikon A1+ Konfokal Mikroskop.

Blockpuffer: Tris-HCl pH7,6  
0,05% Tween 20  
0,1% BSA

### **2.2.5.3 Alizarinrot Färbung zur Darstellung von mineralisiertem Gewebe**

Die Visualisierung von mineralisierenden Knochenstrukturen im Zebrafisch erfolgte mit dem Farbstoff Alizarinrot S. Dieser Farbstoff bindet an Calciumionen, welche einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Knochengewebe darstellen. Das mit dieser Methode angefärbte Knochengewebe weist unter dem Lichtmikroskop eine charakteristische orange-rote Färbung auf, die unter Anregung mit Fluoreszenzlicht rot fluoresziert.

Lebende Fische wurden für 2d in einer Alizarinrot-Lösung [50µg/ml] inkubiert, die in Fischwasser aus den Aquarienanlagen gelöst und mit HEPES [10mM] auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde. Bevor die Fische mit einem Nikon A1+ Konfokalmikroskop aufgenommen wurden (DsRed Kanal, Anregung 558nm, Emission 583nm), wurden sie zweimal für 30-60min in Fischwasser gewaschen.

Präparierte Schädeldächer von Zebrafischen wurden zweimal 5min in PBS gewaschen. Bei pigmentierten Fischen mit AB Hintergrund wurden die Schädeldächer für mindestens 30min in einer Lösung bestehend aus 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0,5% KOH gebleicht, bis die Pigmentierung vollständig entfernt war. Anschließend wurden die Schädelplatten für mindestens 10min in einem Färbepuffer (0,5% KOH und 10% Glycerol in dH<sub>2</sub>O) inkubiert und über Nacht in 0,02% Alizarinrot gelöst im Färbepuffer gefärbt. Am nächsten Tag

wurde überschüssige Färbung durch mehrmaliges Waschen in einer 1% KOH und 50% Glycerol Lösung entfernt. Die Schädelplatten wurden an einem S8 APO Stereomikroskop mit einer MC170 HD Mikroskopkamera aufgenommen

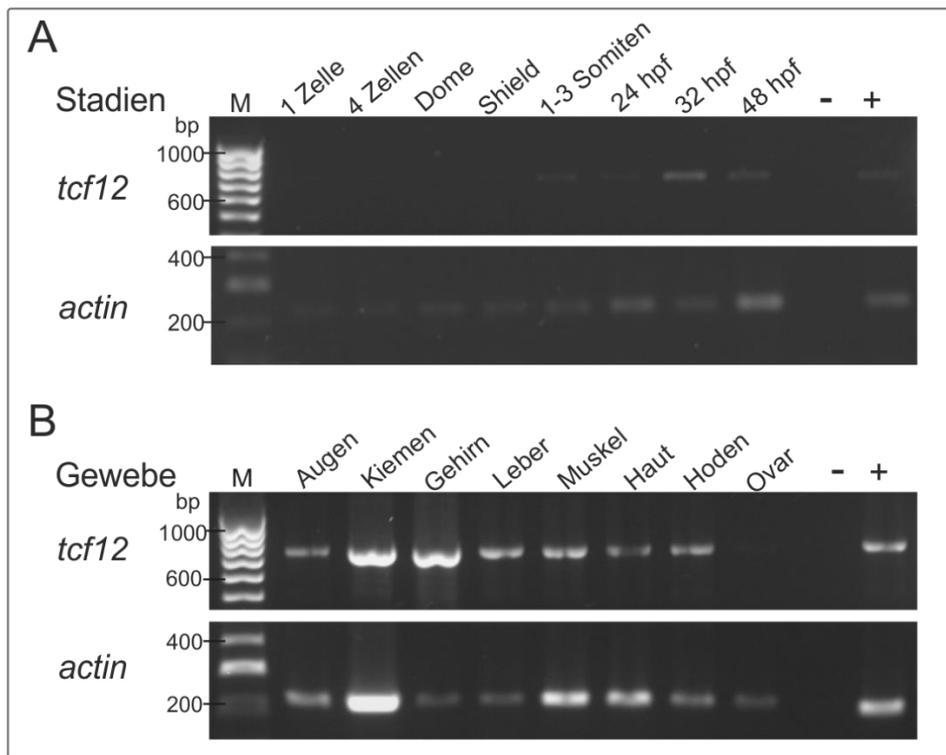
## 3. ERGEBNISSE

### 3.1 Expressionsnachweis von *tcf12* im Zebrafisch

Um die Expression von *tcf12* im Zebrafisch zu untersuchen, galt es zunächst einen Nachweis der endogenen Expression mittels PCR-Analysen und *Whole-mount* RNA *in-situ* Hybridisierungen zu erbringen. Bei einem erfolgreichen Nachweis sollte anschließend im Rahmen der Arbeit eine *tcf12:EGFP* Zebrafisch Reportergenlinie generiert werden, um die Expression von *tcf12 in vivo* über die gesamte Entwicklung hinweg zu untersuchen.

#### 3.1.1 Endogener Nachweis von *tcf12* in verschiedenen Stadien und Geweben des Zebrafisches

Ein erster Nachweis der endogenen Expression von *tcf12* im Zebrafisch erfolgte mittels PCR-Analysen auf cDNAs verschiedener embryonaler Entwicklungsstadien und Gewebe adulter Zebrafische (Abbildung 11). Auf diese Weise lässt sich die räumliche und zeitliche Expression des Transkriptionsfaktors einordnen. Zur Amplifikationskontrolle diente das Haushaltsgen *actin*, das ubiquitär zu jedem Entwicklungszeitpunkt und in allen Geweben exprimiert wird. Eine erste Expression von *tcf12* konnte im 1-3-Somiten-Stadium nachgewiesen werden, welches einem Entwicklungszeitpunkt von 10-11hpf entspricht (Abbildung 11A). Auch in allen darauffolgenden analysierten Stadien (24, 32 und 48hpf) ist eine endogene Expression von *tcf12* im Zebrafisch nachweisbar. Die PCR-Analyse auf verschiedene Gewebe adulter Zebrafische offenbarte eine sehr breite *tcf12* Expression, die in allen getesteten Geweben (Augen, Kiemen, Gehirn, Leber, Muskel, Haut, Hoden und Ovar) bestätigt werden konnte (Abbildung 11B).



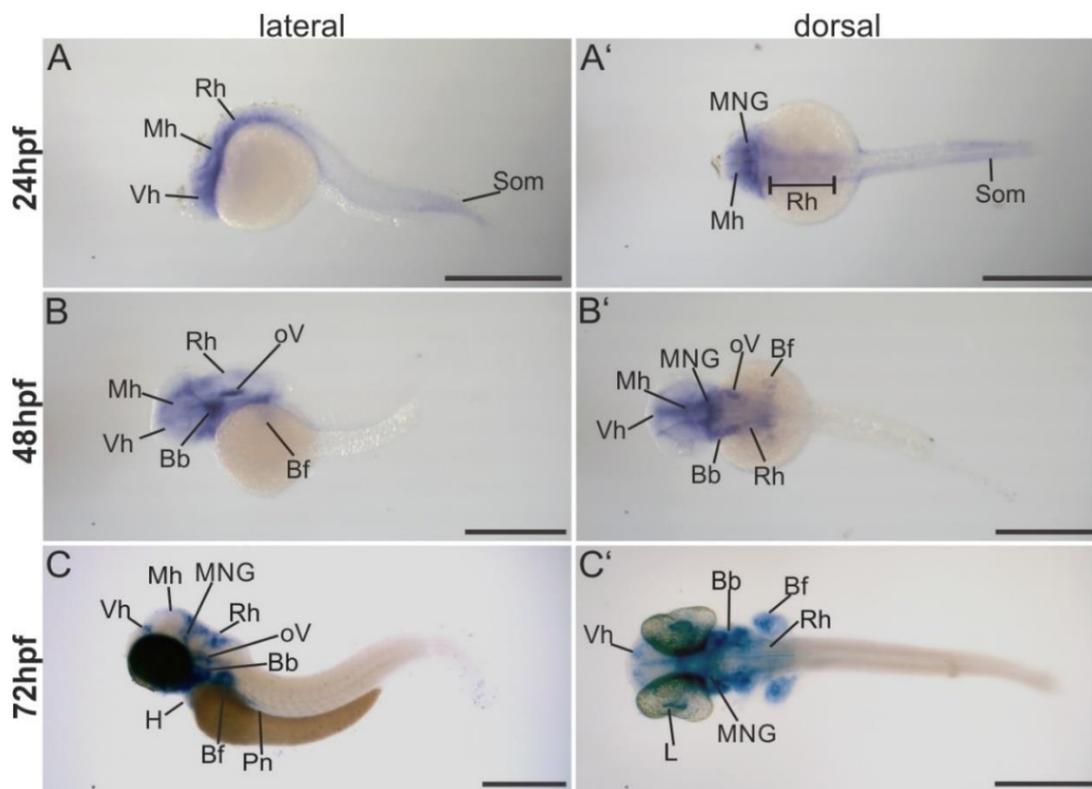
**Abbildung 11: Nachweis der *tcf12* Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie in Geweben adulter Zebrafische.**

Für die Analysen wurden cDNA-Templates verwendet, die aus RNAs von Individuen der jeweiligen Entwicklungsstadien (A) bzw. aus Geweben adulter Zebrafische (B) gewonnen wurden. Als Positivkontrolle (+) diente ein Mix aller verwendeten cDNAs als Template für die PCR-Reaktion. Bei der Negativkontrolle (-) wurde dem Ansatz keine cDNA zugesetzt. Als Größenstandard diente ein 100bp Marker (M).

Nachdem ein erster Nachweis für eine Expression von *tcf12* ab dem 1-3-Somiten-Stadium erbracht werden konnte, wurde mittels Whole-mount RNA *in-situ* Hybridisierung das Expressionsmuster von *tcf12* untersucht (Abbildung 12). Innerhalb dieser Entwicklungszeitpunkte sind die wichtigsten Organe wie Herz, Vorder-, Mittel- und Hinterhirn, Neuralrohr und Somiten bereits angelegt.

Eine laterale Ansicht von 24hpf alten Embryonen zeigt eine spezifische Expression von *tcf12* im Vorder-, Mittel- und Rautenhirn sowie in den posterioren Somiten (Abbildung 12A). In der dorsalen Ansicht wird außerdem eine Färbung in der Mittel-Nachhirn-Grenze erkennbar (Abbildung 12A'). 48hpf alte Embryonen zeigen darüber hinaus eine Expression in den Ansätzen der Brustflossen und den Branchialbögen (Abbildung 12B, B'). Des Weiteren kann eine Färbung im otischen Vesikel detektiert werden. Das Expressionsmuster von 72hpf alten Embryonen gleicht dem der 48hpf alten Individuen (Abbildung 12C, C'). Eine zusätzliche Färbung ist bei 72hpf alten Embryonen im Herzen,

der Linse und im Pronephros erkennbar. Zusammenfassend zeigt *tcf12* somit während der Embryonalentwicklung ein sehr breites Expressionsspektrum, das bei allen untersuchten Stadien vor allem im Gehirn nachgewiesen kann.



**Abbildung 12: Whole-mount RNA *in-situ* Hybridisierungen von *tcf12* an 24hpf (A, A'), 48hpf (B, B') und 72hpf (C, C') alten *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup> Zebrafisch WT Embryonen.**

Dargestellt sind jeweils eine laterale und eine dorsale Ansicht jedes Entwicklungsstadiums. Gewebe, die eine spezifische Färbung aufweisen sind markiert.

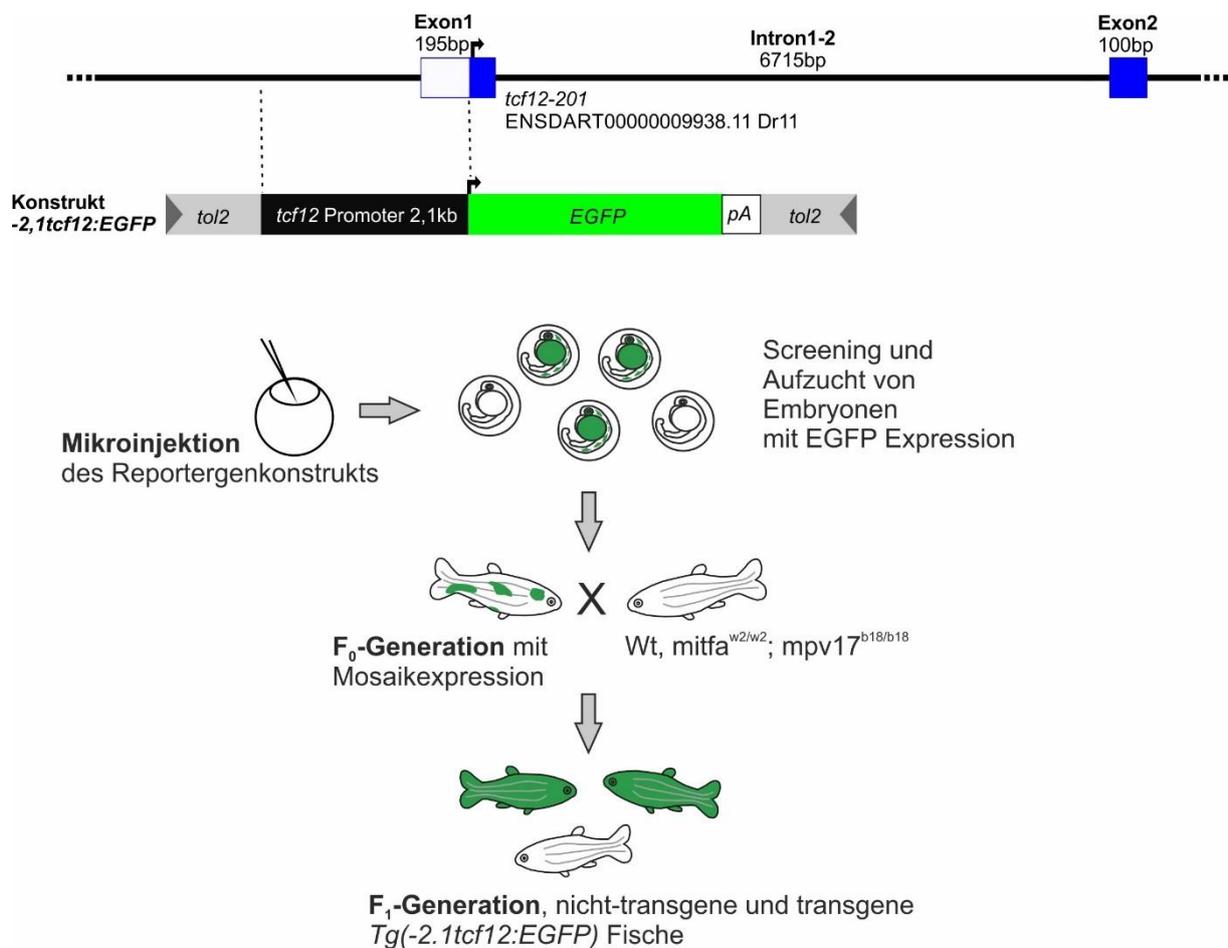
Bb, Branchialbögen; Bf, Brustflossen; H, Herz; L, Linse; Mh, Mittelhirn; MNG, Mittel-Nachhirngrenze; oV, otisches Vesikel; Pn, Pronephros; Rh, Rautenhirn; Som, Somiten; Vh, Vorderhirn. Maßstab: 500µm

### 3.1.2 Etablierung einer *tcf12:EGFP* Reportergermlinie

Um die Expression von *tcf12* über die Embryonalentwicklung hinweg in juvenilen und adulten Fischen zu untersuchen, erfolgte die Etablierung einer transgenen (Tg) *tcf12:EGFP* Reportergermlinie. Neben einer Analyse der allgemeinen Expressionsmuster von *tcf12* während der Entwicklung wurde ein besonderer Fokus auf die Untersuchung der spezifischen Expression von *tcf12* während der Entwicklung des Schädeldachs und der Suturen gelegt. Ziel dieser Untersuchung war es, die Rolle des Transkriptionsfaktors bei der Entstehung von Kraniosynostosen besser eingrenzen zu können.

Für die Generierung transgener *tcf12:EGFP* Fische wurde zunächst über eine Gateway-Klonierung ein Vektorkonstrukt erstellt, das eine 2158bp große Sequenz des Zebrafisch

*tcf12*-Promoters trägt, die das Reporterogen *EGFP* treibt (Abbildung 13, für die Herstellung der Konstrukte siehe Kapitel 2.2.3.6). Das Konstrukt wird von Tol2-Transposonelementen flankiert, welche dessen Rekombination ins Genom des Zebrafisches erlauben (Kawakami, 2005). Das Reportergenkonstrukt wurde via Mikroinjektionen in transparente wildtypische *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup> Zebrafischembryonen eingebracht (F<sub>0</sub>-Generation, siehe Abbildung 13; das Einbringen der Konstrukte mittels Mikroinjektionen ist in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben). Individuen, die aus den Mikroinjektionen hervorgehen gehören der F<sub>0</sub>-Generation an und zeigen eine Mosaikexpression des EGFP-Konstruktes. Nur wenn das Reportergenkonstrukt in die Keimzellen integriert wurde, geben die Fische das Konstrukt an die nachfolgende F<sub>1</sub>-Generation weiter. Die injizierten F<sub>0</sub>-Individuen wurden nach Erreichen der Geschlechtsreife mit wildtypischen *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup> Fischen gekreuzt. Aus diesen Kreuzungen gehen sowohl nicht-transgene, als auch transgene Fische hervor. Die transgenen *tcf12:EGFP* Fische wurden mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung identifiziert. Die F<sub>1</sub>-Individuen wurden untereinander ausgekreuzt, um eine stabile transgene Linie zu etablieren, die im Folgenden als *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* bezeichnet wird.



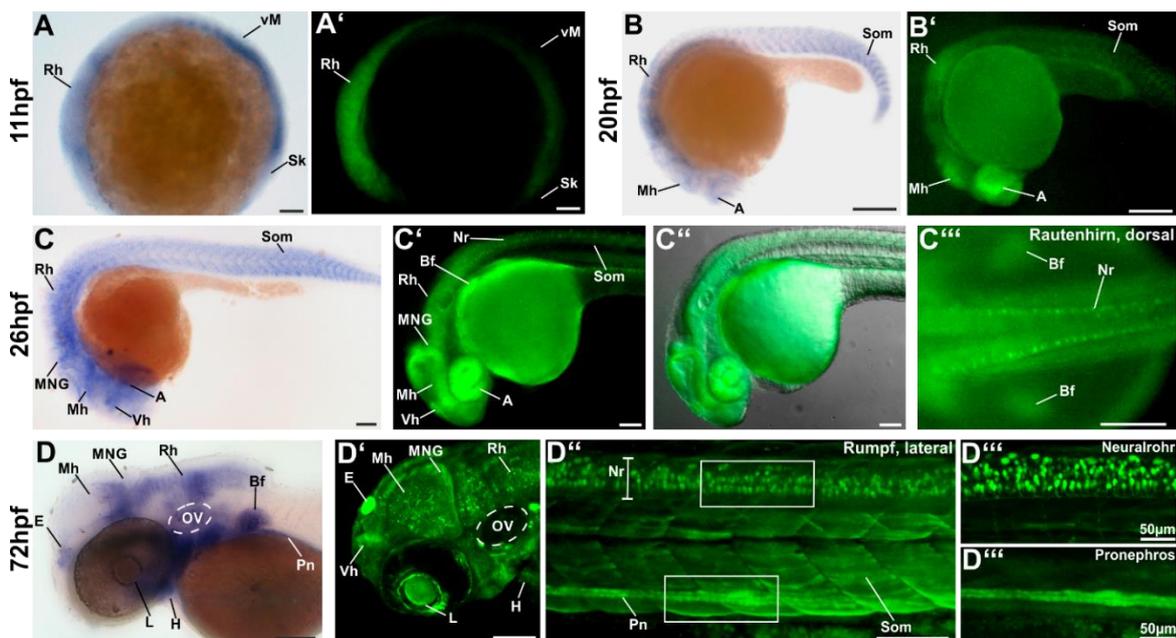
**Abbildung 13: Darstellung des Reporter-gen-Konstruktes *-2,1tcf12:EGFP* und des Kreuzungsschemas zur Etablierung der *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Zebrafischlinie.**

Mittels Gateway-Klonierung wurde ein 2,1kb großes Promoter-Fragment vor das Reporter-gen *EGFP* kloniert. Das Konstrukt wurde mittels Mikroinjektionen in wildtypische *mitfa<sup>w2/w2</sup>; mpv17<sup>b18/b18</sup>* Embryonen im Einzellstadium eingebracht. F<sub>0</sub>-Embryonen mit einer deutlichen EGFP Expression wurden aussortiert und aufgezogen und nach Erreichen der Geschlechtsreife mit wildtypischen *mitfa<sup>w2/w2</sup>; mpv17<sup>b18/b18</sup>* Fischen gekreuzt. Die F<sub>1</sub>-Generation besteht sowohl aus transgenen, als auch aus nicht-transgenen Fischen.

### 3.1.3 Evaluierung der transgenen *tcf12:EGFP* Expression mit Hilfe von *Whole-mount in-situ* Hybridisierungen

Zur Verifizierung der endogenen *tcf12* Expression, wurden die Fluoreszenzmuster der *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Embryonen mit den Mustern aus *tcf12* *Whole-mount in-situ* Hybridisierungen verglichen (Abbildung 14). In beiden Fällen konnte übereinstimmend ein erstes spezifisches Expressionsmuster ab 11hpf im Rautenhirn, dem ventralen Mesoderm und der Schwanzknospe detektiert werden (Abbildung 14A, A'). Auch mittels PCR-Analysen auf verschiedene Stadien des Zebrafisches, konnte ab 1-3-Somiten (entspricht 10-11hpf) eine erste *tcf12* Expression nachgewiesen werden (Abbildung

11A). 20hpf alte Individuen zeigten eine endogene und transgene Expression von *tcf12* im Mittel- und Rautenhirn, Auge und den Somiten (Abbildung 14B, B'). 26hpf alte Embryonen weisen darüber hinaus eine Expression im Vorderhirn und der Mittel-Nachhirngrenze auf (Abbildung 14C-C''). Bei transgenen Embryonen ist eine zusätzliche EGFP Expression in den sich entwickelnden Brustflossen sowie in einzelnen Neuronen entlang des Neuralrohrs detektiert worden (Abbildung 14C'-C'''). In 72hpf alten Embryonen wird, sowohl in transgenen Fischen, als auch bei den *in-situ* Hybridisierungen, *tcf12* darüber hinaus im Herzen, der Epiphyse und dem Pronephros exprimiert (Abbildung 14D-D''). Die anfangs allgemeine Expression im Auge ist in diesem Stadium auf die Augenlinse begrenzt. Die transgenen *tcf12:EGFP* Fische erlauben einen deutlich spezifischeren Nachweis einzelner Neurone in den verschiedenen Gehirnregionen sowie entlang des Neuralrohrs. Dank der hohen Auflösung der Fluoreszenzaufnahmen gelingt zusätzlich der Nachweis einer EGFP Expression in Neuronen entlang des otischen Vesikels (Abbildung 14D').



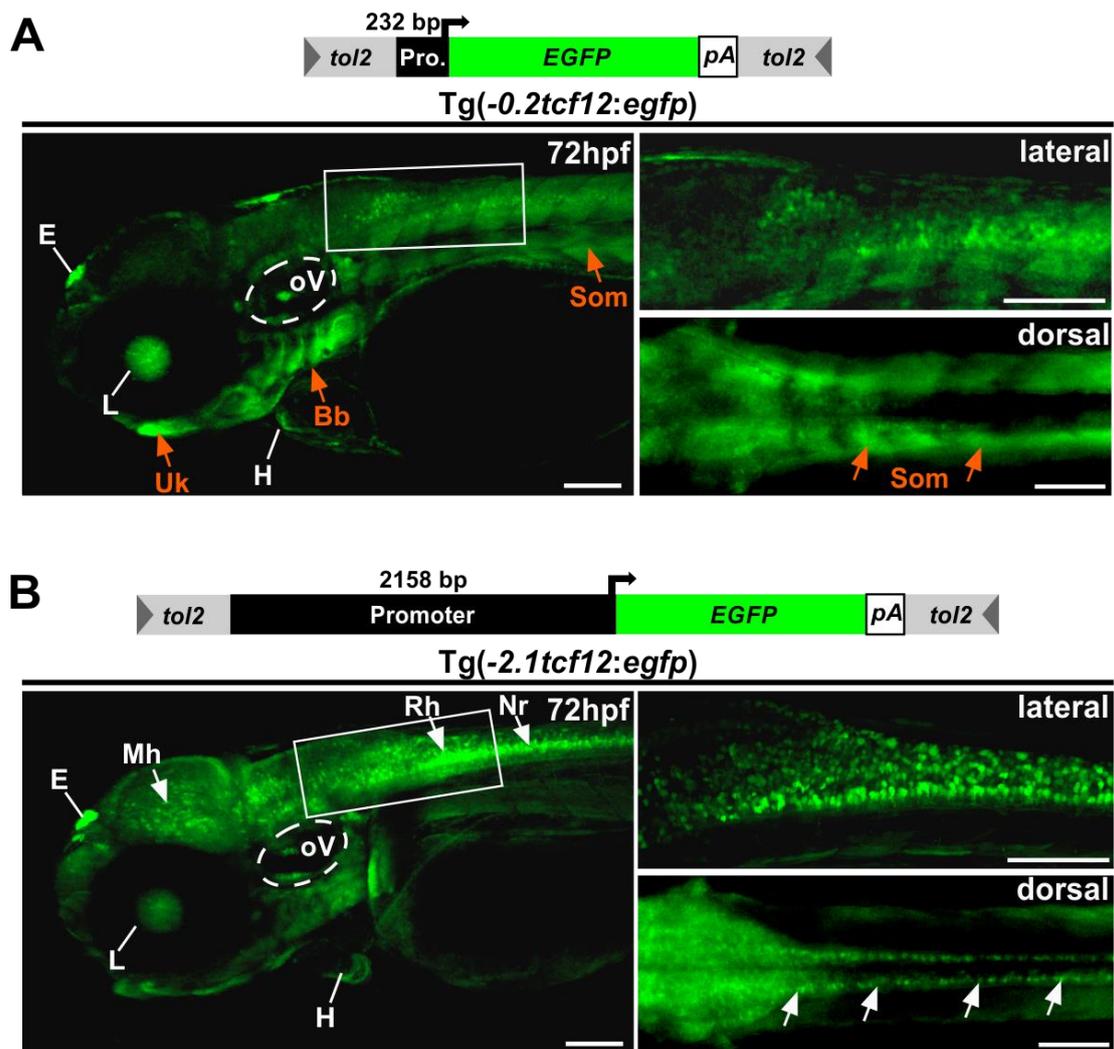
**Abbildung 14: Gegenüberstellung der endogenen *tcf12* Expression und der EGFP Expressionsmuster transgener *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Embryonen.**

Der endogene Expressionsnachweis von *tcf12* erfolgte mittels *in-situ* Hybridisierung. Analysiert wurden 11hpf (A, A'), 20hpf (B, B'), 26hpf (C-C'') und 72hpf alte Zebrafischembryonen (D-D''). C'' zeigt eine Überlagerung des Fluoreszenzkanals aus C' mit dem Hellfeldkanal. Eine Detailaufnahme der neuronalen *tcf12:EGFP* Expression im Rautenhirn ist in C''' dargestellt. D''' stellt Vergrößerungen der EGFP Expression im Neuralrohr und dem Pronephros aus D'' dar (eingerahmte Bereiche).

A, Auge; Bf, Brustflossen; E, Epiphyse; H, Herz; L, Linse; Mh, Mittelhirn; MNG, Mittel-Nachhirngrenze; Nr, Neuralrohr; oV, otisches Vesikel; Pn, Pronephros; Rh, Rautenhirn; Sk, Schwanzknospe; Som, Somiten; Vh, Vorderhirn; vM, ventrales Mesoderm. Maßstab 100µm, sofern nicht anders gekennzeichnet. Abbildung verändert nach (Blümel et al., 2019).

### 3.1.4 Verschiedene *tcf12* Promoter Fragmente decken unterschiedliche Expressionsdomänen auf

Um die Effektivität eines kürzeren *tcf12* Promoter Fragments zum Nachweis der *tcf12* Expression in Zebrafischen zu untersuchen, wurde eine zweite transgene Linie mit einer 232bp großen Promotersequenz generiert: *Tg(-0.2tcf12:EGFP)*. Durch eine Gegenüberstellung der beiden transgenen Reporterlinien *Tg(-0.2tcf12:EGFP)* und *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich der EGFP Expressionsmuster herausgearbeitet werden. Eine übereinstimmende EGFP Expression zeigte sich in der Epiphyse, dem Herzen, der Linse und dem otischen Vesikel (Abbildung 15). Im Vergleich zu *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Embryonen weisen *Tg(-0.2tcf12:EGFP)* Embryonen deutlich weniger EGFP-positive Neurone im zentralen Nervensystem (ZNS) und eine deutlich stärkere Expression in den Somiten, den Branchialbögen und dem Unterkiefer auf (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: Vergleich der Expressionsmuster von 72hpf alten *Tg(-0.2tcf12:EGFP)* (A) und *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Embryonen (B).**

(A) Die *Tg(-0.2tcf12:EGFP)* Fische mit dem kürzeren *tcf12* Promoter Fragment zeigen im 72hpf Stadium eine starke EGFP Expression im Unterkiefer, den Branchialbögen und den Somiten (orangene Pfeile). (B) In *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Individuen ist in diesen Geweben lediglich eine sehr schwache Expression erkennbar, während sich diese Linie durch eine deutlich stärkere EGFP Expression in Neuronen des ZNS auszeichnet (weiße Pfeile). Eine gemeinsame Expression ist in der Epiphyse, der Linse, dem Herzen und dem otischen Vesikel in beiden Reportergermlinien erkennbar. In den rechten Abbildungen ist jeweils eine laterale und dorsale Vergrößerung des Rumpfes dargestellt (markierter Bereich), die die neuronale und muskuläre EGFP Expression in beiden Linien zeigt.

Bb, Branchialbögen; E, Epiphyse; H, Herz; L, Linse; Mh, Mittelhirn; Nr, Neuralrohr; oV, otisches Vesikel; Rh, Rautenhirn; Som, Somiten; Uk, Unterkiefer. Maßstab 100µm. Abbildung verändert nach (Blümel et al., 2019).

Da die Linie *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* das endogene *tcf12* Expressionsmuster aufgrund der starken neuronalen Expression zuverlässiger wiedergibt (vgl. Abbildung 14), wurde diese Linie hauptsächlich für die nachfolgenden Expressionsstudien verwendet.

### 3.1.5 Nachweis der *tcf12* Expression in juvenilen und adulten Zebrafischen

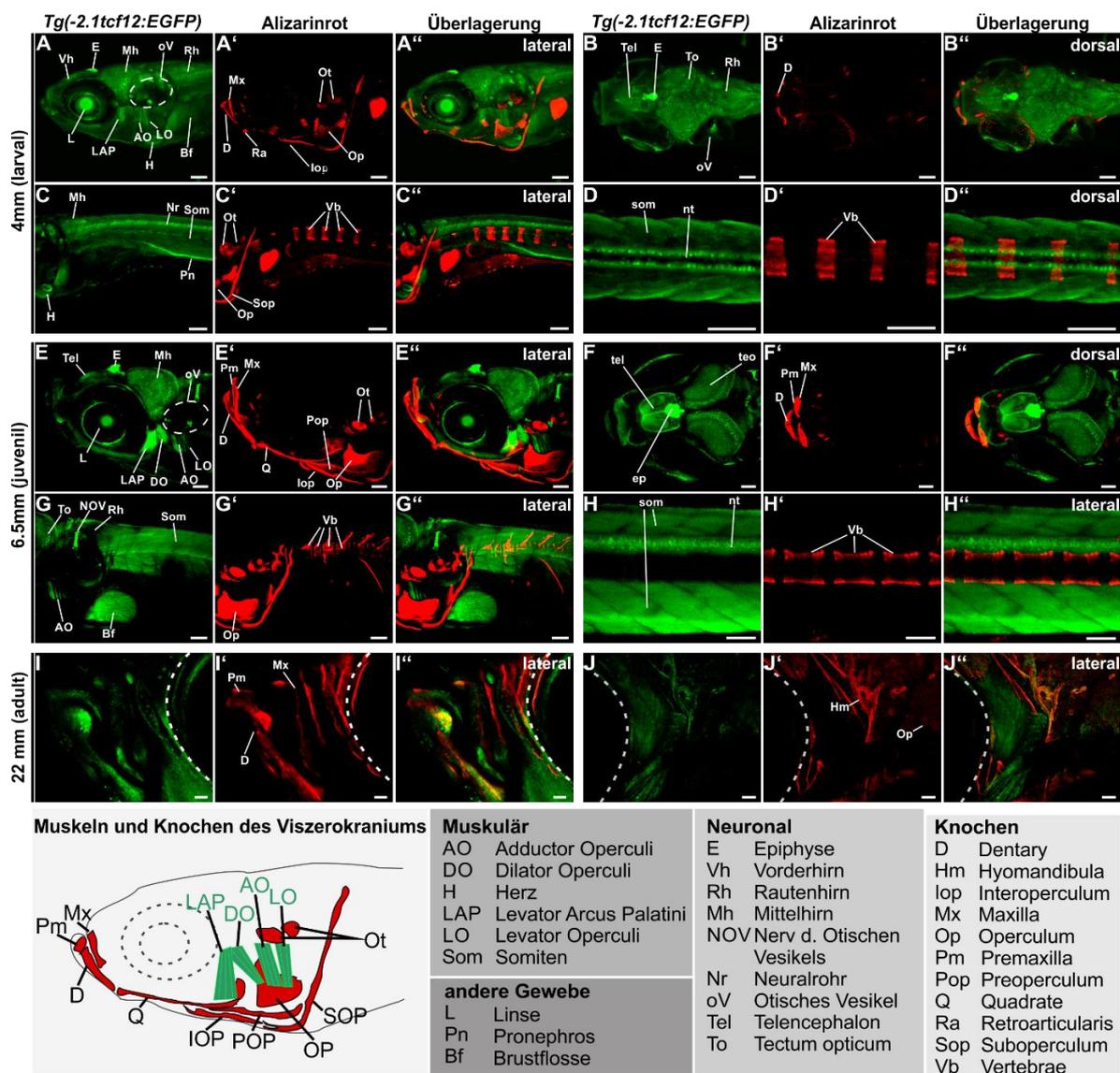
Um das räumliche und zeitliche Expressionsmuster von *tcf12* vom Larvalstadium (ca. 72hpf-27d) über das Juvenilstadium hinweg (ca. 27-90dpf) bis hin zu adulten Fischen ( $\geq 90$ dpf) zu ermitteln, wurde die EGFP Expression in *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Fischen über diesen Zeitraum hinweg wiederholt detektiert (Abbildung 16). Um den genauen Entwicklungszeitpunkt der Zebrafische anzugeben, wird im Folgenden ab einem Alter von 5dpf neben dem Alter auch die Gesamtlänge der Fische vom Kopf bis zur Schwanzspitze angegeben. Im Laufe der Zeit hat sich dies als zuverlässigeres Maß der Zebrafischartwicklung herausgestellt, da Umweltfaktoren wie Temperatur, Populationsdichte und die Wasserqualität einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklungsgeschwindigkeit der Zebrafische haben (Parichy et al., 2009, Singleman and Holtzman, 2014). Die detektierte EGFP Expression wurde für eine bessere Übersichtlichkeit in neuronale, muskuläre und knöcherne Gewebe unterteilt (siehe Abbildung 16).

Von der Embryonalentwicklung ausgehend bis hin zu adulten Fischen ist eine neuronale Expression im Vorder-, Mittel- und Rautenhirn sowie im Neuralrohr erkennbar (Abbildung 14 und Abbildung 16A-B'', E-F''). Ab dem Juvenilstadium kann ein spezifisches EGFP Signal einzelnen Gehirnregionen zugeordnet werden, wie dem Telencephalon als Bestandteil des Vorderhirns und dem optischen Tectum als Teil des Mittelhirns (Abbildung 16E-F''). Auffallend ist außerdem eine besonders starke EGFP Expression in der Epiphyse. Diese kann durch die gesamte Entwicklung der transgenen Zebrafische hindurch beobachtet werden (Abbildung 14D, D' und Abbildung 16A, B, E, F).

Eine muskuläre EGFP Expression in den Somiten kann ebenfalls über die gesamte Entwicklung hinweg detektiert werden (Abbildung 14 und Abbildung 16C-D'', G-H''). Ab dem Juvenilstadium kommt eine spezifische Expression in Muskeln des Viszerokraniums hinzu, genauer im Adductor Operculi, Dilator Operculi, Levator Arcus Palatini und Levator Operculi (Abbildung 16E-E''). Zur besseren Orientierung ist eine schematische Darstellung der Muskeln und Knochelemente des Viszerokraniums in Abbildung 16 dargestellt. Ab dem Larvalstadium bilden sich erste knöcherne Strukturen im Bereich des Schädels und entlang der Wirbelsäule des Zebrafisches. Diese wurden mittels Alizarinrot Färbung sichtbar gemacht. Das erste spezifische *tcf12:EGFP* Signal in den Knochen ist in den Knochelementen Dentary (antero-lateraler Teil des Unterkiefers) und Maxilla des sich entwickelnden Kiefers erkennbar (Abbildung 16A-A''). Im Juvenilstadium ist das

---

Wachstum der Knochen des Viszerokraniums deutlich vorangeschritten und eine EGFP Expression ist in den Knochelementen Interoperculum, Premaxilla und Quadrate nachweisbar (Abbildung 16E-E''). In adulten Zebrafischen ist ein *tcf12:EGFP* Signal in den Knochen Dentary, Hyomandibula, Maxilla, Operculum und Premaxilla des Ober- und Unterkiefers besonders auffallend (Abbildung 16I-J''). Eine Expression von EGFP positiven Zellen ist in adulten Fischen entlang des Hyomandibulums und dem Operculum erkennbar. In und um die Wirbelkörper hingegen ist keine Expression des Reportergens detektierbar. Eine spezifische EGFP Expression zeigte sich darüber hinaus in Linse, Pronephros und Brustflosse. Eine Expression innerhalb dieser Gewebe ist ebenfalls über die gesamte Entwicklungsspanne hinweg sichtbar (Abbildung 14 und Abbildung 16).



**Abbildung 16: Analyse der *tcf12* Expression über die Zeit hinweg vom Larvalstadium bis hin zu adulten Zebrafischen.**

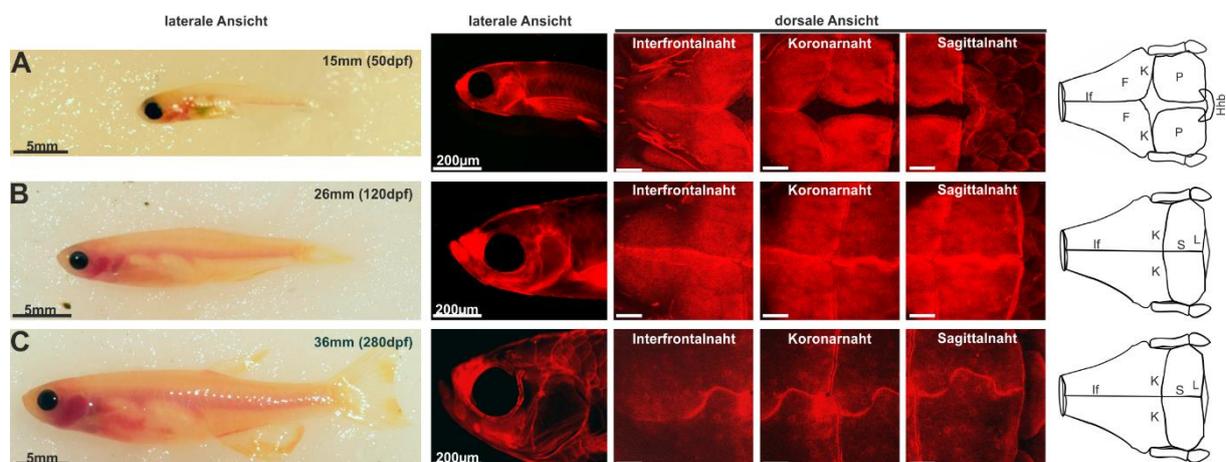
Darstellung der gewebespezifischen EGFP Expression in larvalen (11dpf), juvenilen (27dpf) und adulten (90dpf) Tg(-2.1tcf12:EGFP) Zebrafischen mittels hochauflösender Konfokalmikroskopie. Die Knochenelemente wurden mit Alizarinrot angefärbt. Die detektierten Expressionsmuster wurden in die drei Hauptgruppen Knochen, muskulär, neuronal und andere Gewebe unterteilt. Unter den jeweiligen Gewebegruppen sind die Abkürzungen aufgeführt. Die schematische Darstellung zeigt eine Übersicht der Muskeln (grüne Beschriftung) und Knochenelemente (schwarze Beschriftung) des Viszerokraniums eines juvenilen Zebrafisches. Die gestrichelten Linien in I-J' zeigen die Lage des Auges an. Maßstab 100µm. Abbildung verändert nach (Blümel et al., 2019).

### 3.1.6 Expressionsnachweis von *tcf12* während der Entwicklung des Schädeldachs und der Schädelnähte im Zebrafisch

Nachdem eine allgemeine Charakterisierung der Reportergermlinien ein sehr spezifisches Expressionsmuster von *tcf12* während der Zebrafiscentwicklung zeigte, galt es im nächsten Schritt die Rolle von *tcf12* während der Entwicklung des Schädeldachs und der

Schädelnähte zu ermitteln. Um das Wachstumsverhalten der Schädelnähte im Zebrafisch zeitlich einordnen zu können und ein geeignetes Protokoll für die Analyse und Bildgebung mittels Konfokalmikroskopie zu etablieren, wurden zunächst 15-36mm (Alter: 50-280dpf) große Wildtypfische des Stammes *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup> für eine Analyse herangezogen (Abbildung 17). Zu diesem Zweck wurden die Knochenstrukturen der Fische *in vivo* mit Alizarinrot gefärbt und die Schädeldächer im Anschluss an einem Konfokalmikroskop aufgenommen.

Meine Analysen zeigen, dass bei *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup> Wildtypen ab einem Entwicklungszeitpunkt von 15mm Gesamtlänge (50dpf) die Frontalknochen überlappen und die Interfrontalnaht ausbilden (Abbildung 17A). Die Koronarnähte haben zu diesem Zeitpunkt begonnen, sich bilateral in Richtung der Mitte des Schädeldachs auszubilden. Sie werden mittig durch die anteriore Fontanelle getrennt. Die Parietalknochen weisen eine deutliche Lücke zueinander auf, sodass die Sagittalnaht noch nicht ausgebildet ist. Sie ist die letzte Naht, die sich im Zebrafischen bei einer Gesamtlänge von 15-26mm (50-120dpf) ausbildet (Abbildung 17B). Bei adulten Zebrafischen ( $\geq 90$ dpf) sind alle Schädelnähte vollständig ausgebildet (Abbildung 17C).



**Abbildung 17: Analyse des Wachstums der Schädelplatten und der Ausbildung der Schädelnähte in WT Fischen des Stammes *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup>.**

Dargestellt sind laterale und dorsale Aufnahmen dreier Fische zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (A: 15mm, B: 26mm, C: 36mm). Knöchernen Strukturen wurden mit Alizarinrot angefärbt und an einem Konfokalmikroskop aufgenommen. Maßstab 100µm, solange nicht anders aufgeführt. F, Frontalknochen; Hhb, Hinterhauptbein; If, Interfrontalnaht; K, Koronarnaht; L, Lambdanaht; P, Parietalknochen; S, Sagittalnaht. Abbildung verändert nach (Blümel et al., 2019).

Um im nächsten Schritt die Expression von *tcf12* während der Ausbildung der Schädelnähte nachzuverfolgen, wurden die Schädeldächer transgener Fische *in vivo*

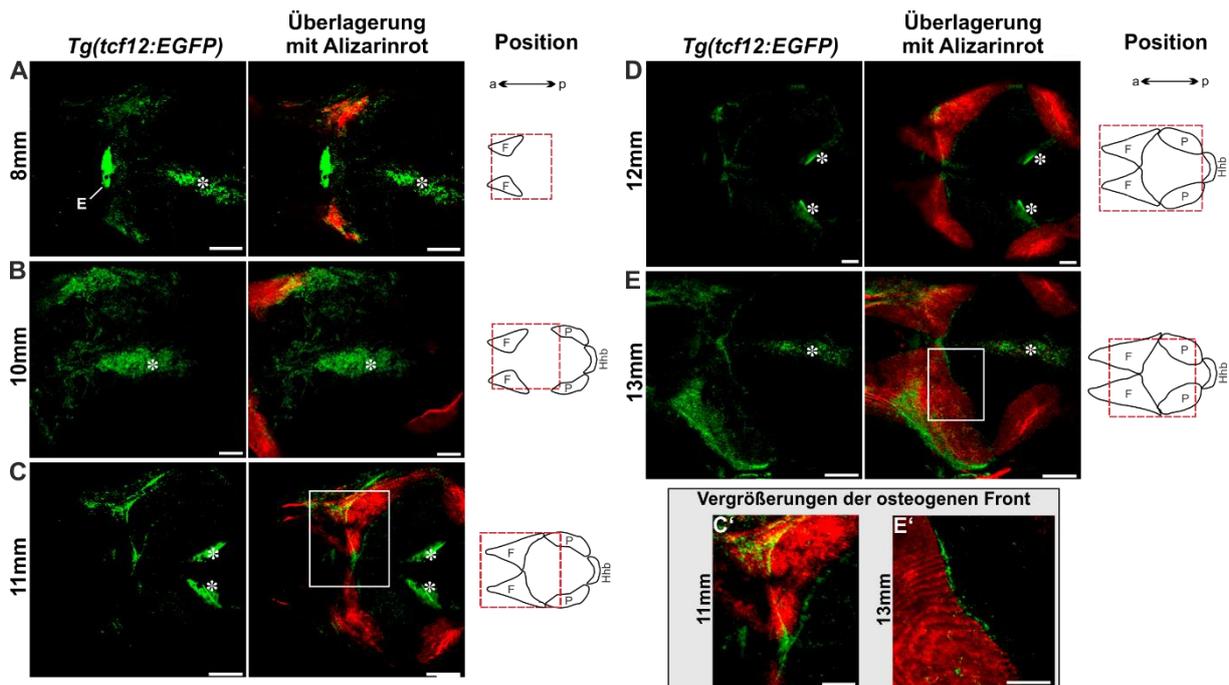
mittels Konfokalmikroskopie über die Entwicklung hinweg in 8-18mm großen (entspricht 30-90dpf) Zebrafischen analysiert (Abbildung 18 (30-45dpf) und Abbildung 19 (50-90dpf)). Besonders bemerkenswert war die Beobachtung, dass beide transgene Linien (*Tg(-0.2tcf12:EGFP)* und *Tg(-2.1tcf12:EGFP)*) in gleichem Maße *tcf12:EGFP* positive Zellen in den sich entwickelnden Schädelplatten- und nähten besitzen.

In 8mm langen (ca. 30dpf) Zebrafischen beginnen sich die Frontalknochen ausgehend von zwei Ossifikationsursprüngen bilateral zu formen (Abbildung18A). Die Frontalknochen wachsen zunächst radial von den Ossifikationsursprüngen aus. EGFP exprimierende Zellen sind flächendeckend an den Frontalknochen und deren Wachstumsfronten sowie entlang der Mitte des Schädeldachs erkennbar (Abbildung18A). Die besonders starke EGFP Expression zwischen den beiden Frontalknochen stammt von der darunter liegenden Epiphyse. In 10mm großen Fischen (ca. 35dpf) beginnt die Ausbildung der Parietalknochen (Abbildung18B). EGFP positive Zellen akkumulieren zu diesem Entwicklungszeitpunkt besonders stark an den proliferierenden posterioren Zonen der Frontalknochen, welche sich durch eine sehr helle Alizarinrot Färbung auszeichnen. Eine besonders intensive Alizarinrot Färbung weist auf ein starkes Knochenwachstum innerhalb dieser Region hin. Darüber hinaus ist ein EGFP Signal in den mesenchymalen Zellen zwischen den Frontalknochen erkennbar sowie in den Pigmentzellen der darüberliegenden Haut (Abbildung18B). Die Ossifikation der Parietalknochen verläuft zu Beginn der Entwicklung des Schädeldachs verhältnismäßig langsam. An den Parietalknochen sind in diesem Stadium keinerlei EGFP positive Zellen erkennbar. In 11mm großen Fischen (ca. 38dpf) ist die Ossifikation der Frontalknochen ebenfalls besonders stark. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Expression EGFP positiver Zellen entlang der osteogenen Fronten der Frontalknochen besonders deutlich zu erkennen (Abbildung18C, C'). Das Wachstum der Frontal- und Parietalknochen ist zu diesem Zeitpunkt bereits so weit fortgeschritten, dass sich die Interfrontalnaht an den posterioren Enden der Frontalknochen formt sowie auch die Koronarnähte an den lateralen Enden, wo die Frontal- und Parietalknochen als erstes aufeinander treffen (Abbildung18C). An diesen Stellen können *tcf12:EGFP* positive Zellen ebenfalls nachgewiesen werden.

Bei einer Gesamtlänge von 12mm (ca. 40dpf) akkumulieren EGFP exprimierende Zellen gehäuft an den Wachstumsfronten der Frontalknochen (Abbildung18D). Das Wachstum der Parietalknochen ist zu diesem Zeitpunkt noch immer deutlich langsamer, als das der

Frontalknochen. An den Wachstumsfronten der Parietalknochen sind vereinzelte EGFP positive Zellen erkennbar.

Während der folgenden Tage treten *tcf12:EGFP* exprimierende Zellen weiterhin gehäuft an den osteogenen Fronten auf und akkumulieren darüber hinaus in den Bereichen des mesenchymalen Gewebes, wo im Folgenden die Interfrontalnaht und die Koronarnähte entstehen (13mm, ca. 45dpf, Abbildung18E, E').



**Abbildung 18: *tcf12:EGFP* Expression während der Entwicklung des Schädeldachs und der Schädelnähte in transgenen Zebrafischen mit einer Gesamtlänge von 8-13mm (30-45dpf).**

Dargestellt sind konfokale Aufnahmen der Schädeldächer (Dorsalansicht) über die Entwicklung hinweg. Mineralisierende Knochenstrukturen wurden *in vivo* mit Alizarinrot angefärbt. Die schematischen Darstellungen illustrieren das Wachstum der Schädelplatten und die Ausbildung der Schädelnähte zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten. Die roten Kästchen markieren den in den Mikroskopaufnahmen von C und E dargestellten Bereich. EGFP Signale, die von Pigmentzellen der überliegenden Haut stammen sind mit einem Sternchen markiert. Maßstab 100µm.

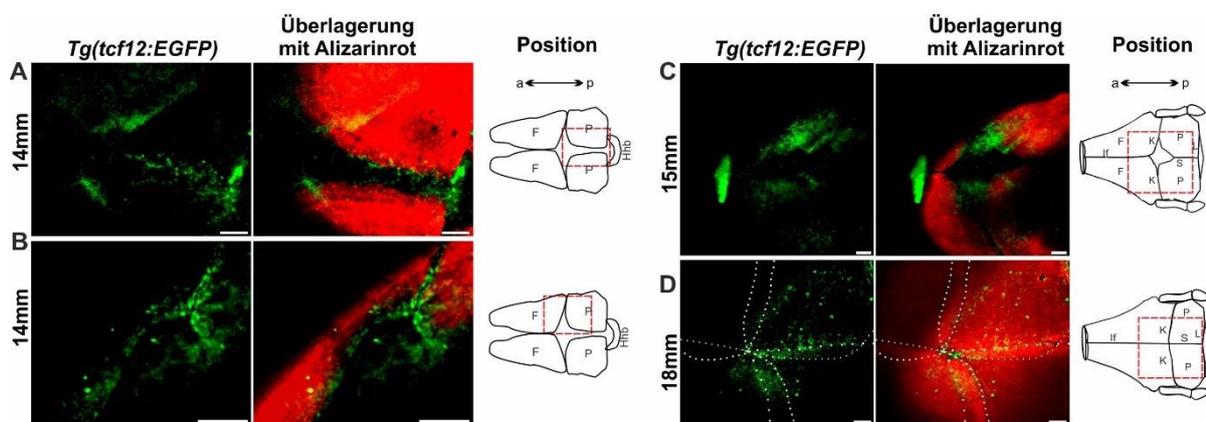
a, anterior; E, Epiphyse; F, Frontalknochen; Hhb, Hinterhauptbein; P, Parietalknochen; p, posterior. Abbildung verändert nach (Blümel et al., 2019).

Die nachfolgende Entwicklung des Schädeldachs zeichnet sich besonders durch ein schnelles Wachstum der Parietalknochen aus. Bei einer Gesamtlänge von 14mm (ca. 50dpf) wachsen die Parietalknochen mittig aufeinander zu und die Sagittalnaht beginnt sich zu formen. Ein starkes EGFP Signal ist an den ossifizierenden Fronten der Parietalknochen erkennbar sowie in der dazwischenliegenden Sagittalnaht (Abbildung 19A). Zu diesem Zeitpunkt haben sich die Koronarnähte lateral bereits geformt und bilden

sich weiter in Richtung der Mittellinie aus (Abbildung 19B). EGFP exprimierende Zellen sind perlschnurartig entlang der Wachstumsfronten der Frontal- und Parietalknochen angeordnet sowie innerhalb der bereits ausgebildeten Koronarnähte.

Im weiteren Verlauf bilden sich die Koronarnähte und die Sagittalnaht in Richtung der Mitte des Schädeldachs aus (15mm, ca. 60dpf), separiert ausschließlich durch die anteriore Fontanelle. In den Schädelplatten und -nähten ist eine EGFP Expression überall dort erkennbar, wo Wachstum stattfindet. Die anteriore Fontanelle hingegen wird von EGFP exprimierenden Zellen ausgespart (Abbildung 19C).

Ab einer Gesamtlänge von 18mm (ca. 90dpf) überlappen die Frontal- und Parietalknochen und alle Schädelnähte sind vollständig ausgebildet. *tcf12:EGFP* positive Zellen sind oberhalb der Schädelplatten sowie innerhalb der Schädelnähte erkennbar, mit einer vergleichsweise geringeren Expression in der Interfrontalnaht (Abbildung 19D). Der überlappende Charakter der Schädelplatten erschwert eine genaue Aussage über die Lage der EGFP exprimierenden Zellen im Bereich der Schädelnähte.



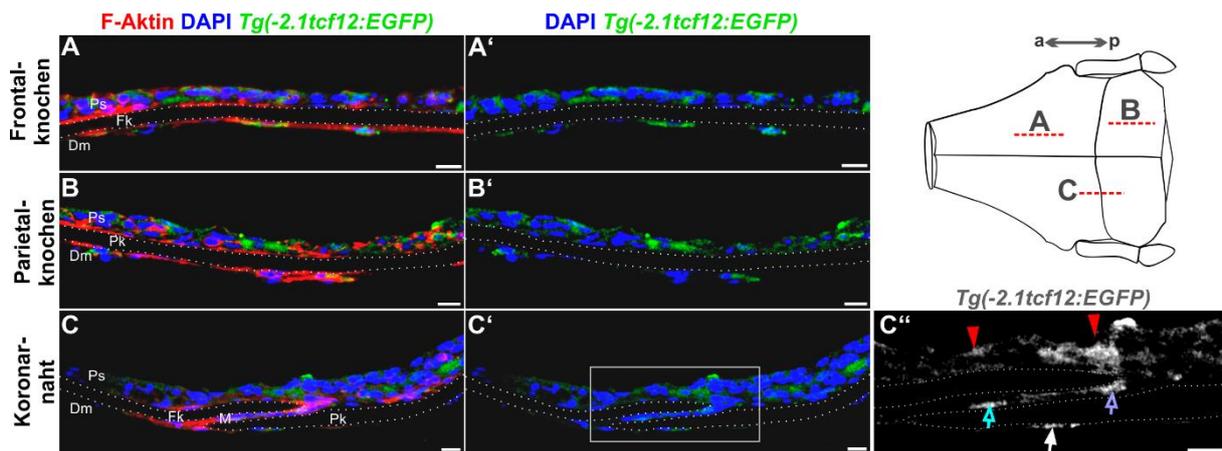
**Abbildung 19: *tcf12:EGFP* Expression während der Entwicklung des Schädeldachs und der Schädelnähte in transgenen Zebrafischen mit einer Gesamtlänge von 14-18mm (50-90dpf).**

Dargestellt sind, ebenso wie in Abbildung 18, konfokale Aufnahmen der Schädeldächer (Dorsalansicht) über die Entwicklung hinweg. Mineralisierende Knochenstrukturen wurden *in vivo* mit Alizarinrot angefärbt. Die schematischen Darstellungen illustrieren das Wachstum der Schädelplatten und die Ausbildung der Schädelnähte zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten. Maßstab 100µm.

a, anterior; F, Frontalknochen; Hhb, Hinterhauptbein; If, Interfrontalnaht; K, Koronarnaht; L, Lambdanaht; P, Parietalknochen; p, posterior S, Sagittalnaht. Abbildung verändert nach (Blümel et al., 2019).

Um eine genaue Aussage über die Expression von *tcf12* in den Schädeldächern adulter Zebrafische treffen zu können, wurden Cryostatschnitte von Schädeldächern transgener *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Fische angefertigt. In diesen wurde das EGFP Signal mit einem

anti-GFP Antikörper detektiert (Abbildung 20). Anhand der Schnitte konnten in den Frontalknochen und in den Parietalknochen *tcf12:EGFP* exprimierende Zellen im Periost und in einzelnen Zellen der *Dura mater* nachgewiesen werden (Abbildung 20A,A' und B, B'). Die Schnittpräparate durch die Koronarnaht offenbaren neben der Expression im Periost und der *Dura mater* auch EGFP exprimierende Zellen im Mesenchym der Sutura und an den Enden der Frontalknochen (Abbildung 20 C-C'').



**Abbildung 20: Lokalisation EGFP exprimierender Zellen entlang der Schädelknochen und im Bereich der Sutura in transgenen Zebrafischen**

Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von IHC-Färbungen an Cryostatschnitten adulter *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Fische. Schnittpräparate wurden von den Frontalknochen (A, A'), Parietalknochen (B, B') und der Koronarnaht (C-C'') angefertigt. Zum Nachweis EGFP positiver Zellen wurden die Präparate mit einem anti-GFP Antikörper (grün) gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Phalloidin (F-Aktin, rot) zur Visualisierung der Zellstrukturen und mit DAPI (blau) zum Nachweis der Zellkerne. C''' stellt eine Vergrößerung des markierten Bereichs in C' dar. Die unterschiedlichen Zelltypen, bei denen ein GFP Signal detektiert wurde, sind mit verschiedenfarbigen Pfeilen markiert: Zellen des Periosts: rot; *Dura mater*: weiß; Mesenchym der Koronarnaht: blau; Zellen an der Spitze der osteogenen Front: violett. Maßstab 10µm.

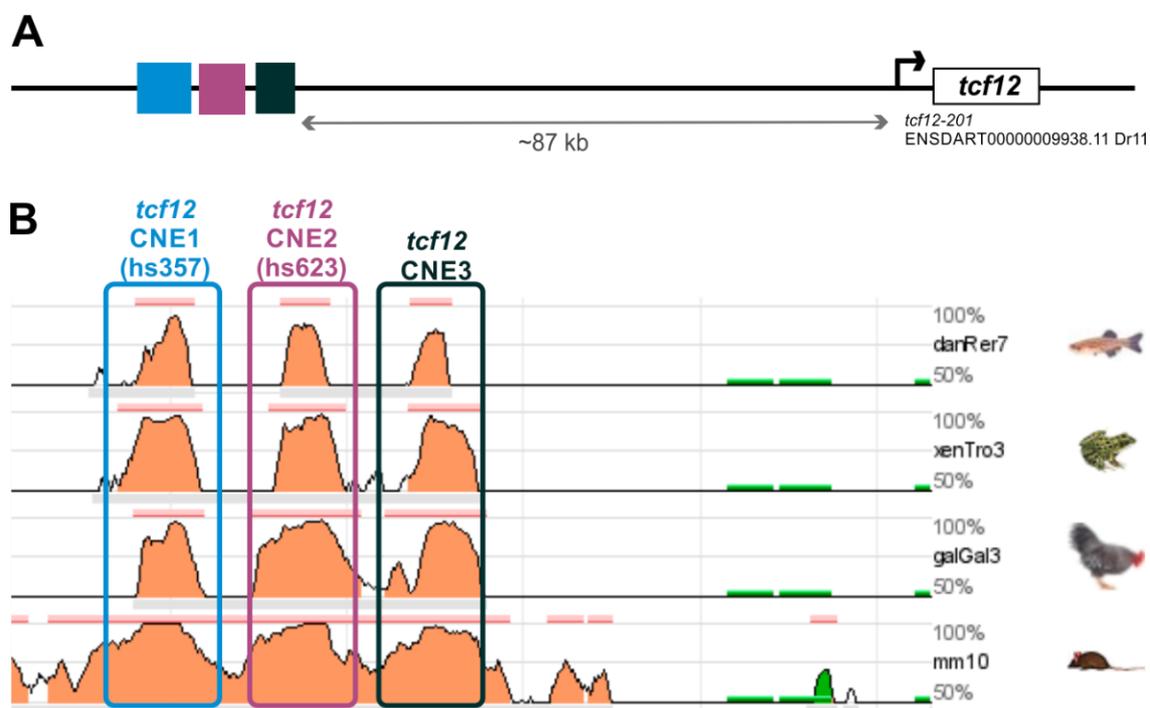
a, anterior; Dm, *Dura mater*; Fk, Frontalknochen; p, posterior; Pk, Parietalknochen; Ps, Periost; M, Mesenchym. Abbildung verändert nach (Blumel et al., 2019).

### 3.2 Analysen potentieller *tcf12* Enhancer Elemente im Zebrafisch

Nachdem durch eine genaue Charakterisierung der *tcf12:EGFP* Reportergermlinien die räumliche und zeitliche *tcf12* Expression im Zebrafisch ermittelt werden konnte, sollten im nächsten Schritt mit Hilfe der transgenen Fische drei potentielle *tcf12* Enhancer Elemente analysiert werden.

Mit Hilfe des VISTA Enhancer Browsers (Visel et al., 2007) konnten zwei hoch konservierte nicht kodierende Elemente im menschlichen Genom (Hs357 mit einer Größe

von 714bp und Hs623 mit 219bp) identifiziert werden, welche innerhalb des *TCF12* Genlokus lokalisiert sind. Für beide Elemente wurden im Rahmen experimenteller *in vivo* Studien für die VISTA Enhancer Datenbank (Pennacchio et al., 2006) transgene Mäusen generiert, bei denen eine spezifische neuronale Enhancer Aktivität für beide Elemente nachgewiesen werden konnte (Entwicklungsstadium E11.5; Abbildung 22B, C). Die beiden CNEs werden im Folgenden als *tcf12*-CNE1 (für Hs357) und *tcf12*-CNE2 (für Hs623) bezeichnet. Mit dem ECR browser (Ovcharenko et al., 2004) ließ sich zusätzlich ein drittes potentiell Enhancer Element identifizieren, welches in unmittelbarer Nähe zu *tcf12*-CNE1 und *tcf12*-CNE2 liegt (siehe Abbildung 21). Dieses dritte Element wurde bisher nicht experimentell untersucht und wird im Folgenden als *tcf12*-CNE3 bezeichnet. Alle drei CNEs zeichnen sich durch eine sehr hohe Konservierung (80%) zwischen Mensch, Maus, Frosch, Huhn und Zebrafisch aus und sind ca. 87kb 5' des Haupttranskriptes des *tcf12* Gens (*tcf12*-201 ENSDART00000009938.11) lokalisiert (Abbildung 21). Um eine mögliche Enhancer Aktivität der CNEs im Zebrafisch zu untersuchen, wurden für alle drei Elemente jeweils transgene Zebrafischlinien generiert (siehe Kapitel 2.2.3.7 und 2.2.4.1). Eine Analyse der GFP Expression erfolgte an 3dpf alten Zebrafischembryonen. Die Expressionsmuster wurden denen der Mausedembryonen der VISTA Enhancer Datenbank gegenübergestellt (Abbildung 22).



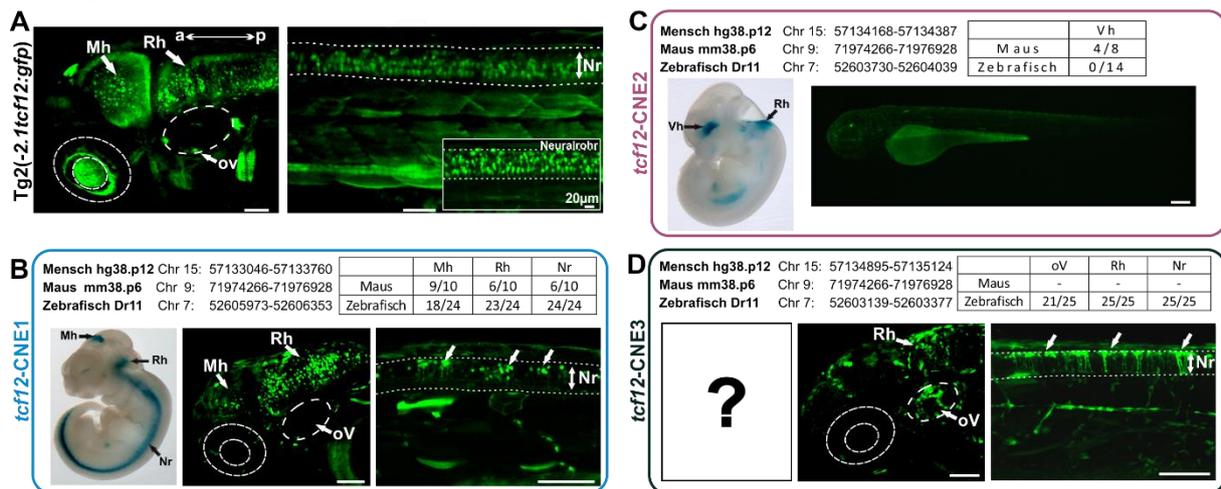
**Abbildung 21:** Schematische Darstellung der Lage und Konservierung der drei analysierten *tcf12*-CNEs

(A) Die drei potentiellen *tcf12* Enhancer Elemente (*tcf12*-CNE1-3) befinden sich in unmittelbarer Nähe zueinander und sind ca. 87kb 5' des *tcf12* Gens (Transkript *tcf12*-201 ENSDART0000009938.11) lokalisiert. (B) Ein Alignment der CNEs mittels ECR Browser (Ovcharenko et al., 2004) zeigt die hohe Konservierung der Elemente vom Menschen zur Maus, dem Huhn, dem Frosch und dem Zebrafisch. Abbildung verändert nach (Blümel et al., 2019).

Die von Visel et al. durchgeführten experimentellen Untersuchungen der *in vivo* Enhancer Aktivität von *tcf12*-CNE1 in transgenen Mäusen zeigten eine besonders deutliche Expression im Mittelhirn der analysierten Mäuse (9 von 10 Embryonen; Abbildung 22B) Visel et al. (2007). Des Weiteren konnte eine Expression im Rautenhirn und im Neuralrohr nachgewiesen werden (6/10 Mäusen). Die *in vivo* Studien von *tcf12*-CNE1 im Zebrafisch ergaben ebenfalls eine starke Expression im Mittelhirn (18/24 Fischen) und im Rautenhirn (23/24). Darüber hinaus konnte bei allen untersuchten Fischen (24/24) eine deutliche EGFP Expression im Neuralrohr detektiert werden (Abbildung 22B). Die *tcf12*-CNE1:EGFP Fische (Abbildung 22B) zeigen deutlich mehr EGFP positive Neurone im posterior gelegenen Teil des Rautenhirns und im dorsalen Bereich des Neuralrohrs als die *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Fische (Abbildung 22A). Übereinstimmende Expressionsmuster zeigen beide transgene Linien im anterioren Teil des Rautenhirns sowie in Neuronen des Mittelhirns (Abbildung 22A, B).

Das konservierte Element *tcf12*-CNE2 konnte in Mäusen als Enhancer Element für Neurone des Vorderhirns identifiziert werden (4/8 Individuen; Abbildung 22C). In Zebrafischen zeigte *tcf12*-CNE2 keinerlei Enhancer Aktivität (0/14).

*tcf12*-CNE3 wurde in Mäusen bisher nicht experimentell untersucht. In transgenen Zebrafischen treibt dieses Element eine starke Expression im Rautenhirn und im Neuralrohr in allen untersuchten Individuen (25/25; Abbildung 22D). Darüber hinaus sind viele EGFP positive Neurone im Bereich des otischen Vesikels bei 21 von 25 untersuchten Zebrafischen erkennbar. Die sehr charakteristischen Expressionsmuster im Neuralrohr und dem otischen Vesikel der transgenen *tcf12*-CNE3 Fische sind in *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Individuen nicht detektierbar (vgl. Abbildung 22A). Die EGFP Expression im Rautenhirn hingegen ist in beiden transgenen Linien erkennbar.



**Abbildung 22: *in vivo* Analyse der drei potentiellen *TCF12* Enhancer Elemente *tcf12-CNE1-3* im Zebrafisch**

(A) Fluoreszenzaufnahmen der EGFP Expression im Kopf und Rumpf von 3dpf alten *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Fischen. (B-D) Vergleichende Darstellung der transient transgenen Zebrafische für die Elemente *tcf12-CNE1-3* mit den *Whole-mount lacZ* Färbungen transgener Mäuse aus dem VISTA Enhancer Browser, sofern vorhanden (Visel et al., 2007). *tcf12-CNE3* wurde bisher nicht experimentell in Mäusen getestet. Eine Gegenüberstellung der genomischen Position der untersuchten Expressionsorte und der Anzahl der untersuchten Mäuse und Zebrafische lässt sich jeweils den Tabellen entnehmen. Maßstab 50µm sofern nicht anders angegeben.

a, anterior; Rh, Rautenhirn; Mh, Mittelhirn; Nr, Neuralrohr; oV, otisches Vesikel; p, posterior. Abbildung verändert nach (Blümel et al., 2019).

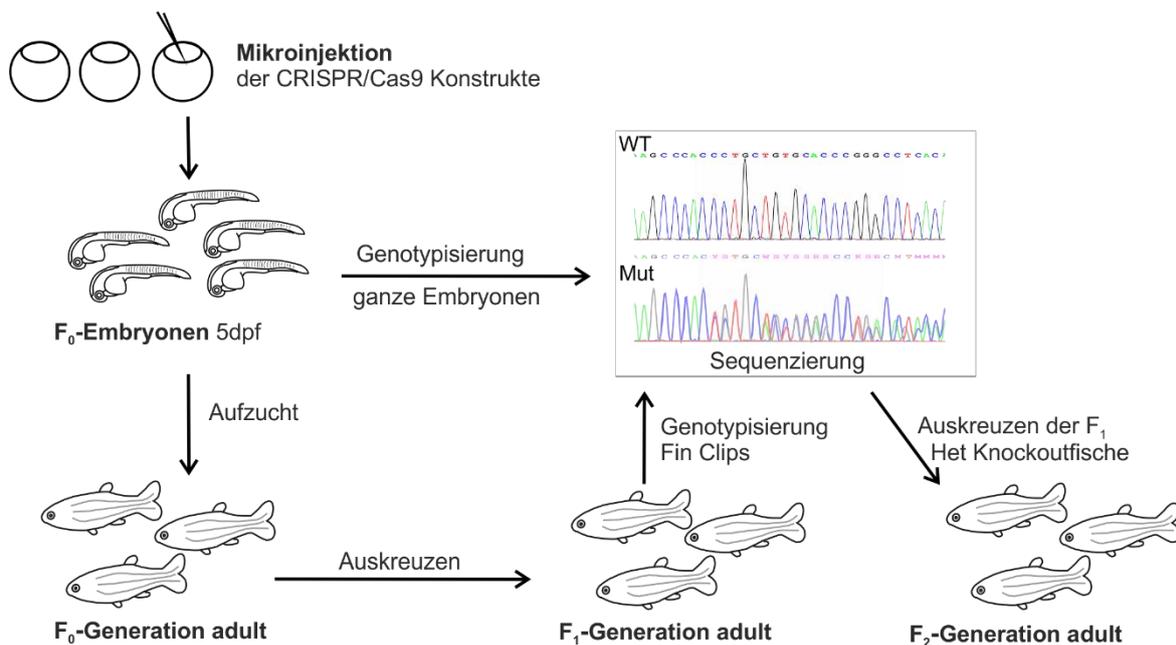
### 3.3 Die Auswirkung von *tcf12* und *twist1* Knockouts auf den Zebrafisch

Neben der Generierung transgener *tcf12:EGFP* Zebrafischlinien bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, Zebrafisch Knockout-Linien mit Mutationen in den Genen *tcf12* und *twist1a/b* zu generieren. In diesen Knockout-Linien sollte die Auswirkung der Mutationen auf die Entwicklung der Schädelnähte des Zebrafisches untersucht werden. Dabei lag ein besonderes Augenmerk auf der Fragestellung, ob im Zebrafisch, wie beim Menschen, der Verlust von *tcf12* alleine oder, wie bei Mäusen, ein kombinatorischer Verlust von *tcf12* und *twist1* zu Defekten der Schädelentwicklung führen kann.

#### 3.3.1 Etablierung und Analyse verschiedener *tcf12* Knockout-Linien

In Abbildung 23 ist die Etablierung von CRISPR/Cas9 Knockout-Linien schematisch dargestellt. Die Herstellung der sgRNA Konstrukte ist ausführlich in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben. Mittels Mikroinjektionen wurden die klonierten sgRNA Konstrukte gemeinsam mit *Cas9* mRNA in Zebrafischembryonen der Wildtypstämme AB oder

mitfa<sup>w2/w2</sup>; mpv17<sup>b18/b18</sup> eingebracht (siehe Kapitel 2.2.4.1). Um die Funktionalität des Knockouts mit der jeweiligen sgRNA zu überprüfen, wurden die gDNAs von acht injizierten 5dpf alten Zebrafischlarven extrahiert und der CRISPR-Ziellokus jedes Embryos sequenziert. Nur wenn eine klare Sequenzveränderung des Ziellokus in Form von Doppelbanden in der Sequenzierung nachgewiesen werden konnte, wurden die restlichen injizierten Embryonen großgezogen (siehe Abbildung 23). Die Doppelbanden entstehen durch eine Überlagerung der wildtypischen DNA-Sequenz mit der mutierten Sequenz, wodurch bei der Sequenzierung ab der Mutationsstelle jeweils zwei Fluoreszenzsignale detektiert werden. Die Fische der F<sub>0</sub>-Generation wurden ausgekreuzt und die Nachkommen (F<sub>1</sub>-Generation) ebenfalls großgezogen. Sofern die Keimzellen der adulten F<sub>0</sub>-Fische eine Mutation in der jeweiligen Zielsequenz aufweisen, kann diese an die Nachkommen der F<sub>1</sub>-Generation weitergegeben werden. Mittels *Fin Clips* wurden die adulten F<sub>1</sub>-Fische genotypisiert und die heterozygoten Knockout Fische untereinander gekreuzt, um neben wildtypischen und heterozygoten auch homozygote Nachkommen zu erhalten.



**Abbildung 23: Übersicht der Generierung von Zebrafisch Knockout-Linien mit dem CRISPR/Cas9 System**

Die CRISPR/Cas9 Konstrukte werden via Mikroinjektionen in Zebrafischembryonen im Einzellstadium injiziert. Durch eine Genotypisierung 5dpf alter injizierter F<sub>0</sub>-Embryonen wird ein erfolgreicher Knockout bestätigt. Dieser zeigt sich im Chromatogramm der Sequenzierung in Form von Doppelbanden (im unteren Chromatogramm dargestellt). Die restlichen injizierten Fische werden großgezogen und ausgekreuzt. Die Nachkommen (F<sub>1</sub>-Generation) werden ebenfalls großgezogen und mittels *Fin Clips* auf eine heterozygote Mutation im Zielgen hin untersucht. Diese ist ebenfalls in Form von Doppelbanden im Chromatogramm nachweisbar. Nachweislich heterozygote Fische werden untereinander gekreuzt, sodass sich unter den Nachkommen (F<sub>2</sub>-Generation) nach Mendel zu 25% auch homozygote Individuen befinden.

Da der Hauptfokus dieser Arbeit auf Analysen des *tcf12* Gens liegt, wurden mehrere Knockout-Linien mit Mutationen an unterschiedlichen Positionen des *tcf12* Gens etabliert. Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, ob die verschiedenen Mutationen, je nach Lage innerhalb der kodierenden Sequenz, unterschiedliche phänotypische Auswirkungen insbesondere auf die Entwicklung der Schädelnähte der Zebrafische zeigen.

Aus diesem Grund wurden insgesamt vier verschiedene sgRNA Konstrukte gegen verschiedene Exons (Exon 6, 8, 11 und 12) des *tcf12* Gens hergestellt (siehe Abbildung 24A). Die einzelnen Zielsequenzen für die sgRNAs sind in Anhang A gelistet.

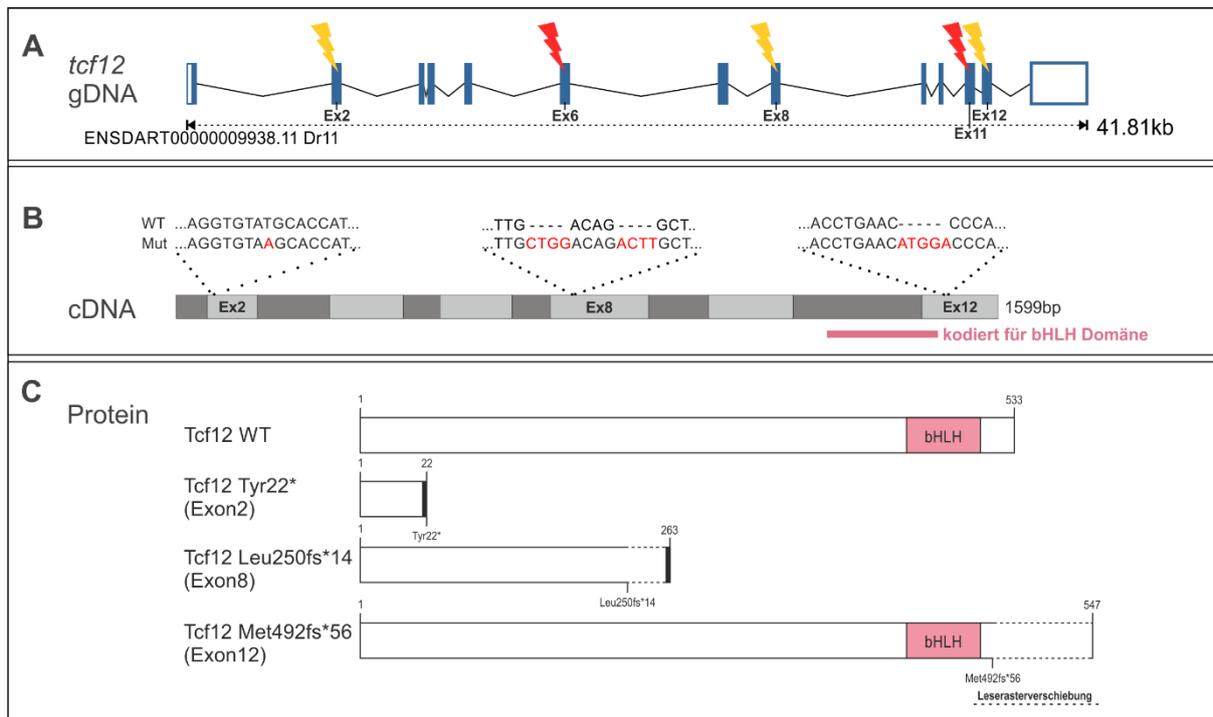
Nach mehreren Injektionen der sgRNAs, die gegen die Zielsequenzen auf Exon 6 und Exon 11 gerichtet sind, konnte keine Sequenzveränderung in den injizierten Embryonen festgestellt werden, wodurch eine Etablierung von Knockout-Linien mit Mutationen in diesen Exons nicht möglich war. Eine Generierung von Knockout-Linien mit Mutationen in den Exons 8 und 12 hingegen war erfolgreich. Die Knockout-Linie *tcf12*<sup>sa14175/+</sup> wurde zusätzlich von dem *Zebrafish International Resource Center* bezogen (siehe Kapitel 2.1.1). Die heterozygoten Fische wurden ebenso wie die selbst generierten Knockout-Linien aufgezogen und zu stabilen Knockout-Linien ausgekreuzt (siehe Abbildung 23).

Abbildung 24 zeigt eine Übersicht der im Zuge dieser Arbeit etablierten *tcf12* Knockout-Linien, die für Analysen der Entwicklung der Schädelnähte verwendet wurden. Die Knockout-Linie *tcf12*<sup>sa14175/+</sup> besitzt in Exon2 die Nonsense-Mutation c.66T>A, die zu einem C-terminal trunkeierten Protein von 22 AA Länge (p.Tyr22\*) und dem Verlust der bHLH Domäne führt (siehe Abbildung 24C).

Der Knockout mittels CRISPR/Cas9 gegen *tcf12* Exon8 führte zu zwei Insertionen von je vier Basenpaaren innerhalb der Zielregion (c.[754\_755insCTGG; 758\_759insACTT]). Diese Insertionen haben eine Leserasterverschiebung zur Folge, die nach 14AA ebenfalls zu einem frühzeitigen Stopcodon führt (Leu250fs\*14; siehe Abbildung 24B, C). Auch bei diesem mutierten Tcf12 Protein fehlt die bHLH Domäne.

Der CRISPR/Cas9 Knockout gegen Exon12 verursachte eine Insertion von 5bp Länge (c.1473\_1474insATGGA). Diese geht mit einer Leserasterverschiebung einher, die nach 56 AA zu einem Stopcodon führt, das sich innerhalb der 3'-UTR Region befindet (Met492fs\*56). Da die Mutation erst hinter der bHLH Domäne gelegen ist, ist diese noch

vollständig vorhanden. Das gebildete Protein ist um 14AA länger als das wildtypische Tcf12 Protein (siehe Abbildung 24C).



**Abbildung 24: Übersicht der Mutationen der *tcf12* Knockout-Linien**

(A) Übersicht der verschiedenen CRISPR Ziele innerhalb des *tcf12* Gens (Blitze). sgRNAs wurden für Zielregionen in den Exons 6, 8, 11 und 12 hergestellt. Nach mehreren Injektionen der sgRNAs gegen die Exons 6 und 11 konnte keine Sequenzveränderung nachgewiesen und somit keine stabilen Knockout-Linien mit Mutationen in diesen Exons etabliert werden (rote Blitze). Für die sgRNAs mit Zielregionen auf den Exons 8 und 12 konnten Knockout-Linien etabliert werden. Die Knockout-Linie *tcf12<sup>sa14175/+</sup>* (Mutation in Exon2) wurde vom ZIRC bezogen. (B) Darstellung der Mutationen auf cDNA Ebene. Die Mutation in Exon2 c.66T>A ist eine Punktmutation. Bei den mittels CRISPR/Cas9 eingebrachten Knockout-Mutationen in Exon8 (c. [754\_755insCTGG; 758\_759insACTT]) und 12 (c.1473\_1474insATGGA) handelt es sich um Insertionen. (C) Mutmaßliche Auswirkung der Mutationen auf Proteinebene. Die Nonsense-Mutation c.66T>A in Exon 2 führt zu einem trunkeierten 22 AA langen Protein, das keine bHLH Domäne mehr besitzt. Die zwei 4bp Insertionen in Exon 8 führen zu einer Leserasterverschiebung mit einem verfrühten Stopcodon nach 14 AA. Dadurch entsteht ein verkürztes Protein, dem ebenfalls die bHLH Domäne fehlt. Die 5bp Insertion in Exon12 befindet sich kurz hinter der Region, die für die bHLH Proteindomäne kodiert. Sie führt zu einer Leserasterverschiebung, die nach 56 AA zu einem Stopcodon führt. Dadurch wird ein 547 AA langes Protein mit einer vollständigen bHLH Domäne gebildet.

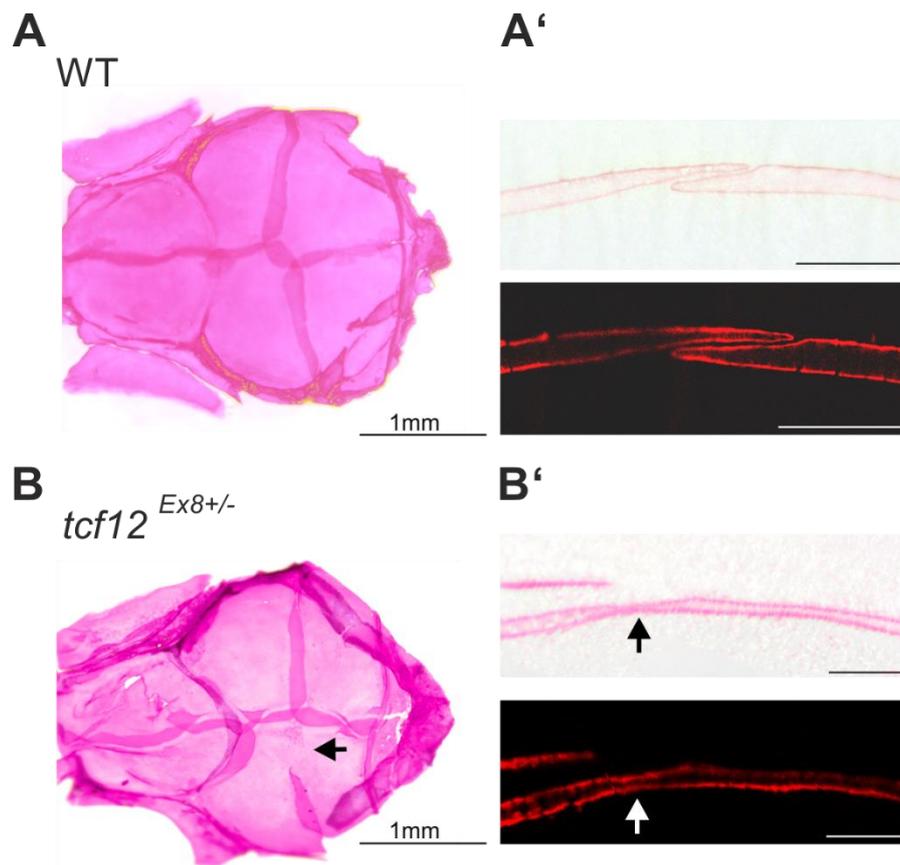
Die Schädeldächer adulter Zebrafische aller Knockout-Linien wurden von der F<sub>1</sub>-Generation an auf Fusionen innerhalb der Schädelnähte hin untersucht. Dazu wurden die Knochen durch Inkubation der Fische in einer Alizarinrot-Lösung sichtbar gemacht, die Fische im Anschluss betäubt und die Schädelplatten unter einem Konfokalmikroskop betrachtet. Vor den Analysen der Knockout-Linien erfolgte zunächst eine Untersuchung der Schädeldächer von jeweils 20 Individuen der für die Generierung verwendeten

Wildtypstämme AB und *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv17*<sup>b18/b18</sup>. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Analysen ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Zusammenfassung der Untersuchung der WT und *tcf12* Knockout-Linien zu Auffälligkeiten innerhalb der Schädelnähte**

Linie	untersuchte Individuen	Detektion von Fusionen innerhalb der			Anomalien der Schädelplatten
		Interfrontalnaht	Koronarnaht	Sagittalnaht	
WT AB	20	0	0	0	0
WT <i>mitfa</i> <sup>w2/w2</sup> ; <i>mpv17</i> <sup>b18/b18</sup>	20	0	0	0	0
<i>tcf12</i> <sup>Ex8F0</sup>	10	0	0	0	0
<i>tcf12</i> <sup>Ex12 F0</sup>	10	0	0	0	0
<i>tcf12</i> <sup>sa14175/+</sup>	20	0	0	0	0
<i>tcf12</i> <sup>Ex8+/-</sup>	29	0	2	0	16
<i>tcf12</i> <sup>Ex12+/-</sup>	21	0	0	0	15
<i>tcf12</i> <sup>sa14175/sa14175</sup>	15	0	0	0	0
<i>tcf12</i> <sup>Ex8-/-</sup>	letal	-	-	-	-
<i>tcf12</i> <sup>Ex12-/-</sup>	10	0	0	0	7

Bei keinem der wildtypischen Fische wurden Fusionen innerhalb der Schädelnähte detektiert. Bei den CRISPR/Cas9 Knockout-Linien *tcf12*<sup>Ex8</sup> und *tcf12*<sup>Ex12</sup> wurden bereits Individuen der F<sub>0</sub>-Generation untersucht. Diese Fische zeigten keinerlei phänotypische Auffälligkeiten. Die Entwicklung der Schädelnähte glich denen der wildtypischen Fische. Die analysierten heterozygoten Fische der beiden Linien *tcf12*<sup>sa14175/+</sup> und *tcf12*<sup>Ex12+/-</sup> zeigten keinerlei Verknöcherungen innerhalb der Schädelnähte. Bei der Knockout-Linie *tcf12*<sup>Ex8+/-</sup> hingegen waren bei zwei der 29 analysierten heterozygoten Fischen partielle unilaterale Fusionen innerhalb der Koronarnaht sichtbar (7%, N=2/29, siehe Abbildung 25B). Histologische Schnitte bestätigten die partielle Fusion der Koronarnaht (Pfeile in Abbildung 25B).



**Abbildung 25: Partielle unilaterale Fusion innerhalb der Koronarnäht eines *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* Fisches.**

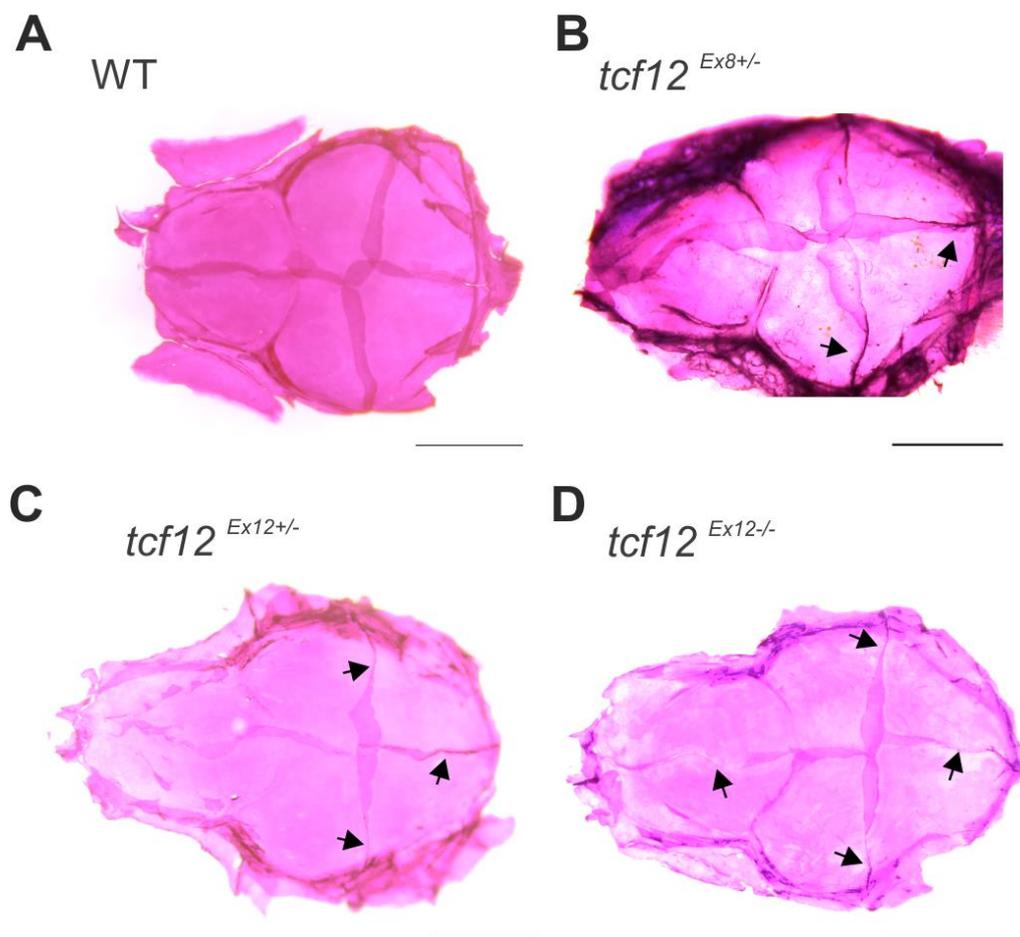
Dargestellt ist eine Gegenüberstellung präparierter Schäeldächer eines wildtypischen Fisches (A) sowie einer *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* Mutante (B) nach Alizarinrot Färbung. Ein Schnitt durch die Koronarnäht des wildtypischen Fisches nach Einbettung der Schäeldächer in Epon lässt den natürlichen überlappenden Charakter der Schädelplatten im Bereich der Schädelnähte erkennen (A'). Der *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* Fisch besitzt eine unilaterale Fusion innerhalb der linken Koronarnäht (Pfeil). Schnitte durch die Koronarnäht bestätigen die Fusion der Schädelnaht (B'). Die Ursprüngliche Lage der Sutur ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Schnitte (A' und B') wurden jeweils unter einem Lichtmikroskop (oben) und unter einem Konfokalmikroskop (unten) aufgenommen. Maßstab 50µm, sofern nicht anders angegeben.

Weitere Auffälligkeiten ließen sich bei den untersuchten *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* und *tcf12<sup>Ex12+/-</sup>* Knockout Fischen in Form einer fehlenden Überlappung der Schädelplatten im Bereich der Schädelnähte erkennen (siehe Pfeile in Abbildung 26C, D). Bei wildtypischen Fischen ist eine klare Überlappung der Schädelplatten im Bereich der Schädelnähte erkennbar (vgl. Abbildung 26A). Eine fehlende Überlappung konnte bei den heterozygoten *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* und *tcf12<sup>Ex12+/-</sup>* Fischen in unterschiedlich starken Ausprägungen beobachtet werden. Während bei manchen Fischen nur eine Naht betroffen war, sind bei anderen Fischen alle Schädelnähte betroffen (vgl. Abbildung 26D). Die Anomalie konnte bei 55% (N=16/29) der untersuchten *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* und bei 71% (N=15/21) der *tcf12<sup>Ex12+/-</sup>* Knockout Fische

beobachtet werden, nicht jedoch bei heterozygoten Fischen der Linie *tcf12<sup>sa14175/+</sup>* (N=0/20). Diese Anomalien gingen nicht mit Fusionen der Schädelnähte einher. Von den Schädelplatten, die diese Anomalien zeigten wurden keine Schnitte angefertigt.

Bei der Knockout-Linie *tcf12<sup>Ex8</sup>* zeigte sich, dass die mittels CRISPR/Cas9 eingebrachten Insertionen im homozygoten Zustand letal sind. Eine Genotypisierung von 16 4dpf alten Embryonen der F<sub>2</sub>-Generation, die Kreuzungen zweier *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* F<sub>1</sub>-Fischen entstammten, offenbarten ein Genotyp-Verhältnis von WT:Het:Homo von 3:7:6. Eine Genotypisierung von 16 Embryonen zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt von 14 Tagen zeigte, dass sich das Verhältnis deutlich verschoben hat: 10:6:0. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt waren bereits alle homozygoten *tcf12<sup>Ex8/Ex8</sup>* Mutanten an schweren Herzdefekten gestorben.

Bei den Linien *tcf12<sup>sa14175</sup>* und *tcf12<sup>Ex12</sup>* hingegen war eine Generierung homozygoter Mutanten erfolgreich. Bei homozygoten *tcf12<sup>sa14175/sa14175</sup>* Fischen (N=15) konnten, wie zuvor bei den heterozygoten Mutanten, keine Anomalien oder Fusionen in den Schädelnähten festgestellt werden. Bei einigen der homozygoten *tcf12<sup>Ex12/Ex12</sup>* Mutanten hingegen konnte, ebenso wie zuvor bei den heterozygoten Mutanten, eine Fehlende Überlappung der Schädelplatten im Bereich der Schädelnähte festgestellt werden (siehe Pfeile in Abbildung 26F). Dabei zeigt sich diese fehlende Überlappung ebenso divers wie bei den heterozygoten Fischen und wies mit 70% (N=7/10) eine vergleichbare Penetranz auf (71% bei *tcf12<sup>Ex12/+</sup>* Mutanten).



**Abbildung 26: Auffällige Schädelphänotypen der *tcf12* Knockout-Linien**

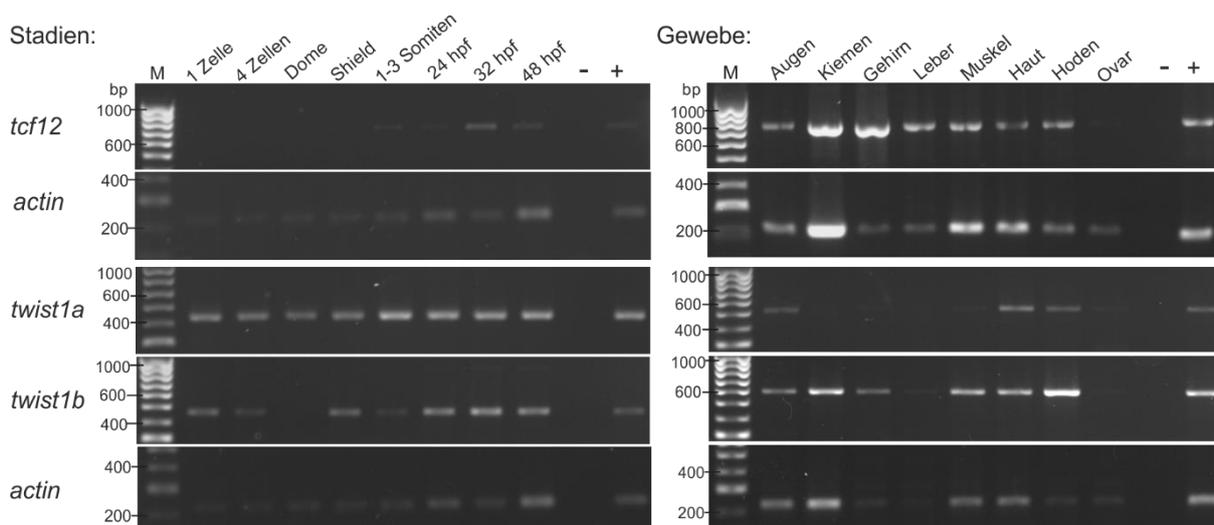
Dargestellt ist eine Gegenüberstellung präparierter Schäeldächer heterozygoter und homozygoter Individuen der *tcf12<sup>Ex8</sup>* und *tcf12<sup>Ex12</sup>* Knockout-Linien sowie eines Wildtyp Fisches. (A) Bei dem wildtypischen Fisch ist eine Überlappung der Schädelplatten innerhalb der Regionen aller Suturen erkennbar. Bei einigen Fischen der Linien *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* (B) und *tcf12<sup>Ex12+/-</sup>* (C) ist eine fehlende Überlappung der Schädelplatten in den Bereichen der Schädelnähte erkennbar (Pfeile). Diese Anomalie beschränkte sich nicht nur auf die Koronarnaht, sondern konnte in allen Suturen beobachtet werden. (D) Auch einige der homozygoten *tcf12<sup>Ex12-/-</sup>* Fische zeigten diese Anomalien (Pfeile).

Zusammenfassend gehen die verschiedenen Mutationen mit einer unterschiedlichen Pathogenität der Zebrafische einher. Während heterozygote oder homozygote Mutanten der Linie *tcf12<sup>sa1417</sup>* und *tcf12<sup>Ex12</sup>* keine Kraniosynostosen entwickeln, bilden *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* Fische in seltenen Fällen partielle Fusionen innerhalb der Koronarnaht aus. Eine homozygote Mutation in Exon 8 führt zur Letalität der Embryonen innerhalb der ersten 14 Tage der Embryonalentwicklung. Sowohl heterozygote Mutanten der Linien *tcf12<sup>Ex8+/-</sup>* und *tcf12<sup>Ex12+/-</sup>*, als auch homozygote *tcf12<sup>Ex12/Ex12</sup>* Mutanten weisen Anomalien des Wachstums der Schädelplatten im Bereich der Schädelnähte auf, die sich sehr variabel ausprägen.

### 3.3.2 Etablierung und Analyse von *twist1a* und *twist1b* Knockout-Linien

Ebenso wie bei *tcf12* wurde für die Gene *twist1a* und *twist1b* zunächst ein endogener Nachweis der Expression mittels PCR-Analysen und *Whole-mount* RNA *in-situ* Hybridisierungen erbracht (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Die Expressionsmuster wurden hinsichtlich Gemeinsamkeiten und Unterschiede mit denen von *tcf12* verglichen (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 12).

Während eine erste klare Expression von *tcf12* erst ab dem 1-3-Somiten-Stadium (entspricht 10-11hpf) nachgewiesen werden konnte, ist sowohl bei *twist1a* als auch bei *twist1b* ein klarer Expressionsnachweis bereits ab dem Einzellstadium möglich (siehe Abbildung 27). Die Expression beider *twist1* Gene kann, mit Ausnahme des Dome Stadiums (entspricht 4,3hpf) bei *twist1b*, in allen folgenden untersuchten Stadien detektiert werden. Bei den analysierten Geweben zeigt *twist1b* ein breiteres Expressionsspektrum als *twist1a*. *twist1b* kann, mit Ausnahme von dem Ovar, in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27). Die PCR-Bande zum Nachweis der Expression in der Leber ist nur sehr schwach zu erkennen. Auch bei der *actin* Kontrolle ist die PCR-Bande für die Expression in der Leber und dem Ovar nur sehr schwach erkennbar, was für eine geringe Konzentration der eingesetzten cDNAs für diese Gewebe spricht. Eine Expression von *twist1a* wurde nur in Augen, Haut, Hoden und Ovar adulter Zebrafische nachgewiesen.

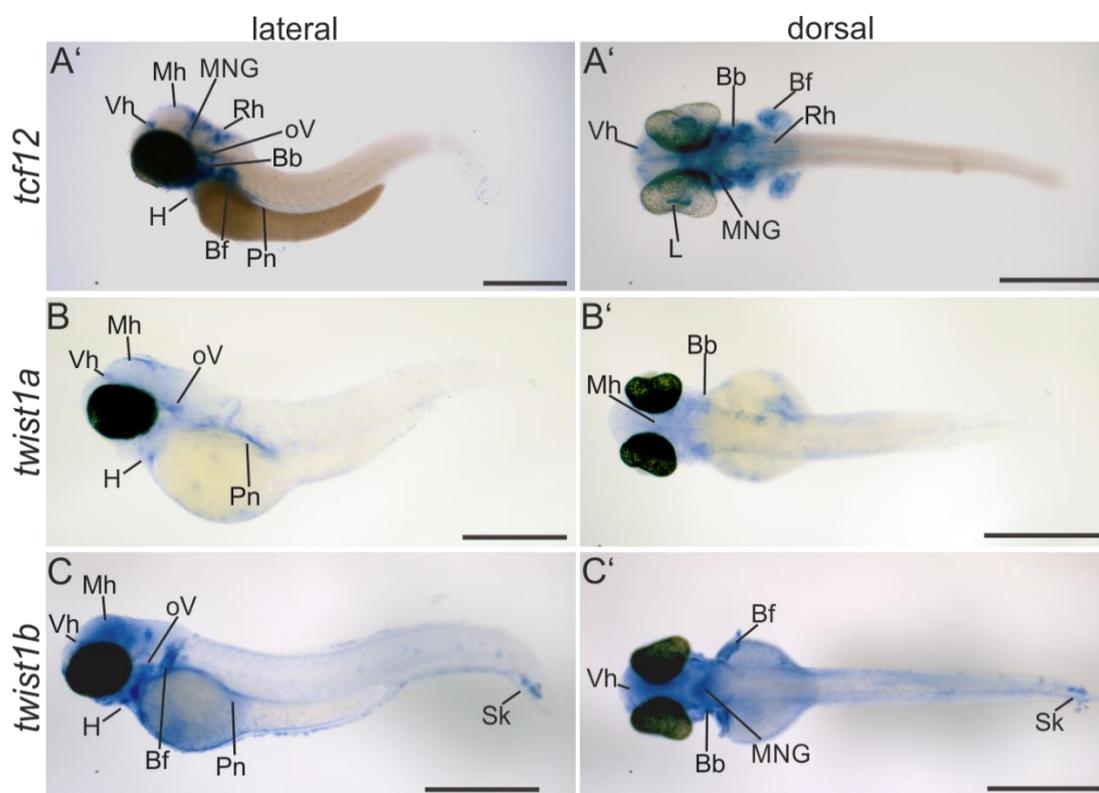


**Abbildung 27: Vergleich der endogenen Expression von *twist1a* und *twist1b* mit *tcf12* in verschiedenen Stadien und Geweben des Zebrafisches**

Gegenüberstellung der Expression der drei Gene in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben adulter Zebrafische. Für die Analyse der unterschiedlichen Stadien wurden cDNA-Templates genutzt, welche aus RNAs von Individuen der jeweiligen Stadien bzw. aus Geweben

adulter Zebrafische gewonnen wurden. Als Positivkontrolle (+) diente ein Mix aller verwendeten cDNAs als Template für die PCR-Reaktion, bei der Negativkontrolle (-) wurde dem Ansatz keine cDNA zugesetzt. Als Größenstandard diente ein 100bp Marker (M).

Im Anschluss an die PCR Analysen wurde das Expressionsmuster der *in-situ* Hybridisierung an 72hpf alten Zebrafischembryonen von *tcf12* dem der beiden *twist1* Gene gegenübergestellt (siehe Abbildung 28). Auf den ersten Blick ist ersichtlich, dass alle drei Gene zu diesem Entwicklungszeitpunkt hauptsächlich im Kopfbereich des Zebrafisches exprimiert werden. Ebenfalls deutlich ist, dass *twist1b* auch in 72hpf alten Embryonen eine breitere Expression als *twist1a* besitzt (siehe Abbildung 28B-C'). Es lassen sich gemeinsame Expressionsmuster aller drei Gene in Vorder- und Mittelhirn, Herz, otischem Vesikel, Branchialbögen und Pronephros nachweisen. *twist1b* und *tcf12* weisen darüber hinaus eine gemeinsame Expression innerhalb der Brustflossen und der Mittelnachhirn Grenze auf (siehe Abbildung 28A' und C'). Eine Expression im Rautenhirn ist weder bei *twist1a*, noch bei *twist1b* in diesem Stadium klar erkennbar. Bei *twist1b* liegt, im Gegensatz zu *tcf12* und *twist1a*, eine Expression in der Schwanzknospe vor (siehe Abbildung 28C und C'). Über eine Expression von *twist1a/b* in der Augenlinse kann aufgrund der starken Pigmentierung der Augen keine Aussage getroffen werden.



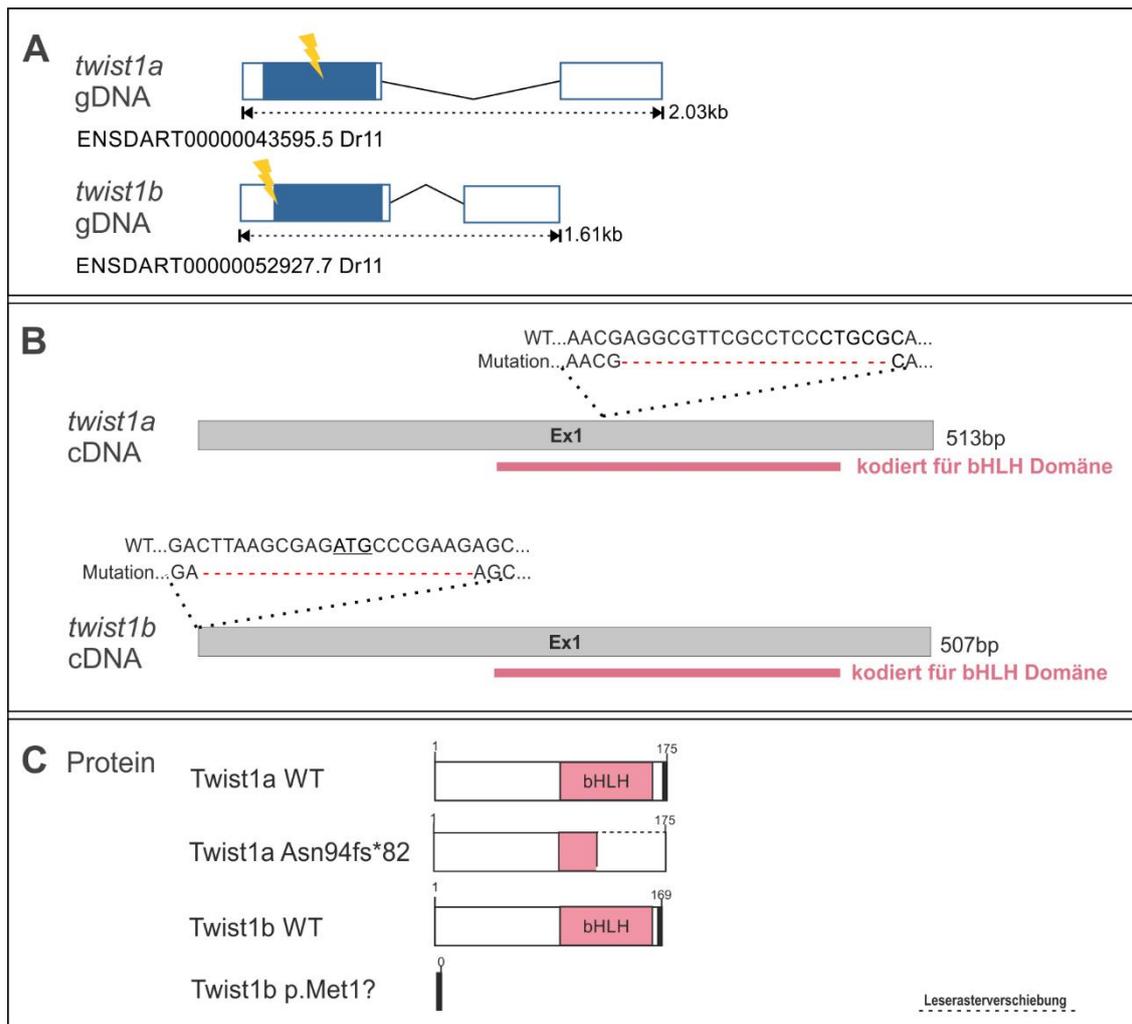
**Abbildung 28: Vergleich der räumlichen und zeitlichen Expression von *twist1a*, *twist1b* und *tcf12* mittels *Whole-mount* RNA *in-situ* Hybridisierungen**

---

Dargestellt sind jeweils eine laterale und dorsale Ansicht ca. 72hpf alter Zebrafischembryonen. Gewebe, die eine spezifische Expression aufweisen sind markiert.

Bb, Branchialbögen; Bf, Brustflossen; H, Herz; L, Linse; Mh, Mittelhirn; MNG, Mittel-Nachhirngrenze; oV, otisches Vesikel; Pn, Pronephros; Rh, Rautenhirn; Sk, Schwanzknospe; Som, Somiten; Vh, Vorderhirn. Maßstab: 500µm

Nachdem auch für die Gene *twist1a* und *twist1b* eine spezifische räumliche und zeitliche Expression im Zebrafisch nachgewiesen werden konnte, wurden sgRNAs gegen Zielsequenzen in den beiden *twist1* Genen hergestellt (die Zielsequenzen sind in Anhang B gelistet). Wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, wurden ebenso stabile CRISPR/Cas9 Knockout-Linien für die beiden paralogen *twist1* Gene generiert. In Abbildung 29 ist eine Übersicht der *twist1* Knockout-Linien dargestellt. Die Zielsequenz für das CRISPR Konstrukt gegen *twist1a* befindet sich am Anfang der für die bHLH Domäne kodierenden Region (siehe Abbildung 29A, B). Bei *twist1b* befindet sich die Zielsequenz am Anfang der kodierenden Sequenz und schließt das Startcodon mit ein. In beiden Fällen hat der Gen Knockout mittels CRISPR/Cas9 zu Deletionen von 19 (*twist1a*) bzw. 20 (*twist1b*) Nukleotiden innerhalb der Zielsequenzen geführt. Die Deletion in *twist1a* (c.284\_302del) hat eine Leserasterverschiebung zur Folge, die im N-terminalen Bereich der bHLH Domäne beginnt und nach 82 AS zu einem Stopcodon führt (p.Asn94fs\*82) (siehe Abbildung 29C). Die Deletion in *twist1b* (c.-10\_10del) schließt das Startcodon mit ein (Abbildung 29B).



**Abbildung 29: Mutationen der *twist1a* und *twist1b* Knockout-Linien**

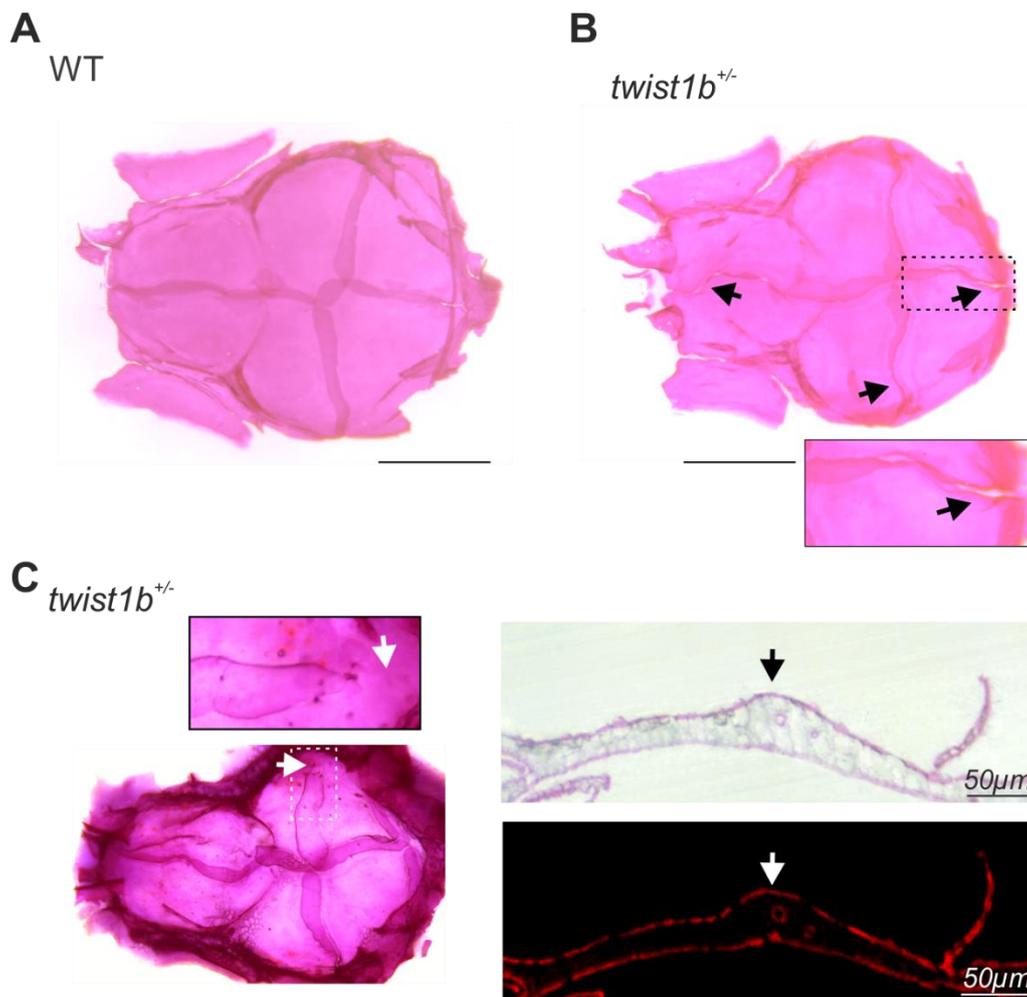
(A) Übersicht der Gene *twist1a* und *twist1b* mit den jeweiligen CRISPR/Cas9 Knockoutzielen (Blitze). Die beiden paralogenen Gene besitzen jeweils ein kodierendes Exon. (B) Die ungerichtete Mutagenese mittels CRISPR/Cas9 resultierte in Deletionen von 19 Nukleotiden bei *twist1a* (c.284\_302del) bzw. 20 Nukleotiden bei *twist1b* (c.-10\_10del). Die Deletion im *twist1a* Gen befindet sich innerhalb des für die bHLH Domäne kodierenden Bereichs. Die Deletion in *twist1b* beginnt bereits 10 Nukleotide vor dem Startcodon (unterstrichen) und schließt dieses mit ein. (C) Auf Proteinebene hat die Deletion bei *twist1a* eine Leserasterverschiebung zur Folge, die in der bHLH Domäne beginnt und nach 82 AS zu einem Stopcodon führt. Das mutierte Twist1a Protein ist mit einer Länge von 175 AS ebenso lang wie das wildtypische Protein, besitzt aber nur einen Teil der bHLH Domäne und einen veränderten C-terminalen Bereich. Da die Deletion in *twist1b* das Startcodon miteinschließt ist die Konsequenz dieser Mutation auf Proteinebene unklar.

Eine Zusammenfassung der Analysen der Schädeldächer der *twist1* Knockout-Linien ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Zusammenfassung der Untersuchung der *twist1a/b* Knockout-Linien zu Auffälligkeiten innerhalb der Schädelnähte**

Linie	N untersuchte Individuen	Detektion von Fusionen innerhalb der			Anomalien der Schädel- platten
		Interfrontalnaht	Koronarnaht	Sagittalnaht	
<i>twist1a<sup>F0</sup></i>	15	0	0	0	0
<i>twist1b<sup>F0</sup></i>	15	0	0	0	0
<i>twist1a<sup>+/-</sup></i>	19	0	0	0	0
<i>twist1b<sup>+/-</sup></i>	18	0	1	0	3
<i>twist1a<sup>-/-</sup></i>	3	0	0	0	0
<i>twist1b<sup>-/-</sup></i>	4	0	0	0	1

Eine Analyse der F<sub>0</sub>-Mutanten der *twist1* Knockout-Linien zeigte in beiden Knockout-Linien keinerlei Auffälligkeiten (vgl. Tabelle 2). *twist1a<sup>+/-</sup>* Mutanten zeigten ebenfalls eine unauffällige Entwicklung des Schädeldachs und der Schädelnähte. Eine der 18 untersuchten *twist1b<sup>+/-</sup>* Mutanten bildete eine partielle unilaterale Fusion in der rechten Koronarnaht aus (siehe Abbildung 30 C). Weitere Auffälligkeiten zeigten sich bei den *twist1b<sup>+/-</sup>* Mutanten, ebenso wie bei einigen der *tcf12* Mutanten, in einer fehlenden Überlappung der Schädelplatten, die teilweise kleinere Lücken zwischen den Schädelplatten entstehen ließ (siehe Abbildung 30B). Diese Anomalien konnten bei drei der 18 untersuchten *twist1b<sup>+/-</sup>* Mutanten (17%) detektiert werden. Die *twist1a<sup>+/-</sup>* Mutanten zeigten diese Auffälligkeiten nicht. Es wurden keine Schnittpräparate zur genaueren Untersuchung der Anomalien angefertigt.



**Abbildung 30: Übersicht der detektierten Anomalien in den Schädelnähten von *twist1b*<sup>+/-</sup> Mutanten**

Dargestellt ist eine Gegenüberstellung präparierter Schäeldächer eines wildtypischen Fisches (A) und einer *twist1b*<sup>+/-</sup> Mutante (B) mit Anomalien innerhalb der Schädelnähte (schwarze Pfeile). Bei der Mutante ist, ebenso wie bei einigen *tcf12* Mutanten, eine fehlende Überlappung der Schädelplatten innerhalb der Suturen erkennbar, die in der Interfrontal- und Sagittalnaht mit der Ausbildung kleinerer Lücken einhergeht (Pfeile). (C) Die Präparation des Schäeldachs einer anderen *twist1b*<sup>+/-</sup> Mutante ließ eine partielle Fusion der rechten Koronarnaht erkennen (weißer Pfeil). Schnitte durch die Koronarnaht bestätigen die Fusion der Schädelnaht (Pfeile). Die Schnitte wurden jeweils unter dem Lichtmikroskop (oben und unten links) und unter dem Konfokalmikroskop (unten rechts) aufgenommen. Maßstab: 1mm, sofern nicht anders angegeben.

Es konnten lediglich 3 bzw. 4 *twist1a*<sup>+/-</sup> und *twist1b*<sup>+/-</sup> Fische unter dem Konfokalmikroskop analysiert werden, da eine homozygote Mutation in beiden Genen mit einer sehr hohen Letalität der Embryonen innerhalb der ersten 14 Tage der Entwicklung einherging. Auch bei diesen Mutanten konnte die Ausbildung von Herzdefekten in Form eines aufgeblasenen Herzsacks beobachtet werden. Die Individuen, die das adulte Stadium erreichten, ließen nach einer Alizarinrot Färbung unter dem Konfokalmikroskop keine größeren Auffälligkeiten bezüglich der Schädelnähte erkennen (siehe Tabelle 2).

### 3.3.3 Analyse der Auswirkung von Doppel-/Dreifachmutationen in *tcf12* und *twist1a/twist1b*

Da die *tcf12* und *twist1* Knockoutmutanten nur kleinere Anomalien und nur in seltenen Fällen partielle Fusionen innerhalb der Schädelnähte entwickelten, sollte im Folgenden geklärt werden, ob ein kombinierter Verlust von *tcf12* und *twist1* zu größeren Defekten in der Schädelentwicklung führt. Dazu wurden die vorhandenen *tcf12* und *twist1* Knockoutlinien untereinander gekreuzt und die Entwicklung der Schädelplatten der Doppel-/Dreifachmutanten analysiert. Eine Übersicht aller analysierten Doppel-/Dreifachmutanten ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Zusammenfassung der Untersuchung der *tcf12;twist1* Doppel-/Dreifach-Knockout-Linien zu Auffälligkeiten innerhalb der Schädelnähte**

Linie	untersuchte Individuen	Detektion von Fusionen innerhalb der			Anomalien der Schädelplatten
		Interfrontalnaht	Koronarnaht	Sagittalnaht	
<i>tcf12<sup>sa14175/sa14175</sup>; twist1a<sup>+/-</sup></i>	4	0	0	0	0
<i>tcf12<sup>sa14175/+</sup>; twist1b<sup>+/-</sup></i>	11	0	0	0	0
<i>tcf12<sup>sa14175/sa14175</sup>; twist1b<sup>+/-</sup></i>	3	0	0	0	0
<i>tcf12<sup>sa14175 +/-</sup>; twist1a<sup>+/-</sup> twist1b<sup>+/-</sup></i>	5	0	0	0	0
<i>tcf12<sup>sa14175/sa14175</sup>; twist1a<sup>+/-</sup>; twist1b<sup>+/-</sup></i>	2	0	0	0	0
<i>tcf12<sup>sa14175/sa14175</sup>; twist1b<sup>-/-</sup></i>	4	0	0	0	0
<i>tcf12<sup>Ex8+/-</sup>; twist1a<sup>+/-</sup></i>	8	0	0	0	2
<i>tcf12<sup>Ex8+/-</sup>; twist1b<sup>+/-</sup></i>	13	0	0	0	5
<i>tcf12<sup>Ex8+/-</sup>; twist1b<sup>-/-</sup></i>	1	0	0	0	1
<i>tcf12<sup>Ex12+/-</sup>; twist1b<sup>+/-</sup></i>	8	0	0	0	4
<i>tcf12<sup>Ex12+/-</sup>; twist1b<sup>-/-</sup></i>	4	0	0	0	2
<i>tcf12<sup>Ex12/Ex12</sup>; twist1b<sup>+/-</sup></i>	12	0	0	0	8

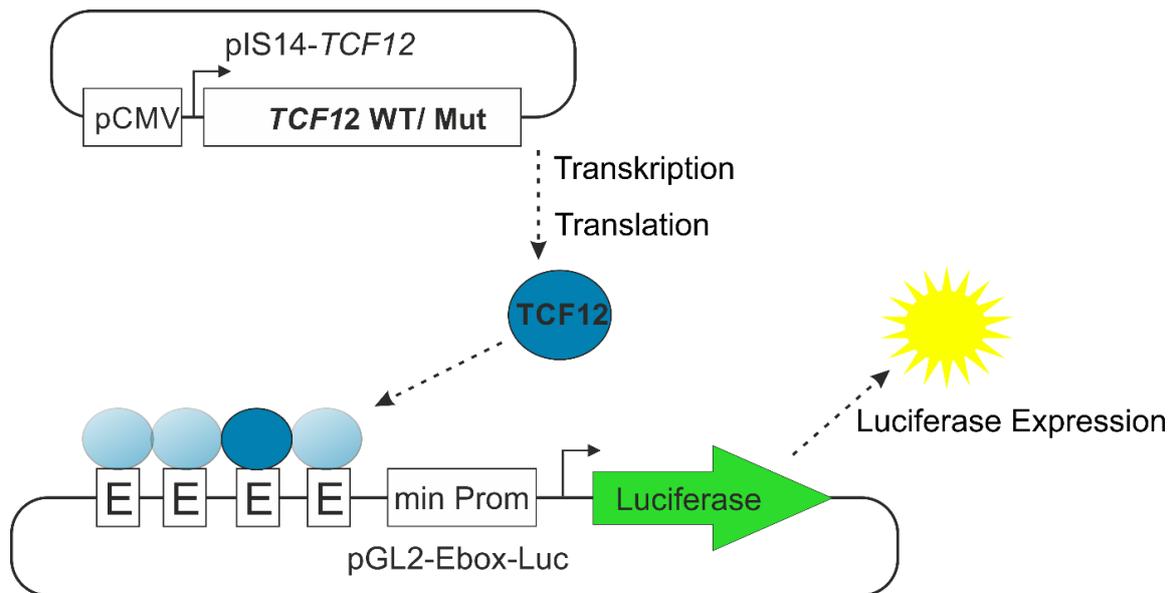
Bei den Untersuchungen der Doppel-/Dreifachmutanten wurden keine Fusionen in den Schädelnähten der Zebrafische gefunden. Auch bei einem kombinierten Verlust mit *twist1a/b* erwies sich die homozygote Knockoutmutation in *tcf12* Exon 8 als letal. Es ist ebenfalls nicht gelungen *tcf12<sup>Ex12/Ex12</sup>; twist1a/b<sup>-/-</sup>* Knockoutmutanten zu generieren. Homozygote *tcf12;twist1* Doppel-knockout-Mutanten konnten nur in der Kombination

*tcf12<sup>sa14175/sa14175</sup>*; *twist1b<sup>-/-</sup>* generiert werden. Insgesamt vier dieser Individuen erreichten das adulte Stadium und konnten unter dem Konfokalmikroskop untersucht werden. Alle vier Fische zeigten eine normale Entwicklung der Schädelnähte. Anomalien der Schädelplatten in Form einer fehlenden Überlappung im Bereich der Suturen konnten nur bei Doppelmutanten nachgewiesen werden, die kombinatorische Mutationen von *twist1* mit *tcf12<sup>Ex12</sup>* oder *tcf12<sup>Ex8</sup>* besitzen, nicht jedoch bei Doppelmutationen mit *tcf12<sup>sa14175</sup>*. Dies entspricht den Beobachtungen der *tcf12* Einzelmutanten (siehe 3.3.1). Auch bei den Doppelmutanten mit Mutationen in *twist1* und *tcf12<sup>Ex12</sup>/tcf12<sup>Ex8</sup>* zeigten sich die Auffälligkeit sehr divers und unregelmäßig.

### **3.4 Vergleichende funktionelle Analysen der Transaktivierung von mutiertem *TCF12* im Menschen und im Zebrafisch mittels Dual-Glo® Luciferase Assay System**

Um die funktionellen Konsequenzen von *TCF12* Mutationen genauer zu untersuchen, wurden im Zuge dieser Arbeit Dual-Glo Luciferase Assays entwickelt. Mit dem Reporterassay wurden zum einen Varianten untersucht, die in Kraniosynostose-Patienten identifiziert wurden, um eine bessere Aussage über die Pathogenität dieser Varianten treffen zu können. Zum anderen wurden die verschiedenen *tcf12* Mutationen der Zebrafisch Knockout-Linien analysiert. Der Fokus lag auf der Frage, ob die verschiedenen Knockout-Mutationen sich unterschiedlich auf die Transaktivierungsfähigkeit von Tcf12 auswirken. Dies könnte einen Erklärungsansatz für die unterschiedliche Schwere der verschiedenen Mutationen liefern.

Eine schematische Darstellung der Funktionsweise des Luciferase Assays ist in Abbildung 31 dargestellt. Das Prinzip beruht auf einer Zelltransfektion eines Plasmids mit einer wildtypischen oder mutierten *TCF12* cDNA Sequenz unter Kontrolle eines *CMV*-Promoters, gemeinsam mit einem Reporterplasmid, welches das Firefly Luciferase Reporter gen unter Kontrolle einer für *TCF12* spezifischen Ebox-Erkennungssequenz und eines Minimalpromoters exprimiert (siehe Abbildung 31). Die Transaktivierungsaktivität des wildtypischen bzw. mutierten *TCF12* Proteins wird anhand der gemessenen Lumineszenz der Firefly Luciferase bestimmt. Eine genaue Beschreibung der Durchführung des Dual-Glo® Luciferase Assays findet sich in Kapitel 2.2.2.3.

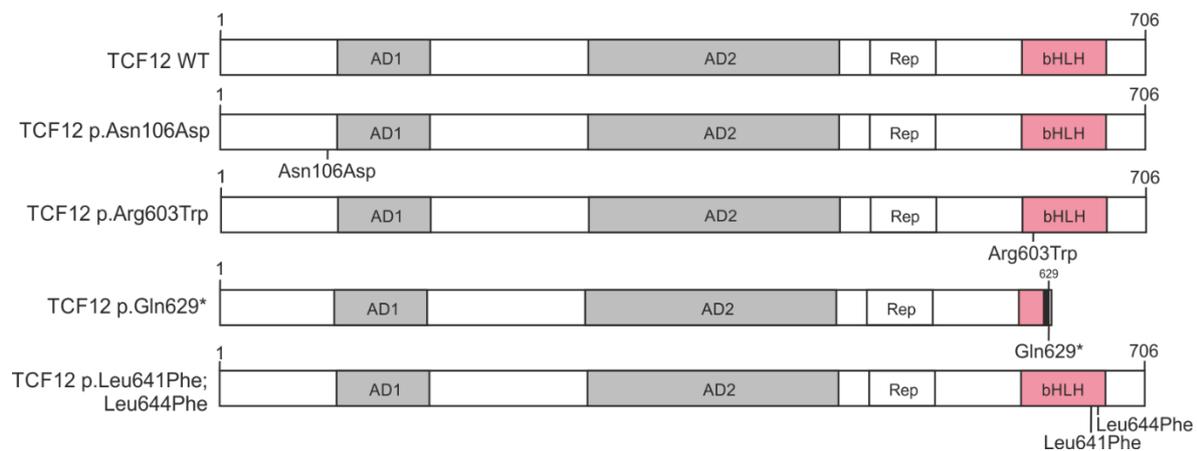


**Abbildung 31: Prinzip des Dual-Glo® Luciferase Reporterassays**

Der Dual-Glo Luciferase Reporterassay wurde für wildtypische und mutierte TCF12 Proteine durchgeführt. Mittels Transfektion wurden neben dem Kontrollvektor PGL474-Renilla und dem Leervektor pIS14 (hier nicht dargestellt) die Vektoren pIS14-TCF12 und pGL427-Ebox-Luc in HEK293T Zellen eingebracht. Der Vektor pIS14-TCF12 enthält die cDNA Sequenz des wildtypischen oder mutierten TCF12 Gens unter Kontrolle eines CMV Promoters. In den Vektor pGL427-Ebox-Luc ist das Firefly Luciferase Reporter gen integriert, welches durch einen Minimalpromoter getrieben und durch vier Kopien einer E-box-Erkennungssequenz (E) verstärkt wird. Nach erfolgter Translation aktiviert das TCF12 Protein die Expression des Firefly Luciferase Reporterenzym durch Bindung an das E-box Motiv. Bei erfolgreicher Bindung wird das Enzym Luciferase gebildet, welches eine oxidative Decarboxylierung des Luciferins zu Oxy Luciferin katalysiert. Das dabei entstehende Lichtsignal wurde mit einem Luminometer gemessen.

### 3.4.1 TCF12 Mutationen in der bHLH-Domäne verhindern die Transaktivierung an das E-Box Motiv

Mit dem Reporterassay wurden insgesamt fünf Varianten untersucht, die innerhalb unserer Arbeitsgruppe in Kraniosynostose Patienten mit uni- oder bilateralen Koronarnahtsynostosen mit Hilfe von Sanger-Sequenzierungen identifiziert wurden (siehe Abbildung 32). Sie umfassen vier Missense-Varianten (c.316A>G, p.Asn106Asp; c.1807C>T, p.Arg603Trp; c.1921C>T, p.Leu641Phe; c.1930C>T, p.Leu644Phe) sowie eine Nonsense-Variante (c.1885C>T, p.Gln629\*). Mit Ausnahme der Missense-Variante Asn106Asp befinden sich alle untersuchten Varianten in der bHLH-Domäne. Die Missense-Varianten p.Leu641Phe und p.Leu644Phe wurden beide in dem gleichen Patienten identifiziert. Um eine Aussage über die funktionelle Auswirkung beider Varianten treffen zu können, wurden diese sowohl alleine, als auch in Kombination im Reporterassay getestet (Abbildung 33).

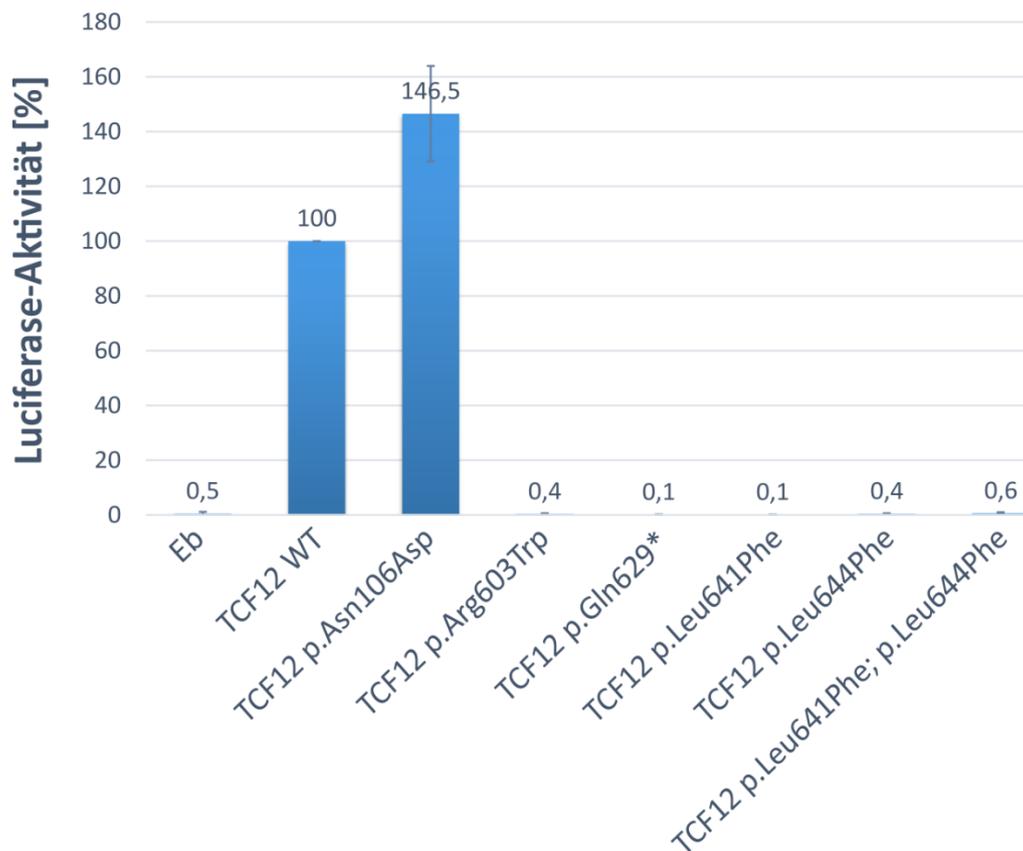


**Abbildung 32: Darstellung der mittels Reporterassay untersuchten *TCF12* Varianten**

Schematische Darstellung der wildtypischen und mutierten *TCF12* Proteine, die mittels Reporterassay untersucht wurden. Die Lage der Proteindomänen ist jeweils hervorgehoben: Aktivierungsdomäne1+2 (AD1 und AD2, grau), Repressordomäne (Rep, weiß) und bHLH-Domäne (bHLH, rot). Die Lage der Varianten und ihre Auswirkungen auf die Proteinsequenz sind gekennzeichnet.

\*: vorzeitiges Stopcodon

Anhand des Reporterassays konnte nachgewiesen werden, dass alle getesteten Missense Varianten, die in der bHLH-Domäne lokalisiert sind (p.Arg603Trp; p.Leu641Phe; p.Leu644Phe) sowie die Nonsense Variante p.Gln629\*, die sich ebenfalls in der bHLH-Domäne befindet, die Transaktivierung von *TCF12* an das E-Box Motiv aufheben (weniger als 1% Luciferase-Aktivität, Abbildung 33). Bei der Missense-Variante Asn106Asp hingegen, die noch vor der Aktivierungsdomäne 1 (AD1) des Proteins lokalisiert ist, konnte mit 146% eine höhere Luciferase-Aktivität als bei dem wildtypischen *TCF12* Protein gemessen werden.



**Abbildung 33: Untersuchung der funktionellen Auswirkung fünf verschiedener *TCF12* Varianten von Patienten mit Koronarnahtsynostosen mittels Dual-Glo® Luciferase Reporterassay**

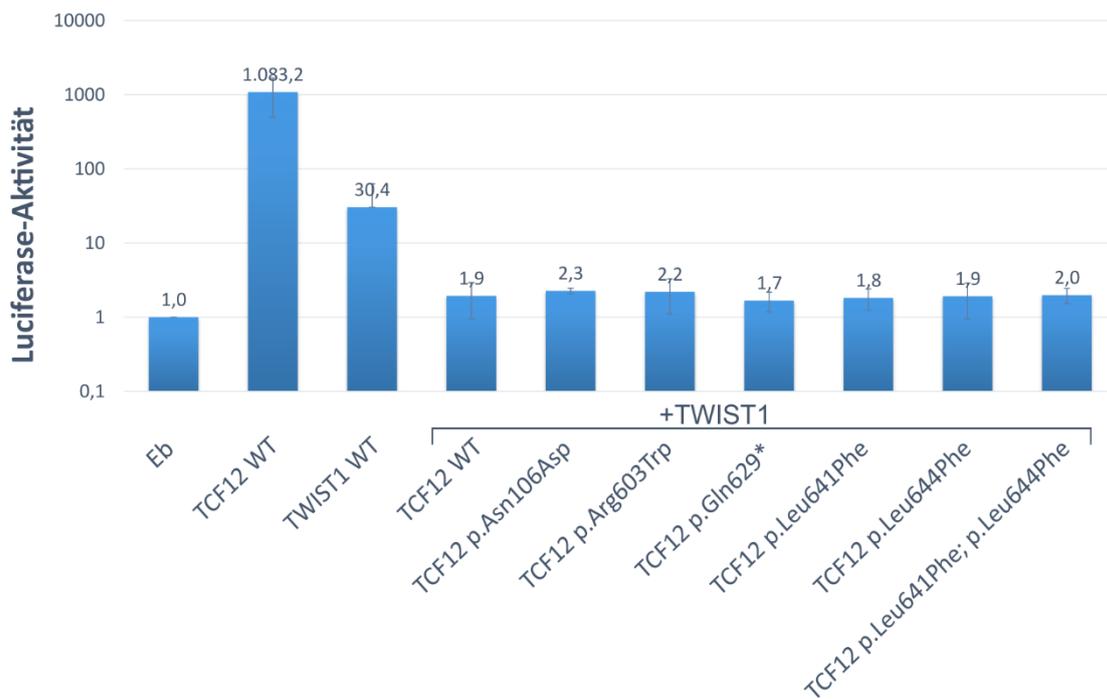
Der E-Box-Luciferase Reportervektor (Eb) wurde alleine oder in Kombination mit einem wildtypischen oder mutierten *TCF12* Expressionsvektor transfiziert. Die gemessene Luciferase-Aktivität des wildtypischen *TCF12* wurde für eine bessere Vergleichbarkeit auf 100% und die Aktivität der mutierten *TCF12* Proteine jeweils dazu ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der drei Messungen mit Standardabweichungen.

### 3.4.2 Eine Co-Transfektion von *TWIST1* reduziert die Transaktivierung von *TCF12*

Über die letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass *TWIST1* ein wichtiger Dimerisierungspartner von *TCF12* während der Entwicklung des Schädeldachs und der Schädelnähte darstellt (Sharma et al., 2013, Yi et al., 2017). Um den Einfluss von *TWIST1* auf die Regulierung der Genexpression durch *TCF12* zu untersuchen, wurde in zusätzlichen Analysen das Aktivierungspotential von *TCF12* bei Co-Transfektion mit *TWIST1* WT cDNA bestimmt (Abbildung 34).

Während bei dem wildtypischen *TCF12* und dem *TCF12* mit der Missense-Variante Asn106Asp in dem vorangegangenen Assay eine starke Luciferase-Aktivität gefunden werden konnte (Abbildung 33B), ist bei Co-Transfektion mit wildtypischem *TWIST1* eine erhebliche Reduktion der Aktivität nachweisbar (Abbildung 34). Die Transfektion von *TWIST1* WT alleine führt im Vergleich zu *TCF12* WT lediglich zu einer verhältnismäßig

geringen Luciferase-Aktivität. Die vier weiteren getesteten humanen *TCF12* Varianten, die in der bHLH-Domäne lokalisiert sind und nachweislich die Transaktivierung von *TCF12* an das E-Box Motiv aufheben (Abbildung 33), zeigten bei Co-Transfektion mit *TWIST1* ebenfalls nur eine sehr geringe Luciferase-Aktivität, welche kaum die gemessene Aktivität der Kontrolle (Eb) überstieg (siehe Abbildung 34).



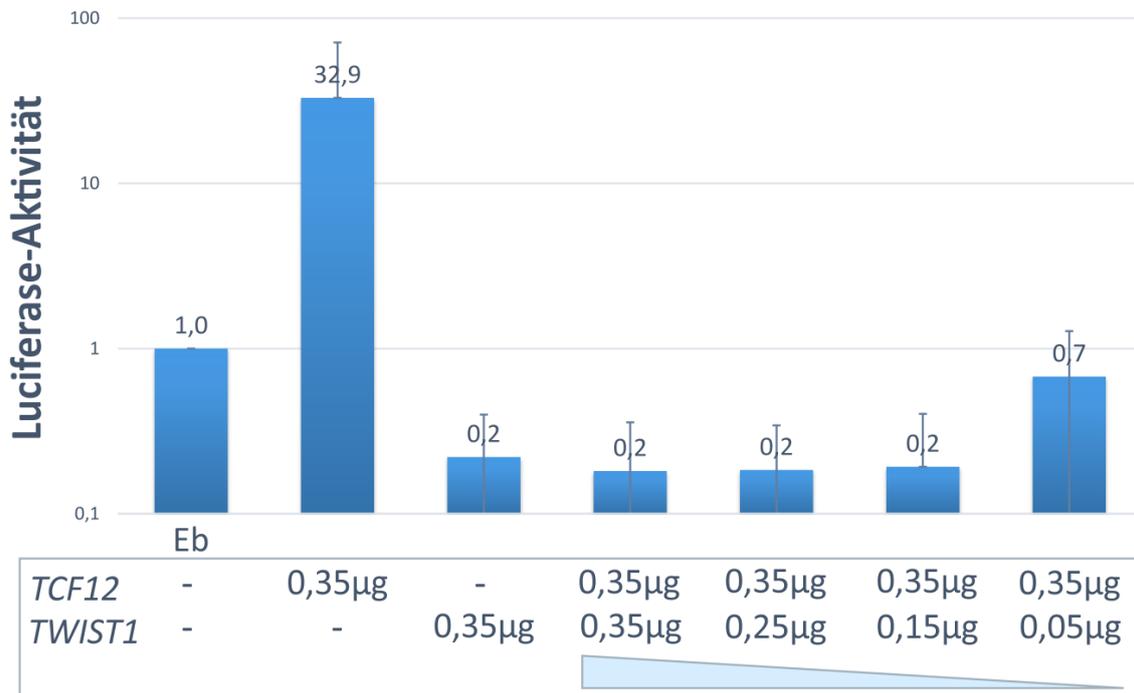
**Abbildung 34: TCF12 Transaktivierung bei Co-Transfektion mit *TWIST1* mittels Dual-Glo® Luciferase Reporterassay**

Gemessen wurde die Luciferase-Aktivität von wildtypischen und mutierten *TCF12* Proteinen bei Co-Transfektion mit wildtypischer *TWIST1* cDNA. Alle Messwerte wurden auf den E-Box-Luciferase Reportervektor (Eb) normiert, der auf den Wert 1 gesetzt wurde. Die Mittelwerte der Messungen sind logarithmisch mit Standardabweichungen dargestellt.

Nachdem die vorangegangenen Messungen zeigten, dass eine Co-Transfektion der gleichen Konzentration des *TWIST1*-Reportergenkonstrukts zum *TCF12*-Reportergenkonstrukt eine nahezu vollständige Reduktion der Luciferase-Aktivität zur Folge hat, wurden in einem weiterführenden Experiment die Auswirkungen einer Co-Transfektion verschiedener Konzentrationen von *TWIST1* WT cDNA auf die Aktivierung der Genexpression durch *TCF12* getestet (Abbildung 35).

Dadurch konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Konzentrationen von 0,15µg des pIS14-*TWIST1* WT Plasmids zu 0,35µg des pIS14-*TCF12* WT Plasmids ausreichen, um die transkriptionelle Aktivität von *TCF12* aufzuheben (Abbildung 35). Lediglich bei der

niedrigsten eingesetzten Konzentration von 0,05µg *TWIST1* ist ein geringfügiger Anstieg der Luciferase-Aktivität erkennbar.



**Abbildung 35: Analyse der Luciferase-Aktivität von TCF12 bei Co-Transfektion verschiedener Konzentrationen von TWIST1**

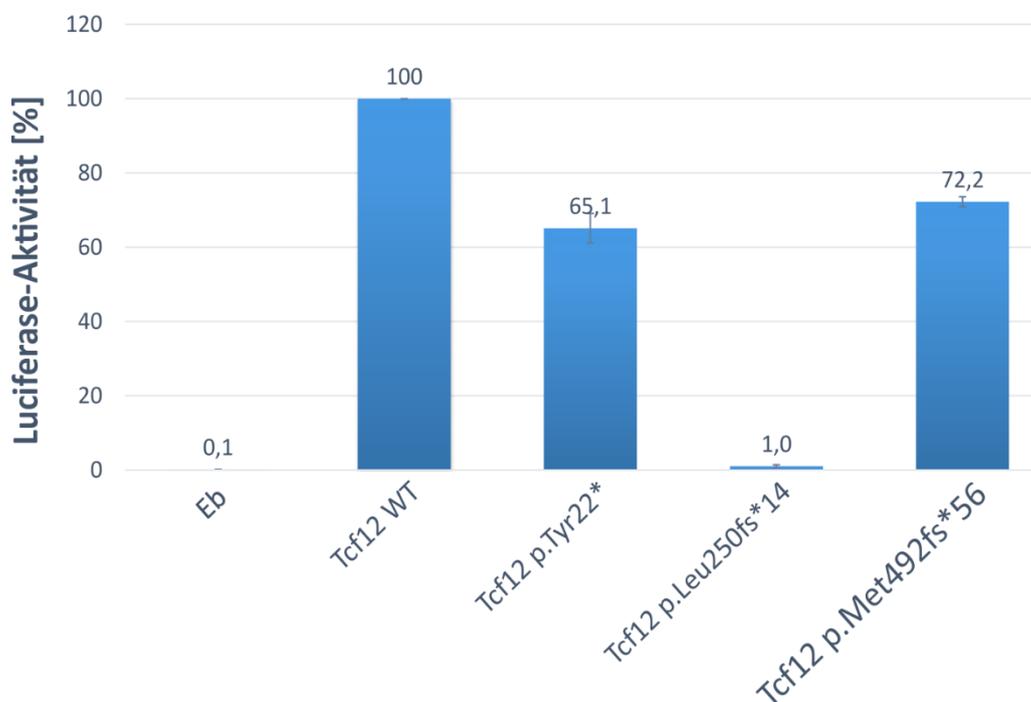
Die Zelltransfektion erfolgte mit einer konstanten Konzentration des pIS14-*TCF12* WT Plasmids (0,35µg) zusammen mit abnehmenden Konzentrationen (0,35-0,05µg) des pIS14-*TWIST1* WT Plasmids, welches mit dem Leervektor (pIS14) jeweils auf gleiche DNA-Konzentrationen justiert wurde. Die Messwerte wurden auf den E-Box-Luciferase Reportervektor (Eb) normiert, der auf den Wert 1 gesetzt wurde. Die Mittelwerte der Messungen sind logarithmisch mit Standardabweichungen dargestellt.

### 3.4.3 *tcf12* Mutationen der Knockout-Zebrafischlinien bewirken unterschiedliche Reduktion der Transaktivierungsfähigkeit von Tcf12

Die Analyse der Auswirkungen der Mutationen der drei Knockout-Linien folgte demselben Prinzip, wie bei der Untersuchung der menschlichen Varianten (Abbildung 31). Die wildtypische sowie die mutierten *tcf12* cDNA-Sequenzen des Zebrafisches wurden ebenfalls in den Expressionsvektor pIS14 inkloniert. Eine detaillierte Beschreibung der drei Knockout-Mutationen findet sich in Kapitel 3.3.1.

Die Nonsense-Mutation c.66T>A (p.Tyr22\*), die in Exon2 des *tcf12* Gens lokalisiert ist, bewirkt ein vorzeitiges Stopcodon, sodass das gebildete Protein nur 22 Aminosäuren lang ist und keine bHLH Domäne besitzt. Bei dieser Mutation konnte eine Luciferase-Aktivität von 65% gemessen werden (siehe Abbildung 36). Die Mutation c. [754\_755insCTGG;

758\_759insACTT], p.Leu250fs\*14 befindet sich in Exon8 des *tcf12* Gens und führt zu einer Leserasterverschiebung, die mit einem vorzeitigen Stopcodon einhergeht, wodurch die bHLH-Domäne ebenfalls nicht mehr vorhanden ist (Abbildung 36A). Diese Mutation hebt die Aktivierung der Expression des Luciferase Reporter gens komplett auf (Abbildung 36B). Die *tcf12* Mutation c.1473\_1474insATGGA, p.Met492fs\*56 in Exon 12 hat eine Leserasterverschiebung zur Folge, welche hinter der bHLH-Domäne beginnt und zu einer längeren Aminosäuresequenz im Vergleich zum wildtypischen Protein führt (Abbildung 36A). Bei diesem Tcf12 Protein konnte eine Transaktivierung des Luciferase Reporterplasmids von 72% im Vergleich zum wildtypischen Protein gemessen werden (siehe Abbildung 36B).



**Abbildung 36: Funktionelle Auswirkung der *tcf12* Mutationen der stabilen Zebrafisch Knockout-Linien**

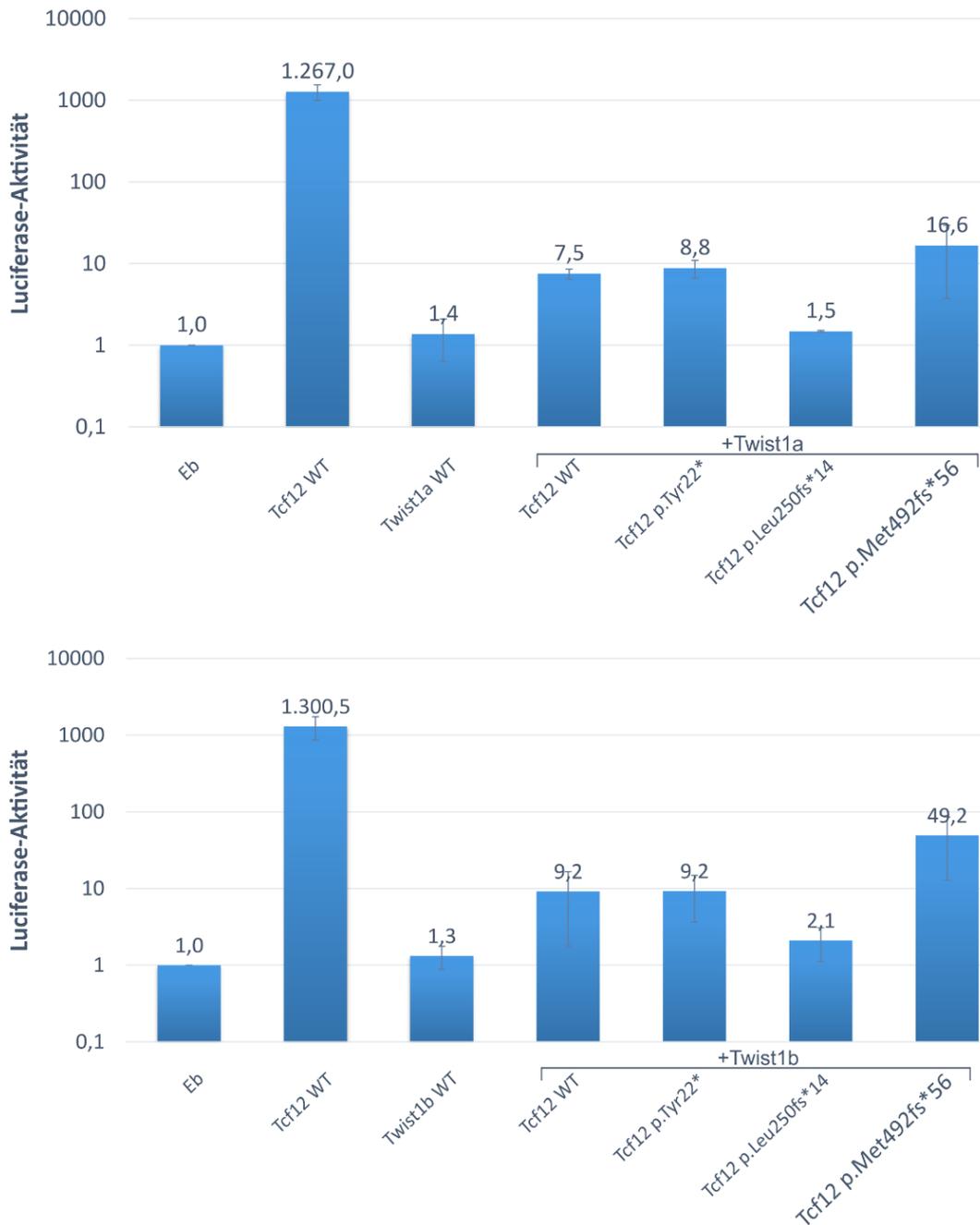
Der E-Box-Luciferae Reportervektor (Eb) wurde alleine oder in Kombination mit einem wildtypischen oder mutierten *tcf12* Expressionsvektor transfiziert. Die gemessene Luciferase-Aktivität des wildtypischen Tcf12 wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichungen.

### 3.4.4 Twist1a und Twist1b reduzieren die Transaktivierung von Tcf12 im Zebrafisch gleichermaßen

Da bei den vorangegangenen Analysen der Patientenmutationen ein Einfluss von TWIST1 auf die Regulierung der Genexpression durch TCF12 nachgewiesen werden konnte, wurde auch im Zebrafisch der Einfluss von Twist1a und Twist1b auf die Transaktivierung

---

von Tcf12 hin untersucht. Die Messungen der Luciferase-Aktivität zeigten auch beim Zebrafisch eine stark verringerte Expression des Luciferase-Reportergens bei Co-Transfektion von *twist1a/b* mit den wildtypischen oder mutierten *tcf12* cDNA Plasmidkonstrukten (Abbildung 37). Während die gemessene Luciferase-Aktivität beim Tcf12 WT Protein auf eine starke Aktivierung des Luciferase-Reportergens schließen lässt, ist bei beiden *twist* Proteinen keine Luciferase-Aktivität messbar. Sowohl bei dem wildtypischen Tcf12, als auch bei den Tcf12 Proteinen mit den Mutationen Tyr22\* und Met492fs\*56 ist bei einer Co-Transfektion von *twist1a/b* eine vergleichsweise geringe Aktivität der Luciferase messbar. Bei dem Protein, das die Variante Leu250fs\*14 trägt konnte weder bei einer alleinigen Transfektion, noch bei Co-Transfektion mit *twist1a/b* eine Luciferase-Aktivität detektiert werden (Abbildung 36B, Abbildung 37).



**Abbildung 37: Untersuchung der Tcf12 Transaktivierung bei Co-Transfektion mit *twist1a* und *twist1b* mittels Dual-Glo® Luciferase Reporterassay**

Gemessen wurde die Luciferase-Aktivität von wildtypischen und mutierten Tcf12 Proteinen bei Co-Transfektion mit wildtypischer *twist1a* (A) und *twist1b* (B) cDNA. Alle Messwerte wurden auf den E-Box-Luciferae Reportervektor (Eb) normiert, der auf den Wert 1 gesetzt wurde. Die Mittelwerte der Messungen sind logarithmisch mit Standardabweichungen dargestellt.

Die vergleichenden funktionellen Analysen der Transaktivierung von TCF12 im Menschen und im Zebrafisch mit dem Dual-Glo® Luciferase Assay System zeigten, dass Mutationen, welche die bHLH-Domäne beeinträchtigen mit einer stark verringerten Transaktivierung von TCF12 einhergehen. Darüber hinaus konnte sowohl im Menschen,

---

als auch im Zebrafisch eine starke Verringerung der Transaktivierungsaktivität von TCF12 bei Co-Transfektion mit WT TWIST1 (bzw. twist1a/b im Zebrafisch) nachgewiesen werden.

## 4. DISKUSSION

Der Pathologe Rudolf Virchow studierte bereits Mitte des 19. Jahrhunderts die Pathologie von Schädelneubildungen in der Umgebung von Würzburg und prägte als erster den Begriff „Kraniosynostose“ (Virchow, 1851). Er fertigte Zeichnungen von menschlichen Schädeln mit Kraniosynostosen an und erkannte, dass Fusionen in den gleichen Schädelnähten jeweils mit den gleichen charakteristischen Schädeldeformationen einhergehen. Die erste operative Korrektur einer Kraniosynostose wurde von Lannelongue im späten 19. Jahrhundert beschrieben und weitere 100 Jahre vergingen, bevor das erste krankheitsverursachende Gen (*MSX2*) identifiziert wurde (Jabs et al., 1993). Durch stetige Forschung bis zum heutigen Tag konnten bereits über 50 Gene mit der Entstehung von Kraniosynostosen assoziiert werden. Eingehende Studien einzelner Gene und Proteine konnten das Verständnis über die Pathogenese dieser Erkrankung stetig erweitern. Heute weiß man, dass die Ausbildung des Schädeldachs und der Schädelnähte sehr komplexen Prozessen unterliegen, die sich nicht nur auf das Schädeldach und die Suturen beschränken, sondern auch die umliegenden Gewebe miteinschließen. Erste wissenschaftliche Publikationen über die Forschung an Kraniosynostosen mit Hilfe von Modellorganismen reichen bis ins Jahr 1933 zurück. Greene et al. entdeckten eine Kaninchenrasse, bei der gehäuft Kraniosynostosen auftraten (1933). Für ihre Studien züchteten sie die betroffenen Kaninchen und untersuchten an ihnen als eine der Ersten die Pathogenese von Kraniosynostosen von der Embryonalentwicklung an bis hin zur postnatalen Entwicklung. Nach Identifizierung der ersten krankheitsverursachenden Genmutationen wurden schnell weitere Modellorganismen etabliert, um die Auswirkungen der Mutationen genauer zu studieren. Das Ziel der Forschung besteht bis heute insbesondere darin, die komplexen Vorgänge besser zu verstehen, die der Pathogenese von Kraniosynostosen zugrunde liegen, um auf dieser Grundlage neue Therapiekonzepte als Ergänzung zu einer chirurgischen Behandlung zu entwickeln. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen ebenfalls dazu beitragen, ein umfassenderes Verständnis über die Rolle der Gene *TCF12* und *TWIST1* inmitten des vermeintlichen „Wirrwarms“ der komplexen Regulation der Suturenentwicklung zu erlangen.

## 4.1 Analyse der räumlichen und zeitlichen *tcf12* Expression im Zebrafisch

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors *tcf12* im Zebrafisch über die Entwicklung hinweg analysiert. Ein besonderer Fokus lag dabei auf einem Expressionsnachweis während der Entwicklung des Schädeldachs, um einen Aufschluss über die genauen Wirkungsorte des Gens während der Ausbildung der Schädelplatten und der Schädelnähte zu erhalten. Ein erster endogener Expressionsnachweis von *tcf12* im Zebrafisch erfolgte mittels PCR-Analysen und *Whole-mount* RNA *in-situ* Hybridisierungen. In weiterführenden Analysen wurde die Genexpression mit Hilfe von transgenen *tcf12:EGFP* Linien über die gesamte Entwicklung hinweg nachverfolgt. Mit dem ZED Vektor System wurden zusätzlich drei potentielle *tcf12* Enhancer Elemente *in vivo* in Zebrafischembryonen analysiert.

### 4.1.1 Analyse der endogenen *tcf12* Expression

Ein erster Expressionsnachweis von *tcf12* in verschiedenen Stadien des Zebrafisches mittels PCR-Analysen zeigte eine kontinuierliche Expression des Transkriptionsfaktors ab dem 1-3-Somiten-Stadium. Bei der PCR-Analyse auf verschiedene Gewebe konnte *tcf12* in allen getesteten Geweben (Augen, Kiemen, Gehirn, Leber, Muskel, Haut, Hoden und Ovar) nachgewiesen werden (Abbildung 11). Diese breite Expression entspricht den Erwartungen, da Tcf12 ein Mitglied der E-Protein Familie ist, die ubiquitär exprimiert wird (Wang and Baker, 2015, Hu et al., 1992). E-Proteine weisen eine hohe Konservierung auf, von Hefen über *Drosophila melanogaster* bis hin zu Säugetieren und gelten als entscheidende Faktoren vieler entwicklungspezifischer Prozesse bei Eukaryoten (Massari and Murre, 2000, Murre et al., 1994, Bhattacharya and Baker, 2011). Eine gewebe- und zelltypspezifische Genregulation erlangen die breit exprimierten E-Proteine zum großen Teil über die Wahl ihrer Dimerisierungspartner, zu denen Klasse II bHLH Proteine und ID Proteine zählen und die eine gewebe-spezifischere Expression aufweisen (Wang and Baker, 2015, Hu et al., 1992).

Mittels *Whole-mount* RNA *in-situ* Hybridisierungen konnte das breite Expressionsmuster auch in 24-72hpf alten Zebrafischembryonen bestätigt werden (Abbildung 12). Die *in-situ* Hybridisierungen erlaubten eine direkte Visualisierung der räumlichen und zeitlichen endogenen *tcf12* Expression in den getesteten Entwicklungsstadien. Die mittels *in-situ*

Hybridisierungen detektierten Expressionsmuster stimmen mit den von Thisse et al. publizierten Expressionsdaten überein, die über die Datenbank ZFIN eingesehen werden können (Thisse, 2004, Thisse, 2005, Howe et al., 2013a). In Ihren Analysen konnten sie ebenfalls eine besonders breite Expression von *tcf12* im ZNS des Zebrafisches sowie in den oben genannten Geweben detektieren. Ihre *in-situ* Hybridisierungen beschränken sich allerdings auf embryonale Entwicklungsstadien bis zu einem Alter von 36hpf. Die *in-situ* Hybridisierungen dieser Arbeit konnten somit zum einen verifiziert werden und darüber hinaus die Expression von *tcf12* im weiteren Verlauf bis 72hpf aufzeigen. Für den Zebrafisch werden insgesamt 14 verschiedene Transkripte des *tcf12* Gens vorausgesagt (Ensembl Datenbank, GRCz11). Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte *in-situ* Hybridisierungs-Probe detektiert, ebenso wie die von Thisse et al. verwendete Probe, 7 der 14 Transkripte. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Annotation der *tcf12* Transkripte im Zebrafisch stets aktualisiert wird und die nicht detektierten Transkripte zum Zeitpunkt der Durchführung noch nicht annotiert waren. Von den 7 nicht detektierten Transkripten sind 5 Protein-kodierend (siehe Anhang B). Es ist daher möglich, dass diese Transkripte in weiteren Geweben exprimiert werden, die durch die in dieser Arbeit durchgeführten *in-situ* Hybridisierungen nicht detektiert wurden. Eine Übersicht der detektierten Transkripte sowie zusätzliche Informationen zu allen Transkripten befinden sich in Anhang B.

#### 4.1.2 *in vivo* Charakterisierung der *tcf12:EGFP* Expression

Nachdem anhand erster Analysen die Expression von *tcf12* im Zebrafisch erfolgreich nachgewiesen werden konnte, sollte im weiteren Verlauf die Expression von *tcf12* *in vivo* über die Embryonalentwicklung hinaus bis zum adulten Fisch untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe des Tol2-Transposon Systems (Kawakami et al., 2004) eine transgene *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Reporterlinie etabliert, welche EGFP unter der Kontrolle einer 2158bp langen Sequenz des *tcf12* Promoters exprimiert. Eine stabile EGFP Expression konnte ab der F<sub>1</sub>-Generation beobachtet werden. Für die Generierung der transgenen Linien wurden Fische des Stammes *mitfa*<sup>w2/w2</sup>; *mpv1*<sup>7b18/b18</sup> verwendet, da ihre optische Transparenz *in vivo* Analysen der EGFP-Expression ohne störende Eigenfluoreszenz der Pigmentzellen ermöglichen. Ein Vergleich des Expressionsmusters der transgenen Linie mit dem endogenen Expressionsmuster aus den *in-situ*

Hybridisierungen offenbarte eine hohe Spezifität der Reporterexpression (siehe Abbildung 14).

Mittels Restriktionsverdau wurden die 2158bp der *tcf12*-Promotersequenz des *-2.1tcf12:EGFP* Reporter-Konstruktes auf die 232bp reduziert, die sich unmittelbar vor dem Transkriptionsstart befinden. Mit diesem neuen Reporter-Konstrukt wurde eine zweite Reporterlinie etabliert (*Tg(-0.2tcf12:EGFP)*). Diese zeigte ebenfalls eine stabile EGFP-Expression ab der F<sub>1</sub>-Generation, was darauf schließen lässt, dass bereits diese kurze 232bp Sequenz des *tcf12* Promoters ausreicht, um eine spezifische Genexpression zu steuern. Dies legt die Annahme nahe, dass sich innerhalb der 232bp Sequenz der sogenannte Kernpromoter befindet, welcher alle basalen Elemente enthält, die für eine Gentranskription essentiell sind. Zu diesen Elementen zählen unter anderen die TATA-Box, die in der Regel die Konsensus Sequenz TATAAA besitzt, das Initiator-Element und das *Downstream Promoter Element* (Butler and Kadonaga, 2002, Pedersen et al., 1999). Die Elemente des Kernpromoters sind vorwiegend bereits ~35bp vom Transkriptionsstart entfernt lokalisiert. Neben dem Kernpromoter gibt es viele weitere regulatorische Sequenzmotive, die eine Gentranskription regulieren, wie beispielsweise Enhancer, Silencer und Insulatoren (Butler and Kadonaga, 2002, West et al., 2002, Blackwood and Kadonaga, 1998, Bulger and Groudine, 1999).

Ein Vergleich der beiden Reporterlinien ließ sowohl Gemeinsamkeiten, als auch Unterschiede hinsichtlich der *tcf12:EGFP* Expression erkennen (Abbildung 15). Während in Herz, otischem Vesikel, Epiphyse und Linse eine vergleichbare EGFP Expression bei beiden transgenen Linien detektiert wurde, besteht ein wesentlicher Unterschied darin, dass transgene Individuen mit dem kurzen *tcf12* Promoter Fragment *Tg(-0.2tcf12:EGFP)* eine erheblich geringe Anzahl EGFP-positiver Neurone entlang des ZNS besitzen. Gleichzeitig weisen sie eine deutlich stärkere Expression in den Somiten, den Kiemen und dem Unterkiefer auf (vgl. Abbildung 15). Die Gemeinsamkeiten deuten darauf hin, dass innerhalb der 232bp langen Promotersequenz Bindungsstellen für regulatorische Faktoren wie Enhancer vorhanden sind. An diese binden spezifische Transkriptionsfaktoren, die eine Expression von *tcf12* in den genannten Geweben steuern. Die Unterschiede in den EGFP Expressionsdomänen sind mit großer Wahrscheinlichkeit ebenso auf regulatorische Sequenzen zurückzuführen, die sich in den 1926bp befinden, welche ausschließlich in dem größeren *-2.1tcf12:EGFP*

Reportergenkonstrukt vorhanden sind und eine gewebsspezifische Transkription von *tcf12* in diesen Zellen bewirken. Da die *Tg(-2.1tcf12:EGFP)* Fische die endogene Expression der *in-situ* Hybridisierungen vollständiger widerspiegeln als die *Tg(-0.2tcf12:EGFP)* Fische, wurden sie weitestgehend für die nachfolgenden Analysen herangezogen.

Bei weiteren Untersuchungen der *tcf12* Reportergenlinien über die Entwicklung hinweg in juvenilen und adulten Fischen war besonders augenscheinlich, dass die in den Embryonalstadien detektierten Expressionsmuster überwiegend über die gesamte Entwicklung hinweg konstant blieben (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 16). Die Expressionsorte von *tcf12* lassen sich für alle Stadien in neuronale, muskuläre und knöcherne Strukturen einordnen. In Tabelle 4 werden die detektierten Expressionsmuster in den jeweiligen untersuchten Entwicklungsstadien gegenübergestellt.

**Tabelle 4: Übersicht der Detektierten *tcf12:EGFP* Expression in *-2.1tcf12:EGFP* Fischen über die Entwicklung hinweg**

✓: EGFP Expression vorhanden, ✗: keine EGFP Expression, n.a.: nicht ausgebildet, Gewebe ist noch nicht entwickelt

	<b>Struktur</b>	<b>Embryo</b>	<b>Juvenil</b>	<b>Adult</b>
<b>Neuronale Gewebe</b>	Vorder-, Mittel-, Rautenhirn	✓	✓	✓
	Epiphyse	✓	✓	✓
	Neurone des Rückenmarks	✓	✓	✓
	Neurone des otischen Vesikels	✓	✓	✓
<b>Muskuläre Gewebe</b>	Muskelvorgängerzellen (Embryo) bzw. Somiten (Juvenil-Adult)	✓	✓	✓
	Herz	✓	✓	✓
	Muskeln des Viszerokraniums	n.a.	✓	✓
<b>Knöcherne Gewebe</b>	Vorgängerzellen des Kiefers (Embryo) bzw. Knochen des Viszerokraniums (Juvenil-Adult)	✓	✓	✓
	Schädelplatten	n.a.	n.a.	✓
<b>Andere Gewebe</b>	Kiemenbögen	✓	✗	✗
	Auge/Linse	✓	✓	✓
	Pronephros	✓	✓	✓
	Brustflosse	✓	✓	✓
	Schädelnähte	n.a.	n.a.	✓

#### 4.1.2.1 *tcf12* Expression in neuronalen Geweben

Eine neuronale Expression konnte bereits in 11hpf alten Embryonen detektiert werden und blieb über die gesamte Entwicklung hinweg bis zu adulten Fischen bestehen (siehe Tabelle 4). Bereits frühere Studien in höheren Vertebraten wie Mäusen und Ratten konnten zeigen, dass *Tcf12* eine wichtige Rolle bei der neuronalen Differenzierung des ZNS spielt (Uittenbogaard and Chiaramello, 2002, Mesman and Smidt, 2017, Uittenbogaard and Chiaramello, 1999, Wu et al., 2012, O'Neil et al., 2004, Mesman et al., 2018). Uittenbogaard et al. führten Expressionsstudien an Mäusen durch, die eine starke Expression von *Tcf12* im Neuralrohr und im Gehirn zeigten, sowohl prä- als auch postnatal. Aus ihren Studien konnten sie folgern, dass *Tcf12* eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Proliferation neuronaler Stammzellen während der embryonalen und adulten Neurogenese zukommt (Uittenbogaard and Chiaramello, 2002). Ein Verlust von *Tcf12* kann sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten zu der Ausbildung einer Exenzephalie mit geringer Penetranz führen, einer schweren Fehlbildung, die zu den Neuralrohrdefekten zählt (Barndt et al., 2000, Mesman et al., 2018, Barndt et al., 1999). Ravanpay et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass TCF12 neben den E-Proteinen TCF3 und TCF4 ein wichtiger Dimerisierungspartner von NEUROD2 während der Gehirnentwicklung darstellt (Ravanpay and Olson, 2008). NEUROD2 ist ein Klasse II bHLH Transkriptionsfaktor, der essentiell für die neuronale Differenzierung und das Überleben neuronaler Zellen ist (Lin et al., 2004, Farah et al., 2000). Um die Interaktion von NEUROD2 und TCF12 während der Gehirnentwicklung weiter aufzuschlüsseln, können die transgenen Zebrafische in zukünftigen Experimenten herangezogen werden. Das embryonale Gehirn ist reich an verschiedenen Signalmolekülen, die bei der Steuerung der Osteogenese des Schädels mitwirken und in bestimmten Signalzentren akkumulieren (Teng et al., 2019, Kaucka et al., 2018). So wird beispielsweise angenommen, dass Signalmoleküle, die bei der Ausbildung der Koronarnaht beim Zebrafisch mitwirken, in der Mittel-Nachhirn-Grenze exprimiert werden. Innerhalb dieser Region konnten ebenfalls *tcf12:EGFP* exprimierende Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14 C-D).

#### 4.1.2.2 *tcf12* Expression in Muskeln

Betrachtet man die muskulären Gewebe des Zebrafisches, wird auch hier eine breite Expression von *tcf12* sichtbar. Bereits ab dem 20hpf Stadium wird *tcf12* in den Somiten des sich entwickelnden Embryos exprimiert (Abbildung 14). Studien in Mäusen konnten

zeigen, dass TCF12 gemeinsam mit MYOD als Interaktionspartner die Differenzierung und Proliferation von Myoblasten reguliert (Parker et al., 2006). Ab einem Entwicklungsstadium von 3dpf an konnte *tcf12* darüber hinaus auch im Herzmuskel der transgenen Zebrafische nachgewiesen werden. Ab dem Larvalstadium (ca. 11dpf) ist eine erste EGFP Expression in Muskeln des Viszerokraniums erkennbar. Diese Expression zeigt sich mit fortschreitender Entwicklung bei juvenilen Fischen noch deutlicher (Abbildung 16). Hu et al. führten eine der ersten Charakterisierungen von TCF12 und den anderen Mitgliedern der E-Proteinfamilie durch, bei denen sie TCF12 neben anderen Geweben auch in der Skelettmuskulatur des Menschen nachweisen konnten (Hu et al., 1992).

#### **4.1.2.3 *tcf12* Expression in weiteren Geweben**

Zu den weiteren Geweben, in denen eine EGFP Expression detektiert werden konnte zählt unter anderen der Pronephros. Zhuang et al. zeigten bei Studien in Mäusen, dass *Tcf12* ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung von B-Lymphozyten während der Embryonalentwicklung ist (Zhuang et al., 1996). Auch im Menschen konnte *TCF12* als wichtiger Faktor für die B-Zell-Differenzierung identifiziert werden (Hu et al., 1992). Während bei Mäusen ebenso wie beim Menschen die Entwicklung der B-Lymphozyten im Knochenmark stattfindet, findet sie beim Zebrafisch neben dem Pankreas auch im Pronephros statt (Danilova and Steiner, 2002). Ab einem Entwicklungszeitpunkt von 72hpf konnte eine starke EGFP Expression im Pronephros der transgenen Zebrafische nachgewiesen werden, was auch im Zebrafisch eine mögliche Funktion von *tcf12* bei der B-Zell Entwicklung nahelegt.

Des Weiteren konnte eine Expression in den Kiemenbögen (Branchialbögen) in Zebrafischembryonen detektiert werden. Aus diesen entwickeln sich im Fisch vor allem die Kiemen. Bei an Land lebenden Säugetieren entwickeln sich aus ihnen Strukturen des Kieferapparates, des Kehlkopfes und der Gehörknöchelchen. Auch in Mäusen konnte eine Expression von *Tcf12* in den Kiemenbögen nachgewiesen werden, was auf eine konservierte Funktion während der Entwicklung der Kiemenbögen hinweist (Uittenbogaard and Chiaramello, 2002).

#### **4.1.2.4 *tcf12* Expression während der Schädelentwicklung**

Das Skelett des Zebrafisches ist ab einem Entwicklungszeitpunkt von ca. 8-9 Wochen vollständig ausgebildet und weist mit 74 knöchernen Elementen allein im Schädel (beim

Menschen sind es 22) eine bemerkenswerte Komplexität auf (Bird and Mabee, 2003, Bergen et al., 2019). Die ersten knöchernen Strukturen, in denen EGFP detektiert wurde, sind Elemente der Kieferknochen in larvalen und juvenilen Fischen (Abbildung 16). Die Kieferknochen stellen die ersten kalzifizierenden Strukturen dar, die sich im Zebrafisch ausbilden, gefolgt von dem Achsenskelett des Rumpfes (Du et al., 2001). In adulten Fischen war eine *tcf12:EGFP* Expression darüber hinaus im Hyomandibulum und Operculum sichtbar (Abbildung 16). Das Hyomandibulum übt zum einen eine Stützfunktion für den Schädel aus und wirkt zum anderen als Bindeglied zwischen Kiefer und Krania. Das Operculum (lat. für „Deckel“) hat neben einer Stützfunktion des Gesichtsschädels die Aufgabe, die darunter liegenden Kiemen zu schützen. Interessanterweise beschränkt sich die *tcf12:EGFP* Expression auf die Knochen des Schädels und kann nicht in den Wirbelkörpern der Fische nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass *tcf12* als wichtiger Faktor bei der Entwicklung verschiedener Schädel- und Kieferelemente wirkt, jedoch nicht bei der Ausbildung der Wirbelkörper. Die Wirbelsäule wird im Zebrafisch, ebenso wie die Schädelplatten, über die intramembranöse Ossifikation gebildet (siehe Kapitel 1.1) (Mariotti et al., 2015). Die Kieferelemente hingegen werden größtenteils über chondrale Ossifikation gebildet, eine Ausnahme bildet das Operculum (Mork and Crump, 2015, Bergen et al., 2019). Die Brustlossen des Fisches wiederum, in denen ebenfalls eine *tcf12:EGFP* Expression nachgewiesen werden konnte, werden über die chondrale Ossifikation gebildet. Die *tcf12* Expression beschränkt sich daher nicht nur auf Knochengewebe, die durch eine intramembranöse Ossifikation gebildet werden.

Zur Aufklärung der Expressionsorte von *tcf12* während der Entwicklung des Schädeldachs wurde das EGFP Expressionsmuster in 30-90dpf (8-18mm Gesamtlänge) alten Zebrafischen während der Morphogenese des Schädeldachs nachverfolgt (siehe Abbildung 19). Topczewska et al. konnten zeigen, dass das Hinterhauptsbein und die Frontalknochen die ersten Knochen sind, die sich im Schädeldach des Zebrafisches formen, gefolgt von den Parietalknochen (2016). Bereits zu Beginn des Wachstums der Frontal- und Parietalknochen konnte eine EGFP Expression entlang der Wachstumsfronten der Schädelplatten detektiert werden. Diese Expression war über die gesamte Ausbildung des Schädeldachs hinweg nachweisbar. An den Wachstumsfronten befinden sich Osteoprogenitorzellen, differenzierte Osteoblasten und unmineralisierte Knochenmatrix (Osteoiden) sowie bereits mineralisierter Knochen (siehe Kapitel 1.1 und

Abbildung 2) (Ciurea and Toader, 2009, Beederman et al., 2014). Diese Beobachtung bestätigt die Studien von Yi et al., die zeigen konnten, dass *Tcf12* eine wichtige Rolle bei der osteogenen Differenzierung spielt (2017). Die Expression von *tcf12* war über die Entwicklung hinweg insbesondere in den jeweils stark ossifizierenden Bereichen der Schädelplatten sichtbar, sodass die Expression die raumzeitlichen Phasen des Schädelwachstums widerspiegelte. Auch in dem mesenchymalen Gewebe zwischen den Schädelplatten, einem Bereich, in dem sich die Suturen ausbilden, war eine EGFP Expression erkennbar (Abbildung 19 und Abbildung 20). Diese Expression konnte in dem Mesenchym aller Schädelnähte nachgewiesen werden. Im Suturen Mesenchym befinden sich vor allem proliferierende MSCs.

Interessanterweise konnte mittels *in-situ* Hybridisierungen auf sich entwickelnde Schädelplatten und Suturen bei Mäusen eine Expression von *Twist1* ebenfalls im Mesenchym der Suturen und in hohem Maße an den osteogenen Fronten der Schädelplatten detektiert werden (Lana-Elola et al., 2007, Rice et al., 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TWIST1 innerhalb der osteogenen Fronten bevorzugt Homodimere ausbildet und innerhalb der Suturen vorzugsweise Heterodimere mit E-Proteinen (E2A und E12) (Connerney et al., 2006). Es gilt die Annahme, dass TWIST1-TCF12 Heterodimere bei der Knochenbildung als Negativregulatoren auf Faktoren wie RUNX2 wirken (siehe Abbildung 3).

RUNX2 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine essentielle Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten einnimmt (Bialek et al., 2004, Komori et al., 1997, Ducky et al., 1997). Auch für *Runx2* konnte in Mäusen eine Expression an den osteogenen Fronten und innerhalb des Mesenchyms der Suturen gefunden werden. Zusammengefasst bestärken diese Ergebnisse die Annahme, dass *RUNX2* innerhalb der Suturen durch TWIST1/ TCF12 Heterodimere reguliert wird. In zukünftigen Experimenten wäre ein simultaner Nachweis der drei Gene in den Bereichen der Schädelnähte von großem Interesse, beispielsweise durch immunhistochemische Färbungen.

Die komplexe Morphogenese der Schädelnähte wird neben den Schädelplatten und dem Mesenchymgewebe der Suturen auch von umliegenden Geweben, wie der *Dura mater*, dem Gehirn und dem Periost (auch Knochenhaut genannt) reguliert (Ogle et al., 2004, Opperman et al., 1995, Brey et al., 2007, Doro et al., 2017). Ein Schnitt durch die Koronarnaht adulter *tcf12:EGFP* Fische offenbarte, dass *tcf12* nach der Ausbildung des Schädeldachs weiterhin im Mesenchym der Suturen, an den osteogenen Fronten, in der

*Dura mater* und dem Periost exprimiert wird (Abbildung 20). Eine Expression im Periost und der *Dura mater* konnte auch bei Schnitten durch die Frontal- und Parietalknochen abseits der Schädelnähte nachgewiesen werden. Studien in Ratten zeigten, dass die *Dura mater* während der Entwicklung des Schädeldachs interzelluläre und mechanische Signale aussendet. Besonders die FGF-Wachstumsfaktoren sind bei der Regulation dieser Vorgänge beteiligt (Ogle et al., 2004). GFP exprimierende Zellen existieren außerdem, nachgewiesen durch Schnittpräparate, an den Spitzen der Frontalknochen. Diese Enden stellen die osteogenen Fronten dar, an denen das Wachstum der Schädelplatten adulter Fische fortschreitet, um das Wachstum des Schädels dem Längenwachstum des Fisches anzupassen. Da die Fische lebenslang wachsen deutet dies darauf hin, dass *tcf12* auch in adulten Individuen an der Regulation des Knochenwachstums beteiligt ist.

Hervorzuheben ist die Beobachtung, dass beide transgenen Linien trotz teilweise unterschiedlichen Expressionsmustern während der Embryonalentwicklung in gleichem Maße EGFP exprimierende Zellen in den sich entwickelnden Schädelnähten und den Wachstumsfronten der Schädelplatten besitzen. Diese Beobachtung zeigt, dass bereits in dem kurzen 232bp großen Promoter-Fragment spezifische regulatorische Sequenzen für eine Expression von *tcf12* während der Entwicklung des Schädeldachs vorhanden sind.

## **4.2 *In vivo* Analysen von *tcf12* Enhancer Elementen**

Vor ca. 30 Jahren wurden bei einem Vergleich der Intron- und UTR-Regionen von Säugetieren und Vögeln zum ersten Mal hochkonservierte Bereiche identifiziert, die in nicht-kodierenden Sequenzen lokalisiert sind (Yaffe et al., 1985, Kajimoto and Rotwein, 1991, Lemaire et al., 1988). Weitere Forschung der folgenden Jahre offenbarte, dass hunderte bis tausend solcher extrem konservierten CNEs über 400 Millionen Jahre Evolution überdauern haben und oft sogar eine höhere Konservierung aufweisen als Protein-kodierende Gene (Vavouri and Lehner, 2009, Polychronopoulos et al., 2017). CNEs sind in der Regel mehrere hundert Basenpaare lang und häufig in der Umgebung von Genen lokalisiert, die regulatorische Rollen bei der Entwicklung und Differenzierung in Metazoen einnehmen (Woolfe et al., 2005). Mit Reporterge Assays in Mäusen (Pennacchio et al., 2006, Shen et al., 2012), Hühnern (Maas et al., 2011) und Zebrafischen (Kikuta et al., 2007, Shin et al., 2005) konnten Forscher zeigen, dass CNEs in den meisten Fällen als Enhancer wirken, die die räumliche und zeitliche Genexpressionen in verschiedenen entwicklungspezifischen Prozessen steuern (Polychronopoulos et al.,

2017). Mutationen in CNEs konnten bereits als Ursache der Entstehung vieler verschiedener angeborener Erkrankungen und Fehlbildungen identifiziert werden, darunter auch Skeletterkrankungen. So führen beispielsweise Duplikationen von CNEs in der Nähe der Gene *BMP2* und *SOX9* zu verschiedenen Typen der Brachydaktylie (Dathe et al., 2009, Kurth et al., 2009), Punktmutationen im Enhancer ZRS (*ZPA regulatory sequence*) von *SHH* zu präaxialer Polydaktylie (Lettice et al., 2003, Lettice and Hill, 2005) und Kopienzahlveränderungen (engl. *Copy-Number Variations*), die die CNEs 5' des *IHH* Locus einschließen zu Syndaktylie und Kraniosynostosen (Klopocki et al., 2011). Die Erkenntnisse der letzten drei Jahrzehnte räumen Screenings nach CNEs und der Charakterisierung ihrer Funktionen eine immer wichtigere Rolle ein.

Der Zebrafisch hat sich über die letzten Jahre hinweg als besonders wertvoller Modellorganismus für *in vivo* Studien an konservierten Elementen herausgestellt. Zum einen wurden Tools wie der *Zebrafish Enhancer Detection* (ZED) Vektor entwickelt (Bessa et al., 2009), die eine schnelle und zuverlässige Analyse potentieller Enhancer Elemente ermöglichen. Zum anderen ist bei weit entfernten Arten wie dem Menschen und dem Zebrafisch mit ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren vor ca. 450 Mio Jahren die Wahrscheinlichkeit höher, dass die identifizierten CNEs eine Funktion besitzen, als dies bei Mensch und Maus der Fall ist (Elnitski et al., 2003). Die kürzere evolutionäre Divergenz zwischen Mensch und Maus geht mit einer allgemein höheren Ähnlichkeit des Genoms einher, die auch die nicht-kodierenden Genomregionen miteinschließt und daher mit einer höheren Rate falsch-positiv identifizierter CNEs einhergeht (Visel et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den *tcf12:EGFP* Fischen als Referenz die Aktivität drei hochkonservierter CNEs im Zebrafisch untersucht, von denen bei zwei Elementen (*tcf12*-CNE1 und *tcf12*-CNE3) eine Enhancer Funktion nachgewiesen werden konnte. Die beiden Enhancer-Elemente zeichnen sich durch eine hohe Konservierung vom Menschen bis hin zum Zebrafisch aus und zeigten eine Neuronen-spezifische Expression in 3dpf alten Embryonen (Abbildung 21 und Abbildung 22). Die Expressionsmuster weisen auf das Vorhandensein hoch konservierter Transkriptionsfaktorbindestellen in den beiden CNE Regionen hin, die eine Regulation von *tcf12* während der Neurogenese im Mittel- und im Rautenhirn sowie im Neuralrohr steuern. *tcf12*-CNE1 konnte in der Maus bereits als neuronaler Enhancer nachgewiesen (Visel et al., 2007) und anhand der *in vivo* Studien im Zebrafisch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. *tcf12*-CNE3 wurde im Rahmen

---

dieser Arbeit zum ersten Mal mittels *in vivo* Studien als Enhancer für *tcf12* identifiziert und gilt aufgrund der hohen Konservierung auch als potentieller Enhancer höherer Vertebraten wie der Maus und dem Menschen.

Das Element *tcf12*-CNE2 zeigte keinerlei EGFP Expression in den untersuchten Zebrafischembryonen. Diese Beobachtung kann zum einen bedeuten, dass *tcf12*-CNE2 nicht als Enhancer im Zebrafisch wirkt. Eine andere mögliche Erklärung für die fehlende Enhancer-Aktivität ist, dass nicht alle benötigten regulatorischen Sequenzen des CNEs in der Sequenz vorhanden waren, die in den pZED Zielvektor eingebracht wurden, oder dass Teile des endogenen *tcf12* Promoters für eine Aktivität erforderlich sind. Da sich die Studien dieser Arbeit auf einen bestimmten Entwicklungszeitpunkt im Zebrafisch konzentrieren (3dpf) ist es außerdem möglich, dass *tcf12*-CNE2 zu anderen Entwicklungszeitpunkten im Zebrafisch aktiv ist. Auch wenn *tcf12*-CNE2 im Zebrafisch keine Enhancer-Aktivität zeigte, bleibt es ein möglicher Kandidat als Enhancer im Menschen. In Mäusen konnten Visel et al. mittels *Whole-mount lacZ* Färbungen *tcf12*-CNE2 als neuronalen Enhancer im Entwicklungsstadium 11.5 nachweisen (2007). Neueste Studien konnten darüber hinaus zeigen, dass eine Deletion von *tcf12*-CNE2 zu einer Reduktion der Expression von *Tcf12* in der subventrikulären Zone in Mäusen führt, einer Keimzone, die neuronale Zellen und Stammzellen enthält (Sandberg et al., 2018).

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse ebnen den Weg für weitere Studien, bei denen insbesondere eine Charakterisierung der räumlich-zeitlichen Expression der identifizierten Enhancer Elemente in weiteren Geweben, wie den Schädelnähten, von Interesse ist. Darüber hinaus gilt es die Frage zu klären, ob Mutationen in den CNE Elementen potentielle Risikofaktoren für die Entstehung von Kraniosynostosen darstellen. Der Frage kann beispielsweise durch Knockout-Experimente nachgegangen werden, bei denen die CNE-Elemente in Modellorganismen, wie dem Zebrafisch oder der Maus gezielt ausgeschaltet werden. Eine genauere Analyse des Zusammenspiels von *cis*-regulatorischen Elementen und der Entstehung angeborener Erkrankungen, wie Kraniosynostosen, ermöglichen ein besseres Verständnis über die Pathophysiologie hinter der Erkrankung und bietet möglicherweise einen Ansatz für die Ursachen der vielen bisher ungeklärten Kraniosynostose Fälle.

## 4.3 Die Auswirkung von *tcf12* und *twist1* Mutationen auf den Zebrafisch

Da Menschen und Mäuse eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber einem Funktionsverlust von *TCF12* und *TWIST1* zeigen (ausführliche Erläuterung in Kapitel 1.3), sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich ein Knockout dieser Gene auf die Suturenentwicklung des Zebrafisches auswirkt. Im Zuge dieser Arbeit wurden mittels CRISPR/Cas9 verschiedene Knockout-Linien mit Mutationen in den Genen *tcf12*, *twist1a* und *twist1b* generiert.

### 4.3.1 Analyse der *tcf12* Knockout-Linien

Das *tcf12*-Haupttranskript des Zebrafisches besteht aus 12 Exons (*tcf12*-201 ENSDART0000009938.11 Dr11), die für ein 533 AA großes Protein kodieren. Das Tcf12 Protein des Zebrafisches besitzt ebenso wie das menschliche TCF12 eine konservierte bHLH Domäne, über die eine Dimerisierung mit anderen Proteinen sowie die DNA-Bindung erfolgen. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Entwicklung des Schädeldachs an drei verschiedenen *tcf12* Knockout-Linien mit Mutationen in den Exons 2, 8 und 12 untersucht, von denen zwei mittels CRISPR/Cas9 generiert wurden (*tcf12<sup>Ex8</sup>* und *tcf12<sup>Ex12</sup>*, siehe Kapitel 2.2.3.5 und 3.3).

Bei den *tcf12<sup>Ex8</sup>* und *tcf12<sup>Ex12</sup>* F<sub>0</sub>-Fischen konnten keine Auffälligkeiten bei der Entwicklung des Schädeldachs detektiert werden. Die Individuen der F<sub>0</sub>-Generation stellen genetische Mosaikbezüge bezüglich der Zellen mit der eingebrachten Mutation dar (Jao et al., 2013). Das liegt hauptsächlich daran, dass die Mutagenese aufgrund der schnellen Entwicklung der Zebrafischembryonen erst nach den ersten Zellteilungen der Embryonen stattfindet. Nach der RNA-Injektion muss zunächst genügend Cas9 Protein translatiert werden, um Doppelstrangbrüche in den Zielsequenzen zu induzieren. Während der Zebrafisch nach 24hpf bereits das Stadium Pharyngula (auch Prim-5 genannt) erreicht hat, hat sich die Zygote der Maus im Vergleich in diesem Zeitraum erst ein einziges Mal geteilt (Yen et al., 2014, Mianne et al., 2017, Teboul et al., 2017).

Analysen der heterozygoten und homozygoten Fische der drei *tcf12* Knockout-Linien zeigten, dass die verschiedenen Mutationen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Suturenentwicklung der Zebrafische haben. Während Mutanten mit hetero- oder homozygoten Mutationen im *tcf12<sup>sa14175</sup>* Allel eine normale Entwicklung des Schädeldachs

zeigten, konnten bei einigen *tcf12<sup>Ex8</sup>* und *tcf12<sup>Ex12</sup>* Mutanten Anomalien innerhalb der Suturen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26).

Um diese phänotypische Variabilität zwischen den *tcf12* Knockout-Linien erklären zu können, erfolgte eine genauere Betrachtung der eingebrachten Mutationen.

Auf den ersten Blick scheint es überraschend, dass die Nonsense-Mutation *tcf12<sup>sa14175</sup>* in Exon2 im Gegensatz zu den Mutationen *tcf12<sup>Ex8</sup>* und *tcf12<sup>Ex12</sup>* keinerlei Auswirkung auf die Entwicklung der Schädelnähte hat. Vorzeitige Stopcodons in der mRNA, wie bei Mutation *tcf12<sup>sa14175</sup>*, führen in der Regel entweder zur Degradation des mutierten mRNA Templates (engl. *nonsense-mediated decay* (NMD) genannt), um die zytotoxische Wirkung des verkürzten Polypeptids zu inhibieren, oder zu der Ausbildung eines nicht-funktionsfähigen verkürzten Proteins (Mendell and Dietz, 2001, Wang et al., 2015, Wiechers et al., 2017). Sollte bei der Linie *tcf12<sup>sa14175</sup>* ein verkürztes Protein gebildet werden, fehlt diesem die bHLH Domäne, ohne die Tcf12 als Transkriptionsfaktor nicht mehr fähig ist, Homo- oder Heterodimere (z.B. mit Twist1) auszubilden und durch Bindung an bestimmte E-Box Erkennungssequenzen seine jeweiligen Zielgene (z.B. *runx2*) zu regulieren. Um eine mögliche Erklärung dafür zu finden, dass die *tcf12<sup>sa1417</sup>* Fische einen wildtypischen Phänotyp zeigen, wurde untersucht, ob andere *tcf12* Transkripte möglicherweise in der Lage sind, die Genmutation zu kompensieren. Eine Zusammenfassung aller kodierenden *tcf12* Transkripte und die Auswirkung der Mutation auf die einzelnen Transkripte ist in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5: Auswirkung der Mutation *tcf12<sup>sa14175</sup>* auf die kodierenden Transkripte (Ensembl Version GRCz11)**

Die Transkripte sind nach ihrer Priorität gemäß der Ensembl Datenbank gelistet.

Name	Transkript ID	AS gesamt	Konsequenz	AS betroffen
tcf12-210	ENSDART00000174218.2	557 AS	Nonsense	22
tcf12-201	ENSDART00000009938.11	533 AS	Nonsense	22
tcf12-207	ENSDART00000161387.3	726 AS	Nonsense	191
tcf12-212	ENSDART00000174335.2	520 AS	Nonsense	22
tcf12-211	ENSDART00000174292.2	551 AS	Nonsense	22
tcf12-213	ENSDART00000174355.2	713 AS	Nonsense	191
tcf12-209	ENSDART00000174117.2	689 AS	Nonsense	191
tcf12-202	ENSDART00000073766.6	336 AS	Nonsense	191
tcf12-203	ENSDART00000131282.3	702 AS	Nonsense	191
tcf12-214	ENSDART00000174369.2	250 AS	?	cDNA unvollständig

tcf12-205	ENSDART00000138263.2	177 AS	Nonsense	22
tcf12-204	ENSDART00000136745.2	54 AS		keine

Die Mutation führt in allen Transkripten zu einer Nonsense-Mutation mit Ausnahme von *tcf12-204* und *tcf12-214*. Bei dem Transkript *tcf12-214* ist die cDNA-Sequenz unvollständig annotiert. Anhand der vorhandenen cDNA-Sequenz lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob die Mutation zu einer Sequenzveränderung dieses Transkripts führt. Eine mögliche Kompensierung der Nonsense-Mutation durch das Transkript *tcf12-214* kann daher nicht ausgeschlossen werden. *tcf12-204* kodiert für ein 54AS langes Protein, das keine bHLH-Domäne besitzt und das Fehlen der anderen Transkripte somit nicht kompensieren kann.

Zwei weitere Erklärungsansätze für eine Kompensation der Nonsense-Mutation sind denkbar: das sogenannte Stopcodon *Readthrough* und eine Reinitialisierung der Translation durch ein *downstream* gelegenes Startcodon.

Bei einem Stopcodon *Readthrough* werden Nonsense-Mutationen „überlesen“, sodass die Translation nicht beendet und die Proteinsynthese fortgesetzt wird. Eine bekannte Ursache dafür ist, dass sich der Terminationskomplex am frühzeitigen Stopcodon nicht ausbilden kann, da die Distanz zum Poly-A bindenden Protein zu groß ist, welches einen Teil des Terminationskomplexes darstellt. Infolgedessen kommt es zu einem Pausieren des Ribosoms, bei dem die Terminationsfaktoren von der mRNA dissoziieren und mit anderen tRNAs um die Bindung am Stopcodon konkurrieren. Die Folge ist eine Fehlpaarung der tRNA mit dem Stopcodon, sodass sich das entstehende Protein mit dem wildtypischen Protein in einer Base unterscheidet (Wiechers et al., 2017). Die Überleserate eines ursprünglichen physiologischen Stopcodons 3' der mRNA liegt bei 0,001–0,1 %, während sie bei einem frühzeitigen Stopcodon mit 0,01–1 % zehnfach höher ist (Wiechers et al., 2017, Keeling et al., 2014).

Bei der Reinitialisierung der Translation werden mindestens zwei offene Leseraster (ORFs, engl. *open reading frames*) in einer einzigen mRNA festgelegt: Ein *upstream* gelegenes ORF, das mit dem ursprünglichen Startcodon beginnt und ein weiter *downstream* gelegenes ORF, das mit einem AUG Codon als Startcodon beginnt, das 3' des ursprünglichen Startcodons lokalisiert ist (Cohen et al., 2019).

Eine Reinitialisierung der Translation an einem AUG-Codon *downstream* des ursprünglichen Stopcodons konnte bereits in den 80er Jahren von Marilyn Kozak

nachgewiesen werden (Kozak, 1999, Kozak, 1984, Luukkonen et al., 1995, Skabkin et al., 2013). Cohen et al. konnten in neuesten Studien zeigen, dass eine Reinitialisierung auch nach dem Einbau einer Stopmutation, die durch eine Nonsense-Mutation hervorgerufen wurde, stattfinden kann, sodass ein N-terminal trunkiertes Protein gebildet wird (Cohen et al., 2019). Diesen Effekt konnten sie an Nonsensemutationen im *Tumorsuppressor Protein p53 (TP53)* zeigen. In ihren Studien weisen sie darauf hin, dass eine Expression N-terminal verkürzter Proteine durch eine Reinitialisierung der Translation deutlich häufiger auftritt, als ursprünglich angenommen. Wenn die verkürzten Proteine eine normale Funktion ausüben können, treten die schädigenden Effekte einer Nullmutation nicht in Erscheinung. Dies konnte beispielsweise für Nonsense-Mutationen bei kongenitaler adrenaler Hypoplasie (AHC; MIM 300200) (Ozisik et al., 2003) und adenomatöser Polyposis Coli (APC; MIM 175100) (Heppner Goss et al., 2002) gezeigt werden, sowie bei Patienten, die trotz einer Nonsense-Mutation im *ATRX* Gen dem letalen Effekt eines *ATRX*-Null Phänotyps entgehen (Howard et al., 2004).

Eine Reinitialisierung tritt besonders häufig bei Nonsense-Mutationen auf, die sich nahe der 5' Initiationsseite befinden und bei denen die neue Initiationsstelle 6-243bp *downstream* der Nonsense-Mutation gelegen ist (Cohen et al., 2019). Da die untersuchte Mutation der Zebrafisch Knockout-Linie Tyr22\* mit 66bp nahe der ursprünglichen Initiationsstelle liegt und sich eine neue mögliche Initiationsstelle Met47 nur 73bp *downstream* der Nonsense-Mutation befindet, erfüllt die Knockout-Mutation diese Kriterien. Die Ausbildung eines N-terminal verkürzten Tcf12 Proteins mit intakter bHLH Domäne wäre daher durchaus denkbar.

Mit der Software ATGpr von Nishikawa et al. lassen sich alternative Startcodons in einer vorgegebenen cDNA-Sequenz identifizieren (Nishikawa et al., 2000). Darüber hinaus liefert die Software eine Vorhersage darüber, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Startcodons als alternative Initiationsstelle fungieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass das AUG Codon, welches sich 73bp *downstream* der Nonsense-Mutation Tyr22\* befindet, als neuer Translationsinitiationsstart agiert, wird laut ATGpr Software auf 0,35 in der wildtypischen cDNA-Sequenz geschätzt und erhöht sich auf 0,67 im Sequenzkontext, der die Nonsense-Mutation enthält. Interessanterweise wird für das ursprüngliche *tcf12* Startcodon mit 0,37 eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit vorausgesagt. Diese Ergebnisse bestärken die Annahme für die Ausbildung eines N-terminal verkürzten Tcf12, dass die Nonsense-Mutation Tyr22\* der Knockoutlinie *tcf12<sup>sa1417</sup>* kompensiert.

Die Mutanten der Linie *tcf12<sup>Ex8</sup>* zeigten den schwersten Phänotyp der drei *tcf12* knockout-Linien, da eine homozygote *tcf12<sup>Ex8</sup>* Mutation sich als letal erwies. Etwa die Hälfte (55%) der untersuchten Fische zeigte ein abnormales Wachstum der Schädelplatten im Bereich der Schädelnähte in Form einer fehlenden Überlappung der Schädelplatten, die nicht zu einer Fusion führte (siehe Abbildung 26D). 7% der untersuchten *tcf12<sup>Ex8</sup>* Fische entwickelten partielle Fusionen innerhalb der Koronarnähte. Die Anomalie in Form einer fehlenden Überlappung der Schädelnähte zeigte sich sehr divers: bei einigen *tcf12<sup>Ex8</sup>* Mutanten waren alle Schädelnähte betroffen, bei anderen nur eine oder zwei. Die Mutation der *tcf12<sup>Ex8</sup>* Knockout-Linie führt vermutlich zu einem trunkierten Protein, dem die bHLH Domäne vollständig fehlt (siehe Abbildung 24).

Bei den heterozygoten und homozygoten Mutanten der Linie *tcf12<sup>Ex12</sup>* konnte ebenfalls eine fehlende Überlappung der Schädelplatten im Bereich der Schädelnähte nachgewiesen werden. Diese Anomalie trat bei den heterozygoten und homozygoten Knockoutmutanten gleich häufig auf (70%). Da bei *tcf12<sup>Ex12</sup>* Mutanten keine Fusionen innerhalb der Schädelnähte auftraten und die homozygoten Fische eine normale Überlebensrate zeigten, geht die *tcf12<sup>Ex12</sup>* Mutation mit einem milderem Phänotyp als die *tcf12<sup>Ex8</sup>* Mutation einher. Die Mutation der *tcf12<sup>Ex12</sup>* Knockout-Linie führt auf Proteinebene zu einer Leserasterverschiebung, die erst hinter der bHLH Domäne beginnt und, im Gegensatz zum wildtypischen Tcf12, zu einem um 14 Aminosäuren längeren Protein führt (siehe Abbildung 24). Es ist denkbar, dass die veränderte Aminosäuresequenz zu einer Fehlfaltung des Proteins am C-Terminus führt. Diese kann eine sterische Hinderung des Proteins bewirken, wodurch seine Fähigkeit zur Dimerisierung mit anderen Proteinen wie TWIST1 oder zur DNA-Bindung nur teilweise eingeschränkt ist, was den milden Phänotyp erklären kann.

Das abnormale Wachstum der Schädelplatten im Bereich der Schädelnähte bei den beiden Knockout-Linien deutet auf eine Fehlregulation von *tcf12* im Bereich der Wachstumsfronten der Mutanten hin. Anhand der *tcf12:EGFP* Reportergermlinien konnte ich zeigen, dass *tcf12* an den Wachstumsfronten der Schädelplatten und innerhalb des Mesenchyms der Suturen exprimiert wird und auch andere Studien legen die Annahme nahe, dass *TCF12* bei der Differenzierung der Osteoblasten eine wichtige Rolle spielt (Yi et al., 2017, Teng et al., 2018). Die fehlende Überlappung der Schädelplatten in den

Mutanten scheint auf eine gestörte Differenzierung der MSCs oder eine gestörte Proliferation der Osteoblasten zurückzuführen sein.

Auffällig war, dass sich die Anomalien sowohl bei den *tcf12<sup>Ex8</sup>*, als auch bei den *tcf12<sup>Ex12</sup>* Mutanten als sehr divers darstellten und darüber hinaus eine unvollständige Penetranz zeigten. Eine phänotypische Variabilität und unvollständige Penetranz bei *TCF12* Mutationen ist auch bei Kraniosynostose Patienten bekannt. Di Rocco et al. untersuchten eine Familie, in der bei einer Mutter und ihren beiden Töchtern eine heterozygote Deletion im *TCF12* Gen identifiziert wurde. Während beide Töchter Koronarnahtsynostosen entwickelten war die Mutter klinisch nicht betroffen (di Rocco et al., 2014). Paumard-Hernández und Kollegen konnten in einer spanischen Familie mit *TCF12* Mutationen eine unvollständige Penetranz von 60% feststellen und auch Sharma et al. ermittelten bei groß angelegten Studien zur Charakterisierung von *TCF12* Varianten eine unvollständige Penetranz von 53% (Paumard-Hernandez et al., 2015, Sharma et al., 2013).

#### 4.3.2 Analyse der *twist1* Knockout-Linien

Im Gegensatz zum Menschen besitzt der Zebrafisch aufgrund einer durchlaufenen Genomduplikation zwei kodierende Varianten des *twist1* Gens: *twist1a* und *twist1b* (Germanguz et al., 2007, Gitelman, 2007). Die *twist1* Gene im Zebrafisch besitzen, ebenso wie das menschliche *TWIST1*, ein kodierendes Exon (siehe Abbildung 29). Neben den Genen *twist1a* und *twist1b* umfasst die *twist* Genfamilie des Zebrafisches zwei weitere paraloge Gene: *twist2* und *twist3*. Während *twist1a/b* Orthologe des Gens *TWIST1* der Säugetiere und *twist2* ein Ortholog zu *TWIST2* darstellt, gehört *twist3* einer neuen monophyletischen Gruppe an, die in Säugetieren nicht existiert (Germanguz et al., 2007). Da *TWIST1*, nicht aber *TWIST2* mit der Entstehung von Kraniosynostosen im Menschen assoziiert ist, wurde im Zuge dieser Arbeit der Fokus auf die beiden paraloge *twist1* Gene gelegt (el Ghouzzi et al., 1997, Howard et al., 1997).

Mittels PCR-Analysen und *Whole-mount* RNA *in-situ* Hybridisierungen konnte eine spezifische Expression von *twist1a* und *twist1b* ab dem Einzellstadium im Zebrafisch nachgewiesen werden, während *tcf12* erst ab dem 1-3-Somiten-Stadium exprimiert wird (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Die detektierte Expression ähnelt in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben der räumlich-zeitlichen Expression von *tcf12*, allerdings weist *tcf12* eine wesentlich breitere Expression auf. Dies entspricht den Erwartungen, da *tcf12* als Mitglied der E-Protein Familie zu den bHLH Faktoren der

ubiquitär exprimierten Klasse I angehört und *twist1* zu den bHLH Faktoren der Klasse II, die eine gewebespezifischere Expression besitzen (Lee et al., 2012, Hu et al., 1992, Wang and Baker, 2015).

Die injizierten *twist1a* und *twist1b* Knockout Fische der F<sub>0</sub>-Generation zeigten, ebenso wie die *tcf12* F<sub>0</sub> Mutanten, keine Auffälligkeiten im Schädelwachstum und auch Fische mit einer heterozygoten und homozygoten Mutation in *twist1a* zeigten eine normale Schädelentwicklung. Bei 17% der *twist1b*<sup>+/-</sup> Fische war ebenso wie bei einigen *tcf12*<sup>Ex8</sup> und *tcf12*<sup>Ex12</sup> Mutanten ein abnormes Wachstum der Schädelplatten innerhalb der Schädelnähte erkennbar (siehe Abbildung 30B). Eine der 18 untersuchten *twist1b*<sup>+/-</sup> Mutanten besaß eine partielle Fusion innerhalb der rechten Koronarnaht.

Bei den homozygoten *twist1a* und *twist1b* Fischen war eine sehr hohe Letalität zu verzeichnen, sodass nur jeweils 3-4 Individuen bis in das adulte Stadium überlebten. Ein großer Anteil der Embryonen entwickelte schwere Deformationen, meist in Form eines stark vergrößerten Herzsacks. Da anhand der *in-situ* Hybridisierungen eine Expression beider *twist1* Gene im Herzen in 72hpf alten Embryonen nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 28B, C), ist es naheliegend, dass beide *twist1* Paraloge eine wichtige Rolle bei der Herzentwicklung spielen, die bei einem homozygoten Knockout nur schwer kompensiert werden kann.

Studien in Mäusen konnten ebenso zeigen, dass die Mutation *Twist*<sup>tm1Bhr</sup>, die zu einem Verlust der gesamten kodierenden Region und damit zu einem sogenannten Nullallel führt, letal ist. Die Mäuse sterben im Embryonalstadium 11.5 aufgrund schwerer vaskulärer Defekte, sowie aufgrund von Defekten des Neuralrohrs und des mesenchymalen Gewebes (Chen and Behringer, 1995, Chen et al., 2007). Auch in Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass *Twist1* Nullmutanten während der frühen Entwicklung sterben. Die Embryonen zeigten eine gestörte Gastrulation, bildeten kein Mesoderm und sterben am Ende der Embryogenese mit einem auffällig verdrehten (engl. *twisted*) Erscheinungsbild, das dem Gen seinen heutigen Namen verlieh (Simpson, 1983, Nusslein-Volhard et al., 1984). Beim Menschen sind keine homozygoten *TWIST1* und *TCF12* Mutationen bekannt. Es ist daher davon auszugehen, dass homozygote Mutationen in beiden Genen auch im Menschen letal sind. Morpholino Experimente im Zebrafisch aus dem Jahr 2011 zeigten, dass ein Knockdown von *twist1a/1b* mit einer beschleunigten Skelettentwicklung und einer charakteristischen Ventralisierung der Embryonen einhergeht und zu einer Erhöhung der *runx2b* Expression führt (Yang et al.). Weitere

Morpholino Experimente im Jahr 2012 zeigten, dass ein Knockdown von *twist1a/1b* im Zebrafisch bei 5dpf alten Zebrafischembryonen zu einem Verlust von Schädelknochen führt, die von Neuralleistenzellen abstammen (Das and Crump, 2012). Sie konnten anhand ihrer Experimente zeigen, dass *twist1* bereits während der embryonalen Entwicklung bei der Differenzierung der Neuralleistenzellen des Schädels mitwirkt.

#### 4.3.3 Analyse der *tcf12;twist1* Doppel- /Dreifachmutanten

Bei den verschiedenen *tcf12;twist1* Doppel- oder Dreifachmutanten konnten, neben dem abnormalen Wachstum der Schädelplatten, keine weiteren Auffälligkeiten detektiert werden. Keine der Doppel- oder Dreifachmutanten bildete Fusionen in den Schädelnähten aus. Die Mutation *tcf12<sup>Ex8</sup>* erwies sich auch in Kombination mit einer *twist1* Mutation als letal. Lediglich vier Fische mit einer homozygoten Mutation in *tcf12* und *twist1* (*tcf12<sup>sa14175/sa14175</sup>; twist1b<sup>-/-</sup>*) konnten analysiert werden und zeigten eine normale Ausbildung des Schädeldachs.

Teng et al. veröffentlichten kürzlich Studien, in denen sie mit Hilfe von TALENs ebenfalls Zebrafisch Knockoutmutanten für die Gene *tcf12*, *twist1a* und *twist1b* generierten, um die Auswirkung der Genmutationen auf die Entwicklung der Schädelnähte des Zebrafisches zu untersuchen (Teng et al., 2018). Sie konnten bei Fischen mit hetero- und homozygoten Mutationen in *tcf12* oder den Genen *twist1a/b* keine Auffälligkeiten oder Fusionen innerhalb der Schädelnähte nachweisen. Dies steht in Kontrast zu den in dieser Arbeit detektierten Abnormalitäten. In einigen *tcf12; twist1b* Doppel-Knockout-Mutanten konnten sie andere Anomalien in Form von kleinen zusätzlichen Suturen detektieren. Diese Auffälligkeit zeigten die von mir generierten Knockout-Linien nicht. Uni- oder bilaterale Koronarnahtsynostosen konnten Teng und Kollegen erst bei homozygoten *tcf12; twist1b* Doppel-Knockout-Mutanten detektieren, in 38% (N= 12/32) der untersuchten Individuen.

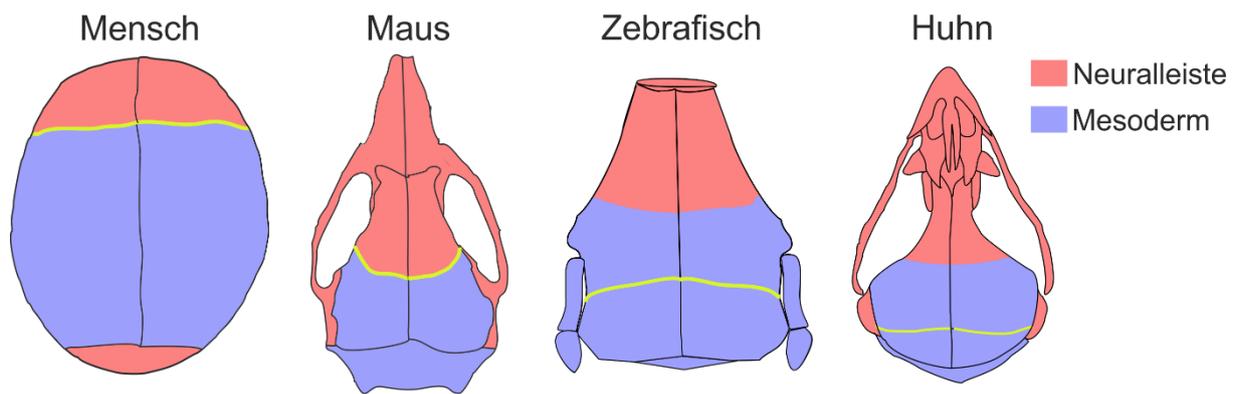
Sie stellten fest, dass die Frontal- und Parietalknochen in *tcf12; twist1b* Mutanten ein abnorm schnelleres Wachstum zeigen, das vor der zukünftig fusionierenden Koronarnaht zum Stillstand kommt (Teng et al., 2018). Dieses Phänomen zeigten allerdings nur die Mutanten, die eine Fusion in der Koronarnaht ausbildeten. Das innehalten des Wachstums zeigte sich, ebenso wie in den Einzelknockoutmutanten in dieser Arbeit, in Form einer fehlenden Überlappung der Schädelplatten (Abbildung 26C, D, F und Abbildung 30B). Allerdings beschränkte sich dieses charakteristische abnorme Wachstum der Einzelknockoutmutanten in unseren Analysen nicht nur auf die Koronarnaht und ging

nicht mit einer späteren Fusion der Schädelnaht einher. Teng et al. konnten keine Beteiligung von *twist1a* Mutationen bei der Entstehung von Fusionen in den Suturen nachweisen. *twist1a* scheint daher im Gegensatz zu *twist1b* keine wichtige Rolle bei der Suturenentwicklung im Zebrafisch zu spielen.

Auch die in dieser Arbeit detektierten Fusionen wurden in den Koronarnähten der Fische nachgewiesen (siehe Abbildung 25 und Abbildung 30). Auch beim Menschen und der Maus sind *TCF12* und/oder *TWIST1* Mutationen in den überwiegenden Fällen mit Fusionen der Koronarnähte assoziiert. In seltenen Fällen können auch multiple Suturen betroffen sein. So konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe bei einem Patienten mit Pansynostose eine Mutation im *TCF12* Gen identifiziert werden (Fall wurde noch nicht publiziert). Bei dieser Form der Kraniosynostose sind alle Schädelnähte fusioniert.

Eine Ursache für die Sensitivität der Koronarnähte konnte bis heute nicht geklärt werden. Die Expressionsstudien in dieser Arbeit zeigten, dass *tcf12* in allen Schädelnähten exprimiert wird, sodass eine selektive Expression von *tcf12* innerhalb der Koronarnähten als mögliche Ursache ausgeschlossen werden kann.

Ein anderer Erklärungsansatz macht die Lage der Koronarnähte für ihre Sensitivität verantwortlich. Die mesenchymalen Stammzellen, aus denen die Schädelknochen gebildet werden, können ihren embryonalen Ursprung entweder im Mesoderm oder der Neuralleiste haben (McBratney-Owen et al., 2008, Noden and Trainor, 2005). Während die Frontalknochen in Menschen und Mäusen (Flaherty et al., 2016) ihren Ursprung in den Neuralleistenzellen haben, sind die Parietalknochen mesodermalen Ursprungs. Die Koronarnaht bildet somit eine Grenze zwischen den Schädelplatten mit unterschiedlichem embryonalem Ursprung (siehe Abbildung 38). Während nahezu alle Vertebraten eine Koronarnaht besitzen, befindet sich diese jedoch nicht bei allen Vertebraten, ebenso wie bei Säugetieren, an der Grenze der beiden Keimblätter (Teng et al., 2019). Im Zebrafisch und dem Huhn beispielsweise haben die Frontalknochen ihren Ursprung sowohl in Neuralleistenzellen, als auch in mesenchymalen Stammzellen, während die Parietalknochen, ebenso wie beim Menschen, mesenchymalen Ursprungs sind (siehe Abbildung 38) (Mongera et al., 2013, Le Lievre, 1978, Noden, 1982, Kague et al., 2012). Bei Zebrafischen und Hühnern beispielsweise befindet sich die Koronarnaht somit an einer Mesoderm/Mesoderm Grenze.



**Abbildung 38: Embryonaler Ursprung der Knochenelemente des Schädeldachs in verschiedenen Vertebraten**

Der embryonale Ursprung der Schädelknochen des Menschen und der drei Modellorganismen Maus, Zebrafisch und Huhn sind farblich gekennzeichnet: Rot für Neuralleiste, Blau für Mesoderm. Die Koronarnähte sind in Gelb hervorgehoben.

Aus diesem Grund herrscht eine fortwährende Debatte darüber, ob die Koronarnäht in Vertebraten entwicklungsgeschichtlich homolog ist (Maddin et al., 2016, Teng et al., 2019). Die Divergenz des Ursprungs der Schädelknochen ist darauf zurückzuführen, dass sie sich in den verschiedenen Spezies über die Evolution hinweg neu geformt, wieder zurückgebildet oder fusioniert haben, was eine Aussage über die Homologie der Koronarnäht zusätzlich erschwert (Teng et al., 2019). Betrachtet man lediglich die Lage der Koronarnäht in Zebrafisch und Huhn (Mesoderm/Mesoderm Grenze), würde sie der Lambdanäht in Mäusen entsprechen.

Sollte die Lage der Koronarnäht ausschlaggebend sein für ihre Sensitivität, so sollte der Zebrafisch diese Sensitivität nicht zeigen. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit und die Studien von Teng et al. belegen, dass auch im Zebrafisch *tcf12* und *twist1* Mutationen zu einem Verlust der Koronarnähte führen kann (Teng et al., 2018). Auch wenn die Koronarnäht in Zebrafischen strenggenommen nicht homolog zu der in Säugetieren ist, so scheinen die entwicklungsspezifischen Prozesse, die die Morphologie der Koronarnäht steuern, dennoch konserviert zu sein.

Teng et al., konnten bei ihren Studien darüber hinaus zeigen, dass Zebrafische mit Nullmutationen in *tcf12* und *twist1b*, die im Verlauf der Entwicklung eine Fusion in der Koronarnäht ausbilden, ein schnelleres diagonales Wachstum der Frontal- und Parietalknochen aufweisen (Teng et al., 2018). Dieses bewirkt, dass die Schädelplatten schneller an der Koronarnäht aufeinandertreffen, was möglicherweise das Entstehen einer Fusion an dieser Stelle begünstigt. Durch Kreuzungen von Mutanten mit *sp7:EGFP* transgenen Fischen, die Osteoblasten markieren sowie einer BrdU Färbung, die

proliferierende Zellen markiert, konnten sie zeigen, dass eine verstärkte Proliferation früher Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen zum beschleunigten Knochenwachstum der Schädelplatten beitragen. Diese Erkenntnis wird durch die nachgewiesenen *tcf12:EGFP* Expression an den osteogenen Fronten der Schädelplatten im Rahmen dieser Arbeit gestützt (siehe Kapitel 3.1.6). Zusammenfassend deuten die Studien darauf hin, dass Tcf12 und Twist1 eine wichtige Rolle bei der negativen Regulation proliferierender Zellen an den Wachstumsfronten spielen.

## **4.4 Funktionelle Analyse der Auswirkung von *TCF12* Mutationen in Mensch und Zebrafisch**

Um die funktionellen Konsequenzen von vier *TCF12* Varianten, die in Kraniosynostose Patienten identifiziert wurden sowie die drei Zebrafisch Knockout-Mutationen funktionell zu untersuchen, wurden Reporterger Assays durchgeführt. Zum einen sollten die Analysen eine bessere Einschätzung der Pathogenität der identifizierten Varianten in den Patienten erlauben. Zum anderen sollten die Assays bei der Aufklärung der unterschiedlichen Phänotypen der Knockout-Linien helfen.

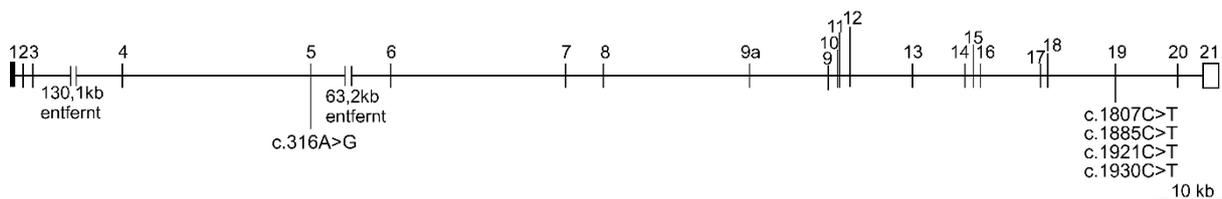
### **4.4.1 Analyse der vier *TCF12* Patienten Varianten**

Im Jahre 2013 wurden heterozygote Mutationen in *TCF12* erstmals mit Kraniosynostosen der Koronarnaht assoziiert (Sharma et al., 2013). In den folgenden Jahren wurde *TCF12* in viele Screenings via *Next Generation Sequencing* (NGS) bei Patienten miteingeschlossen, wodurch weitere mit Kraniosynostose assoziierte Gen Varianten identifiziert werden konnten, bei denen es sich in den meisten Fällen um Punktmutationen handelte. Das gesamte Mutationsspektrum schließt Leserasterverschiebungen, Nonsense- und Missense-Mutationen sowie Splice Mutationen mit ein (di Rocco et al., 2014, Goumenos et al., 2019, Timberlake et al., 2018, Paumard-Hernandez et al., 2015, Piard et al., 2015, Lee et al., 2018, Yilmaz et al., 2019). Darüber hinaus konnten auch kleinere und größere intragenische Deletionen und Duplikationen in Patienten mit Koronarnahtsynostosen gefunden werden, sowie eine chromosomale Veränderung, die mit einer Deletion des gesamten *TCF12* Gens einherging (Le Tanno et al., 2014, Goos et al., 2016, Lee et al., 2018). Mit dem Reporterger Assay wurden in dieser Arbeit insgesamt fünf verschiedene heterozygote Substitutionen (vier Missense-Varianten und eine Nonsense-Variante) im *TCF12* Gen untersucht, die in unserer Arbeitsgruppe bei vier Patienten mit uni- oder

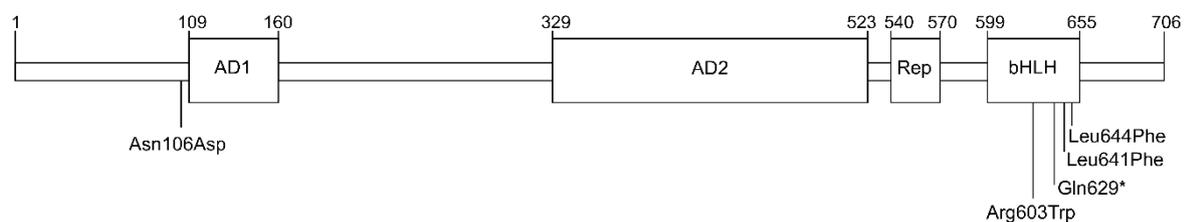
bilateralen Kraniosynostosen der Koronarnaht identifiziert wurden (siehe Kapitel 3.4.1 und Abbildung 39).

Mit Ausnahme der Missense-Variante c.316A>G (p.Asn106Asp) sind alle in dieser Arbeit analysierten Varianten innerhalb des für die bHLH Domäne kodierenden Bereichs (Exon 19) lokalisiert (siehe Abbildung 39). Sharma et al., die in ihren Studien mittels Exom Sequenzierungen 38 heterozygote *TCF12* Mutationen in Kraniosynostose Patienten identifizierten, sahen ebenso eine klare Akkumulation der Patientenmutationen in der 3' gelegenen Hälfte des *TCF12* Gens (Sharma et al., 2013). Auch in neueren groß angelegten NGS Screenings von Patienten mit Kraniosynostosen ist eine solche Akkumulation (in Exon 9-19) eindeutig (Lee et al., 2018, Goos et al., 2016).

*TCF12* Gen:



Protein:



**Abbildung 39: Lokalisation der mittels Reporterassay untersuchten *TCF12* Patienten Varianten auf Gen- und Protein- Ebene**

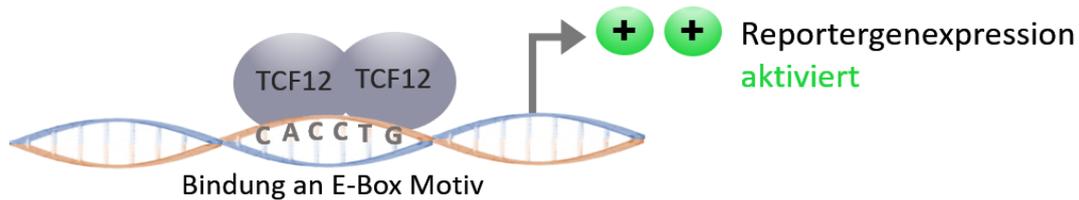
Das *TCF12*-Haupttranskript (NM\_207037) besteht aus 21 Exons und kodiert für ein 706 AS langes Protein. Neben dem Haupttranskript kann ein weiteres Transkript beginnend bei einer alternativen Initiationsstelle in Exon 9a gebildet werden. Das alternative Transkript kodiert für ein 512 AS langes Protein (HEBAIt) (Wang et al., 2006). Des Weiteren können Splicevarianten dieser Transkripte ausgebildet werden. Das *TCF12* Protein besitzt zwei Aktivierungsdomänen (AD1/2), eine Repressionsdomäne (Rep), sowie eine bHLH Domäne (Markus et al., 2002, Aronheim et al., 1993). Abbildung übernommen und verändert nach (Sharma et al., 2013).

Mit dem Reporterassay sollte geklärt werden, ob die Varianten die transkriptionelle Aktivität von *TCF12* beeinträchtigen und somit als pathogen eingestuft werden können.

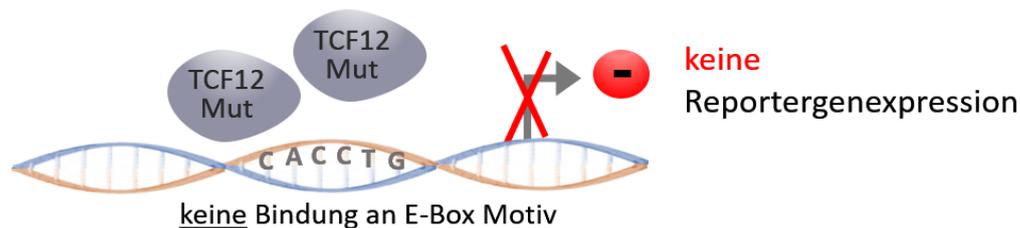
Anhand der Analysen konnte nachgewiesen werden, dass alle vier Varianten, die sich innerhalb der bHLH-Domäne befinden, eine Transaktivierung der Zielgene durch Bindung an das getestete Ebox-Motiv aufheben. Eine Darstellung der normalen bzw. einer

gestörten Transaktivierung durch wildtypische bzw. mutierte TCF12 Proteine ist in Abbildung 40 dargestellt.

#### TCF12 WT



#### TCF12 Mut in bHLH Domäne



### **Abbildung 40: Regulation der Transaktivierung der Reporterexpression durch TCF12 WT und TCF12 Mut Proteine**

Die TCF12 WT Proteine bilden Homodimere, die durch Bindung an das E-Box Motiv CACCTG eine Expression des Luciferase Reportergens aktivieren. Die getesteten TCF12 Proteine mit einer Substitution innerhalb der bHLH Domäne können keine Homodimer Komplexe ausbilden und/oder nicht an das E-Box Motiv binden, sodass keine Transaktivierung des Reportergens stattfinden kann.

Zwei der Missense-Varianten, p.Leu641Phe und p.Leu644Phe, wurden beide in einem Patienten mit Koronarnahtsynostose identifiziert. Die Varianten führten sowohl alleine, als auch in Kombination zu einem vollständigen Verlust der Transaktivierung von TCF12. Durch die Reportergen Assays konnte somit gezeigt werden, dass die vier Substitutionen innerhalb der bHLH-Domäne zu einer Haploinsuffizienz von TCF12 führen und sehr wahrscheinlich ursächlich für die Koronarnahtsynostosen der Patienten sind.

Die Missense-Variante Asn106Asp bildete eine Ausnahme zu den anderen vier untersuchten Substitutionen. Sie ist noch vor der Aktivierungsdomäne 1 lokalisiert (siehe Abbildung 39) und zeigte im Vergleich zum wildtypischen TCF12 Protein sogar eine höhere transkriptionelle Aktivität (vgl. Abbildung 33). Es scheint daher unwahrscheinlich, dass diese Variante ursächlich für die Ausbildung der Kraniosynostose des Patienten ist. Weitere genetische Analysen, wie eine Exom Sequenzierung wären

daher ratsam, um nach anderen klinisch relevanten Varianten bei diesem Patienten zu suchen, die eine Ursache für die Kraniosynostose darstellen können.

Bei allen getesteten Varianten handelt es sich um heterozygote Varianten. Bei dem Patienten mit den zwei heterozygoten *TCF12* Varianten (p.Leu641Phe und p.Leu644Phe) ist allerdings nicht geklärt, ob diese Compound- Heterozygot vorliegen. Um dies zu klären ist es ratsam, die Eltern des Patienten auf die Varianten hin zu untersuchen. Homozygote *TCF12* Mutationen sind beim Menschen bisher nicht bekannt. Eine fehlende Aktivierung des Reportergens bei den getesteten Mutationen muss daher immer in den Kontext gesetzt werden, dass bei den Patienten eine funktionsfähige Kopie des Gens vorhanden ist. Wird ein mutiertes *TCF12* Protein synthetisiert, das Teile seiner Funktion verloren hat, wie beispielsweise die Fähigkeit zur DNA-Bindung, kann dies eine fatalere Auswirkung haben, als der Verlust des Proteins. In diesem Beispiel besitzt das mutierte Protein weiterhin die Fähigkeit zur Dimerisierung, blockiert aber die Bindung des Proteinkomplexes an die DNA. Je nachdem, welcher Teil des bHLH Motivs von der Mutation betroffen ist, ist es möglich, dass die mutierten Proteine entweder ihre Fähigkeit zur Bindung an die DNA verlieren oder die Fähigkeit zur Komplexbildung mit ihrem Interaktionspartner. Die basische Region der bHLH Domäne ermöglicht eine spezifische Bindung an das E-Box Motiv, wohingegen das Helix-loop-Helix Motiv die Dimerisierungsdomäne darstellt, die für die Ausbildung von Homo- bzw. Heterodimeren essentiell ist (Murre et al., 1994). Während die Variante p.Arg603Trp in der basischen Region lokalisiert ist, befinden sich die Varianten p.Gln629\*, p.Leu641Phe und p.Leu644Phe in der Helix-loop-Helix Region.

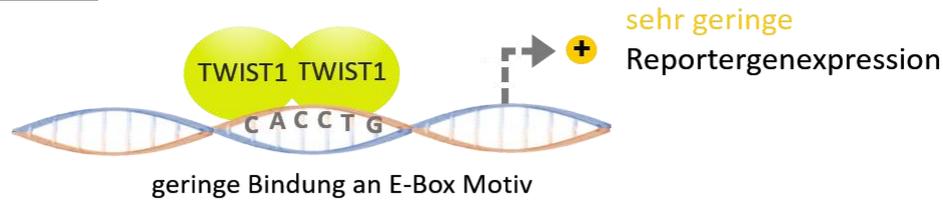
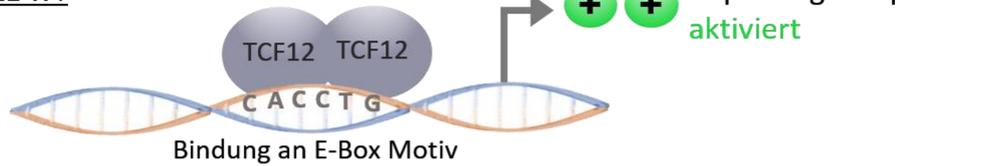
Auch Labreche et al. führten Reporterstudien mittels Luciferase Assays an *TCF12* Mutationen durch, die gehäuft in anaplastischen Oligodendrogliomen auftreten (Labreche et al., 2015). Dabei handelt es sich um seltene, schnell wachsende gliale Tumore. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass Mutationen, die die transkriptionelle Aktivität von *TCF12* stark beeinträchtigen, entweder in der bHLH Domäne lokalisiert sind oder durch eine Leserasterverschiebung zu einem in dieser Domäne truncierten Protein führen. Sie stellten außerdem fest, dass diese Mutationen mit aggressiveren Tumoren assoziiert sind.

#### **4.4.2 Regulation der Transaktivierung von *TCF12* durch *TWIST1* im Menschen**

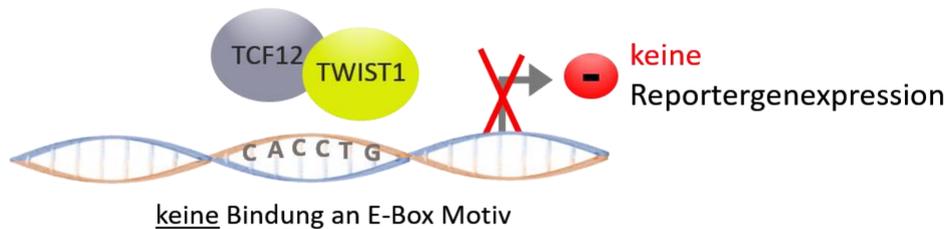
Seit den Studien von Sharma et al. im Jahre 2013 gilt *TWIST1* als wichtiger Dimerisierungspartner von *TCF12* bei der Regulation der Osteoblasten-Differenzierung

---

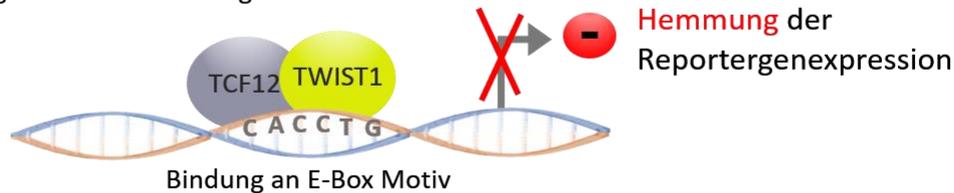
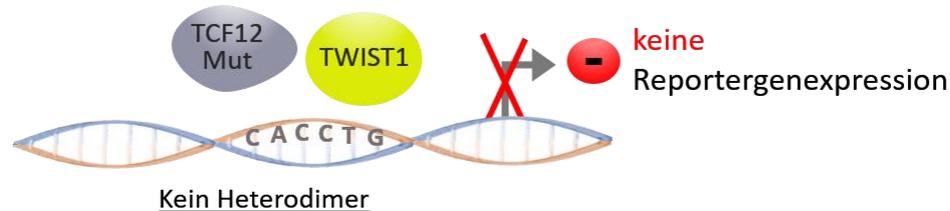
(siehe Kapitel 1.3)(Sharma et al., 2013). Daher wurde in einem weiteren Experiment die Transaktivierungsfähigkeit von TCF12 bei einer Co-Transfektion mit *TWIST1* untersucht. Eine Transfektion mit *TWIST1* alleine zeigte lediglich eine sehr geringe Reporterexpression, die im Verhältnis zu der gemessenen Aktivität von TCF12 WT nur 3% beträgt. Eine Co-Transfektion von *TWIST1* und TCF12 WT führte zu einer erheblichen Reduktion der Luciferase-Aktivität, welche kaum die gemessene Aktivität der Kontrolle überstieg (siehe Kapitel 3.4.2). Diese fehlende Transaktivierung des Reportergens bei Co-Transfektion beider Gene war überraschend, da beide Proteine alleine (als Homodimere) jeweils eine Transaktivierung induzieren und eine Transaktivierung durch das Heterodimer logisch erschien. Zwei mögliche Erklärungsansätze für diese Beobachtung sind in Abbildung 41 schematisch dargestellt.

**A** TWIST1 WTTCF12 WT**B** TCF12WT/TWIST1WT

Möglichkeit 1: keine Bindung



C Möglichkeit 2: Hemmung

**D** TCF12Mut/TWIST1WT**Abbildung 41: Erklärungsansätze für die Reduktion der Transaktivierung des Reportergens bei Co-Transfektion von *TCF12* und *TWIST1***

(A) *TWIST1* WT alleine bewirkt eine sehr geringe Aktivierung des Luciferase-Reportergens, während *TCF12* WT eine starke Luciferase-Aktivität induziert. Bei einer Co-Transfektion von *TCF12* und *TWIST1* ist keine Luciferase-Aktivität mehr messbar. In diesem Modell sind zwei verschiedene mögliche Mechanismen für die fehlende Reporterexpression dargestellt. (B) Zum einen besteht die Möglichkeit, dass das *TCF12*/*TWIST1* Heterodimer nicht an die getestete E-Box Sequenz bindet. (C) Zum anderen ist eine inhibitorische Funktion des Heterodimers möglich, die eine Expression des Reportergens gezielt unterdrückt. (D) Bei einer Co-Transfektion von *TWIST1* gemeinsam mit einer der getesteten *TCF12* Varianten, die die bHLH Domäne

beeinträchtigen findet mutmaßlich ebenfalls keine Dimerisierung statt, oder eine Hetero-Dimerisierung, bei der die Zusammenlagerung des Dimers beeinträchtigt ist, sodass keine Bindung am E-Box Motiv stattfindet und keine Reporterexpression detektiert werden kann.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die fehlende Aktivierung des Luciferase-Reportergens ist, dass das TCF12/TWIST1 Heterodimer an andere Ebox-Motiv Sequenzen bindet, als das in dieser Arbeit verwendete (siehe Abbildung 41B, „Möglichkeit 1“). Eine unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Ebox Sequenzen bei der Wahl eines anderen Dimerisierungspartners bewirkt eine gezieltere zell- und gewebespezifische Expression der Transkriptionsfaktoren (siehe Kapitel 1.3). Eine veränderte Bindungsaffinität des Heterodimers deutet somit in diesem Falle auf eine Art „Finetuning“ von TWIST1 auf das sehr ubiquitär exprimierte TCF12 hin, zumal TWIST1 nur eine sehr geringe Aktivierung des Luciferase-Reportergens bewirkt. Anhand von Analysen zu Motivanreicherungen konnten Chang et al. zeigen, dass TWIST1 eine besondere Affinität für E-Box Motive mit der Sequenzabfolge CAGATG besitzt und eine deutlich geringere für die in diesen Studien verwendete Sequenz CACCTG (2015). Ob TCF12 ebenfalls an das Sequenzmotiv CAGATG bindet wurde bisher nicht untersucht. Chang et al. zeigten darüber hinaus, dass TWIST1 im Gegensatz zu anderen bHLH Proteinen eine besonders hohe Affinität für ein doppeltes E-Box Motiv besitzt, das aus zwei E-Box Sequenzen besteht, die durch 5 Nukleotide voneinander getrennt sind. Ein solches doppeltes Ebox-Motiv mit der Sequenz CACCTGGGGACCACGTG konnte beispielsweise in der Promoterregion von *BMP4* identifiziert werden. Interessanterweise handelt es sich bei dem ersten der beiden Motive um das in dieser Arbeit verwendete Motiv CACCTG. Eine Bindung an das doppelte E-Box Motiv findet zwischen TWIST1 und seinem Dimerpartner E47 statt, welcher durch das Gen *TCF3* kodiert wird. Dabei binden zwei TWIST-E47 Dimere an das doppelte E-Box Motiv und bilden dabei ein hoch stabiles Tetramer aus (Chang et al., 2015). Ob TWIST1-TCF12 Dimere ebenfalls eine Affinität für das doppelte E-Box Motiv besitzen wurde bisher nicht untersucht. Um zu testen, ob die TCF12/TWIST1 Heterodimere eine höhere Affinität zu anderen Ebox-Sequenzen besitzen, könnten in zukünftigen Experimenten weitere Ebox-Sequenzen in den Reporter Assays untersucht werden.

Hu et al. führten EMSA (Elektrophoretische Mobilitäts Shift Assays) Studien durch, in denen sie die Bindungsaffinitäten von TCF12 und seinem Bindungspartner MYOG jeweils alleine sowie als Heterodimer (TCF12/MYOG) an unterschiedlichen Ebox-Sequenzen untersuchten (Hu et al., 1992). Die Studien erfolgten an drei verschiedenen Ebox-Motiven

der Sequenzabfolge CANNTG, darunter das in dieser Arbeit verwendete Motiv CACCTG. Sie konnten zeigen, dass sich die Bindungsaffinitäten von TCF12 und MYOG Homodimeren zu denen des Heterodimer-Komplexes stark unterscheiden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Motiv konnten Hu et al. bei TCF12 alleine eine sehr starke Bindung ermitteln, während das TCF12/MYOG Heterodimer eine schwächere Bindung an diesem Motiv zeigte. Diese Beobachtung korrespondiert mit den Ergebnissen des in dieser Arbeit durchgeführten Reporter-gen Assays, bei dem eine Co-Transfektion von TCF12 und TWIST1 eine nahezu komplette Reduktion der Transaktivierung des Reportgens zur Folge hatte.

Eine ähnliche Entdeckung machten auch Malik et al., die die Interaktion von BHLHA9 mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren der E-Protein Familie untersuchten, darunter auch TCF12 (Malik et al., 2014). Anhand eines Luciferase Assays konnten sie ebenfalls eine stark verringerte Transkriptionsaktivierung durch TCF12 in Gegenwart von BHLHA9 beobachten. Darüber hinaus testeten sie *BHLHA9* Varianten mit Substitutionen in der bHLH Region, die bei Patienten mit mesoaxialer synostotischer Syndaktylie (MSSD) identifiziert wurden. Eine Co-Transfektion der *BHLHA9* Varianten gemeinsam mit *TCF12* WT führte zu einer kompletten Reduktion der Transaktivierung. BHLHA9 gehört ebenso wie TWIST1 zu den Klasse II bHLH Transkriptionsfaktoren (McLellan et al., 2002). Aus ihren Ergebnissen zogen Malik et al. den Schluss, dass BHLHA9 durch eine Dimerisierung mit Klasse I bHLH Proteinen wie TCF12 eine Feinabstimmung der Expression gemeinsamer Zielgene steuert, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Extremitäten beim Menschen spielen.

Eine zweite mögliche Erklärung für die fehlende Transaktivierung des TCF12/TWIST1 Heterodimers im Reporter-gen Assay ist eine Hemmung der Transkription des Reportgens durch Bindung des Heterodimers an das Ebox-Motiv (Abbildung 41, „Möglichkeit 2“). Es ist bekannt, dass TWIST1 je nach Dimerisierungspartner und zellulärem Kontext sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren kann (Connerney et al., 2006, Firulli et al., 2005, Franco et al., 2011). Bereits seit längerer Zeit gilt TWIST1 als wichtiger Hemmer für die Osteoblasten-Differenzierung (Connerney et al., 2006, Bialek et al., 2004). Darüber hinaus gilt die Annahme, dass TCF12/TWIST1 Heterodimere durch Hemmung von *RUNX2* die osteogene Differenzierung inhibieren (Sharma et al., 2013). Eine Hemmung der Reporter-genexpression durch das Heterodimer ist daher ebenfalls durchaus denkbar.

Eine Co-Transfektion von TCF12 und TWIST1 bei abnehmender Konzentration von TWIST1 zeigte, dass bereits sehr geringe Mengen von TWIST1 eine Aktivierung des Luciferase-Reportergens verhindern (siehe Abbildung 35). Erst bei einer Co-Transfektion von 50ng *TWIST1* WT zu 350ng *TCF12* WT konnte eine erste geringe Luciferase Expression gemessen werden. Bei diesem Konzentrationsverhältnis überwiegt vermutlich der Anteil an TCF12 Homodimeren zu den TWIST1 Homodimeren bzw. TCF12/TWIST1 Heterodimeren, sodass eine erste geringe Aktivierung der Luciferase stattfinden kann.

#### **4.4.3 Einordnung der funktionellen Konsequenzen der drei *tcf12* Knockout-Mutationen**

Ebenso wie beim Menschen führen auch im Zebrafisch Mutationen, die die bHLH Domäne beeinträchtigen, zu einer Verringerung der Fähigkeit von Tcf12 zur Aktivierung der Ebox-regulierten Zielgene (siehe Kapitel 3.4.3).

##### **Nonsense-Mutation c.66T>A (p.Tyr22\*) (Exon 2)**

Bei der Nonsense-Mutation Tyr22\* konnte eine Luciferase-Aktivität von 65% gemessen werden. Die Knockoutlinie mit dieser Mutation (*tcf12<sup>sa14175</sup>*) zeigte keinerlei phänotypische Auffälligkeiten. In Kapitel 4.3.1 wurden zwei Möglichkeiten diskutiert, durch die diese Nonsense-Mutation kompensiert werden kann: ein Stopcodon *Readthrough* und eine Reinitialisierung der Translation. Diese beiden Mechanismen können auch die gemessene Luciferase-Aktivität von 65% erklären. Würde die Nonsense-Mutation nicht kompensiert werden, wäre mit keinerlei Aktivierung des Reportergens zu rechnen. Um aufzuklären, ob ein Stopcodon read-through oder eine Reinitialisierung der Translation bei einem *downstream* gelegenen Startcodon stattgefunden hat, wäre es möglich das Tcf12 Protein mit einem Westernblot zu detektieren. Dabei könnte zum einen ein Antikörper verwendet werden, der gegen den N-terminalen Teil des Proteins vor der Mutation gerichtet ist und zum anderen ein Antikörper, der den C-terminalen Bereich nachweist, der die bHLH-Domäne miteinschließt. Wird das Stopcodon durch einen *Readthrough* „überlesen“, sollten bei den N- und C-terminalen Antikörpern gleiche Mengen des Proteins detektiert werden. Findet hingegen eine Reinitialisierung statt, würde man in erster Linie einen deutlichen Nachweis des Proteins nur durch die C-terminal gerichteten Antikörper erwarten.

### **Mutation c. [754\_755insCTGG; 758\_759insACTT], p.Leu250fs\*14 (Exon 8)**

Bei der Mutation Leu250fs\*14 konnte erwartungsgemäß keine Aktivierung des Luciferase Reportergens gemessen werden. Die Mutation führt zu einem C-terminal trunkeierten Tcf12 Protein, das keine bHLH-Domäne besitzt, sodass keine Transaktivierung stattfinden kann. Die fehlende Transaktivierung erklärt auch den schweren Phänotyp der Knockoutlinie. Während heterozygote *tcf12<sup>Ex8</sup>* Mutanten kleinere Anomalien innerhalb der Schädelnähte und in seltenen Fällen Fusionen in den Koronarnähten ausbildeten, waren homozygote *tcf12<sup>Ex8</sup>* Mutanten nicht überlebensfähig. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ein heterozygoter Verlust von *tcf12* im Zebrafisch kompensiert werden kann, ein homozygoter Verlust hingegen nicht.

### **Mutation c.1473\_1474insATGGA, p.Met492fs\*56 (Exon 12)**

Bei der Mutation Met492fs\*56 konnte mit 72% die höchste Aktivität im Verhältnis zum WT Tcf12 detektiert werden. Da diese Mutation hinter der bHLH-Domäne lokalisiert ist, ist davon auszugehen, dass diese vollständig ausgebildet wird. Die verringerte Aktivierung ist vermutlich auf eine sterische Hinderung der bHLH-Domäne zurückzuführen. Die veränderte C-terminale Aminosäuresequenz führt mutmaßlich zu einer falschen Faltung des Proteins, die entweder eine Bindung an das Ebox-Motiv oder die Dimerisierung behindert.

Im Gegensatz zu der Knockoutmutation von Linie *tcf12<sup>Ex8</sup>* konnte bei den anderen beiden Knockout-Linien *tcf12<sup>sa14175</sup>* (Exon 2) und *tcf12<sup>Ex12</sup>* jeweils eine Restaktivität von 65% bzw. 72% nachgewiesen werden, die für das Überleben der Embryonen und eine weitestgehend unauffällige Entwicklung ausreichend zu sein scheint.

#### **4.4.4 Regulation der Transaktivierung von Tcf12 durch Twist1 im Zebrafisch**

Ebenso wie beim Menschen konnte auch im Zebrafisch gezeigt werden, dass die Fähigkeit des wildtypischen Tcf12 sowie der mutierten Tcf12 Proteine zur Transaktivierung bei einer Co-Expression mit *twist1* stark verringert wird (siehe Abbildung 37). Ein Unterschied lässt sich darin feststellen, dass die Twist1a/b Proteine alleine keine Aktivierung des Reportergens steuern, wohingegen beim Menschen eine geringe Luciferase-Aktivität bei alleiniger Transfektion mit TWIST1 gemessen werden konnte. Im Gegensatz zum Menschen konnte bei dem wildtypischen und den mutierten Tcf12 Proteinen in Anwesenheit von Twist1a/b eine geringe Aktivierung des Reportergens

---

detektiert werden. Diese Aktivierung konnte lediglich bei der Mutation Leu250fs\*14 nicht beobachtet werden, bei der auch bei einer alleinigen Transfektion keinerlei Aktivierung des Reportergens stattfand. Da Tcf12 WT und alle anderen getesteten mutierten Tcf12 Proteine bei alleiniger Transfektion eine Aktivierung der Firefly Luciferase regulierten, lässt sich diese Beobachtung vermutlich darauf zurückführen, dass einige der gebildeten Tcf12 Proteine Homodimere bilden, die diese geringe Aktivierung bewirkten. Die geringe Aktivierung bei Zugabe der beiden Paralogen Twist1 Proteine kann, ebenso wie beim Menschen, auf eine fehlende Bindung des Heterodimers oder auf eine Hemmung des Heterodimer Komplexes zurückgeführt werden (siehe Kapitel 4.4.2).

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- ADKINS, K. F. 1965. Alizarin Red S as an Intravital Fluorochrome in Mineralizing Tissues. *Stain Technol*, 40, 69-70.
- AMSTERDAM, A., LAI, K., KOMISARCZUK, A. Z., BECKER, T. S., BRONSON, R. T., HOPKINS, N. & LEES, J. A. 2009. Zebrafish Hagoromo mutants up-regulate *fgf8* postembryonically and develop neuroblastoma. *Mol Cancer Res*, 7, 841-50.
- AMSTERDAM, A., LIN, S. & HOPKINS, N. 1995. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev Biol*, 171, 123-9.
- ANDERSON, J., BURNS, H. D., ENRIQUEZ-HARRIS, P., WILKIE, A. O. & HEATH, J. K. 1998. Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Hum Mol Genet*, 7, 1475-83.
- ARONHEIM, A., SHIRAN, R., ROSEN, A. & WALKER, M. D. 1993. The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8063-7.
- ASHARANI, P. V., KEUPP, K., SEMLER, O., WANG, W., LI, Y., THIELE, H., YIGIT, G., POHL, E., BECKER, J., FROMMOLT, P., SONNTAG, C., ALTMULLER, J., ZIMMERMANN, K., GREENSPAN, D. S., AKARSU, N. A., NETZER, C., SCHONAU, E., WIRTH, R., HAMMERSCHMIDT, M., NURNBERG, P., WOLLNIK, B. & CARNEY, T. J. 2012. Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. *Am J Hum Genet*, 90, 661-74.
- AUER, T. O., DUROURE, K., DE CIAN, A., CONCORDET, J. P. & DEL BENE, F. 2014. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res*, 24, 142-53.
- BALCIUNAS, D., WANGENSTEEN, K. J., WILBER, A., BELL, J., GEURTS, A., SIVASUBBU, S., WANG, X., HACKETT, P. B., LARGAESPADA, D. A., MCIVOR, R. S. & EKKER, S. C. 2006. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *PLoS Genet*, 2, e169.
- BARNDT, R., DAI, M. F. & ZHUANG, Y. 1999. A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during alpha beta thymopoiesis. *J Immunol*, 163, 3331-43.
- BARNDT, R. J., DAI, M. & ZHUANG, Y. 2000. Functions of E2A-HEB heterodimers in T-cell development revealed by a dominant negative mutation of HEB. *Mol Cell Biol*, 20, 6677-85.
- BARRANGOU, R., FREMAUX, C., DEVEAU, H., RICHARDS, M., BOYAVAL, P., MOINEAU, S., ROMERO, D. A. & HORVATH, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709-12.
- BASSETT, D. I., BRYSON-RICHARDSON, R. J., DAGGETT, D. F., GAUTIER, P., KEENAN, D. G. & CURRIE, P. D. 2003. Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development*, 130, 5851-60.
- BEEDERMAN, M., FARINA, E. M. & REID, R. R. 2014. Molecular basis of cranial suture biology and disease: Osteoblastic and osteoclastic perspectives. *Genes Dis*, 1, 120-125.
- BEHR, B., LONGAKER, M. T. & QUARTO, N. 2011. Craniosynostosis of coronal suture in *twist1* mice occurs through endochondral ossification recapitulating the physiological closure of posterior frontal suture. *Front Physiol*, 2, 37.
- BENSIMON-BRITO, A., CARDEIRA, J., DIONISIO, G., HUYSSSEUNE, A., CANCELA, M. L. & WITTEN, P. E. 2016. Revisiting in vivo staining with alizarin red S--a valuable approach to analyse zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration. *BMC Dev Biol*, 16, 2.
- BERGEN, D. J. M., KAGUE, E. & HAMMOND, C. L. 2019. Zebrafish as an Emerging Model for Osteoporosis: A Primary Testing Platform for Screening New Osteo-Active Compounds. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 6.
- BESSA, J., TENA, J. J., DE LA CALLE-MUSTIENES, E., FERNANDEZ-MINAN, A., NARANJO, S., FERNANDEZ, A., MONTOLIU, L., AKALIN, A., LENHARD, B., CASARES, F. & GOMEZ-SKARMETA, J. L. 2009.

- Zebrafish enhancer detection (ZED) vector: a new tool to facilitate transgenesis and the functional analysis of cis-regulatory regions in zebrafish. *Dev Dyn*, 238, 2409-17.
- BEST, J. D. & ALDERTON, W. K. 2008. Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 4, 567-76.
- BHANDIWAD, A. A., ZEDDIES, D. G., RAIBLE, D. W., RUBEL, E. W. & SISNEROS, J. A. 2013. Auditory sensitivity of larval zebrafish (*Danio rerio*) measured using a behavioral prepulse inhibition assay. *J Exp Biol*, 216, 3504-13.
- BHATTACHARYA, A. & BAKER, N. E. 2011. A network of broadly expressed HLH genes regulates tissue-specific cell fates. *Cell*, 147, 881-92.
- BIALEK, P., KERN, B., YANG, X., SCHROCK, M., SOSIC, D., HONG, N., WU, H., YU, K., ORNITZ, D. M., OLSON, E. N., JUSTICE, M. J. & KARSENTY, G. 2004. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell*, 6, 423-35.
- BILL, B. R., PETZOLD, A. M., CLARK, K. J., SCHIMMENTI, L. A. & EKKER, S. C. 2009. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish*, 6, 69-77.
- BIRD, N. C. & MABEE, P. M. 2003. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). *Dev Dyn*, 228, 337-57.
- BLACKWOOD, E. M. & KADONAGA, J. T. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*, 281, 60-3.
- BLUMEL, R., ZINK, M., KLOPOCKI, E. & LIEDTKE, D. 2019. On the traces of tcf12: Investigation of the gene expression pattern during development and cranial suture patterning in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*, 14, e0218286.
- BOLON, B. 2004. Genetically engineered animals in drug discovery and development: a maturing resource for toxicologic research. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 95, 154-61.
- BOLOTIN, A., QUINQUIS, B., SOROKIN, A. & EHRlich, S. D. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151, 2551-2561.
- BOVERHOF, D. R., CHAMBERLAIN, M. P., ELCOMBE, C. R., GONZALEZ, F. J., HEFLICH, R. H., HERNANDEZ, L. G., JACOBS, A. C., JACOBSON-KRAM, D., LUIJTEN, M., MAGGI, A., MANJANATHA, M. G., BENTHEM, J. & GOLLAPUDI, B. B. 2011. Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook. *Toxicol Sci*, 121, 207-33.
- BRADLEY, J. P., SHAHINI, H., LEVINE, J. P., ROWE, N. & LONGAKER, M. T. 2000. Growth restriction of cranial sutures in the fetal lamb causes deformational changes, not craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg*, 105, 2416-23.
- BRAULT, V., MOORE, R., KUTSCH, S., ISHIBASHI, M., ROWITCH, D. H., MCMAHON, A. P., SOMMER, L., BOUSSADIA, O. & KEMLER, R. 2001. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development*, 128, 1253-64.
- BREY, E. M., CHENG, M. H., ALLORI, A., SATTERFIELD, W., CHANG, D. W., PATRICK, C. W., JR. & MILLER, M. J. 2007. Comparison of guided bone formation from periosteum and muscle fascia. *Plast Reconstr Surg*, 119, 1216-22.
- BROPHY, B., SMOLENSKI, G., WHEELER, T., WELLS, D., L'HUILLIER, P. & LAIBLE, G. 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol*, 21, 157-62.
- BROUNS, S. J., JORE, M. M., LUNDGREN, M., WESTRA, E. R., SLIJKHUIS, R. J., SNIJDERS, A. P., DICKMAN, M. J., MAKAROVA, K. S., KOONIN, E. V. & VAN DER OOST, J. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321, 960-4.
- BULGER, M. & GROUDINE, M. 1999. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev*, 13, 2465-77.
- BUTLER, J. E. & KADONAGA, J. T. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*, 16, 2583-92.
- CAETANO-LOPES, J., CANHAO, H. & FONSECA, J. E. 2007. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*, 32, 103-10.

- CARLTON, M. B., COLLEDGE, W. H. & EVANS, M. J. 1998. Crouzon-like craniofacial dysmorphology in the mouse is caused by an insertional mutation at the *Fgf3/Fgf4* locus. *Dev Dyn*, 212, 242-9.
- CARNOVALI, M., BANFI, G. & MARIOTTI, M. 2019. Zebrafish Models of Human Skeletal Disorders: Embryo and Adult Swimming Together. *Biomed Res Int*, 2019, 1253710.
- CARVER, E. A., ORAM, K. F. & GRIDLEY, T. 2002. Craniosynostosis in Twist heterozygous mice: a model for Saethre-Chotzen syndrome. *Anat Rec*, 268, 90-2.
- CHANG, A. T., LIU, Y., AYYANATHAN, K., BENNER, C., JIANG, Y., PROKOP, J. W., PAZ, H., WANG, D., LI, H. R., FU, X. D., RAUSCHER, F. J., 3RD & YANG, J. 2015. An evolutionarily conserved DNA architecture determines target specificity of the TWIST family bHLH transcription factors. *Genes Dev*, 29, 603-16.
- CHARLES, J. F., SURY, M., TSANG, K., URSO, K., HENKE, K., HUANG, Y., RUSSELL, R., DURYE, J. & HARRIS, M. P. 2017. Utility of quantitative micro-computed tomographic analysis in zebrafish to define gene function during skeletogenesis. *Bone*, 101, 162-171.
- CHEN, Y. T., AKINWUNMI, P. O., DENG, J. M., TAM, O. H. & BEHRINGER, R. R. 2007. Generation of a Twist1 conditional null allele in the mouse. *Genesis*, 45, 588-92.
- CHEN, Z. F. & BEHRINGER, R. R. 1995. twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev*, 9, 686-99.
- CIUREA, A. V. & TOADER, C. 2009. Genetics of craniosynostosis: review of the literature. *J Med Life*, 2, 5-17.
- CLARK, J. M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 16, 9677-86.
- COHEN, M. M., JR. 1993. Sutural biology and the correlates of craniosynostosis. *Am J Med Genet*, 47, 581-616.
- COHEN, S., KRAMARSKI, L., LEVI, S., DESHE, N., BEN DAVID, O. & ARBELY, E. 2019. Nonsense mutation-dependent reinitiation of translation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 47, 6330-6338.
- CONG, L., RAN, F. A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P. D., WU, X., JIANG, W., MARRAFFINI, L. A. & ZHANG, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-23.
- CONNERNEY, J., ANDREEVA, V., LESHEM, Y., MUEENTENER, C., MERCADO, M. A. & SPICER, D. B. 2006. Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev Dyn*, 235, 1345-57.
- CRITTENDEN, L. B. & SALTER, D. W. 1990. Expression of retroviral genes in transgenic chickens. *J Reprod Fertil Suppl*, 41, 163-71.
- CULP, P., NUSSLEIN-VOLHARD, C. & HOPKINS, N. 1991. High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7953-7.
- DAMAK, S., SU, H., JAY, N. P. & BULLOCK, D. W. 1996. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Biotechnology (N Y)*, 14, 185-8.
- DANILOVA, N. & STEINER, L. A. 2002. B cells develop in the zebrafish pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13711-6.
- DAS, A. & CRUMP, J. G. 2012. *Bmps* and *id2a* act upstream of *Twist1* to restrict ectomesenchyme potential of the cranial neural crest. *PLoS Genet*, 8, e1002710.
- DATHE, K., KJAER, K. W., BREHM, A., MEINECKE, P., NURNBERG, P., NETO, J. C., BRUNONI, D., TOMMERUP, N., OTT, C. E., KLOPOCKI, E., SEEMANN, P. & MUNDLOS, S. 2009. Duplications involving a conserved regulatory element downstream of *BMP2* are associated with brachydactyly type A2. *Am J Hum Genet*, 84, 483-92.
- DELAURIER, A., EAMES, B. F., BLANCO-SANCHEZ, B., PENG, G., HE, X., SWARTZ, M. E., ULLMANN, B., WESTERFIELD, M. & KIMMEL, C. B. 2010. Zebrafish sp7:EGFP: a transgenic for studying otic vesicle formation, skeletogenesis, and bone regeneration. *Genesis*, 48, 505-11.
- DELTCHEVA, E., CHYLINSKI, K., SHARMA, C. M., GONZALES, K., CHAO, Y., PIRZADA, Z. A., ECKERT, M. R., VOGEL, J. & CHARPENTIER, E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471, 602-7.

- DENMAN, J., HAYES, M., O'DAY, C., EDMUNDS, T., BARTLETT, C., HIRANI, S., EBERT, K. M., GORDON, K. & MCPHERSON, J. M. 1991. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology (N Y)*, 9, 839-43.
- DI ROCCO, F., BAUJAT, G., ARNAUD, E., RENIER, D., LAPLANCHE, J. L., DAIRE, V. C. & COLLET, C. 2014. Clinical spectrum and outcomes in families with coronal synostosis and TCF12 mutations. *Eur J Hum Genet*, 22, 1413-6.
- DORO, D. H., GRIGORIADIS, A. E. & LIU, K. J. 2017. Calvarial Suture-Derived Stem Cells and Their Contribution to Cranial Bone Repair. *Front Physiol*, 8, 956.
- DOUDNA, J. A. & CHARPENTIER, E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 1258096.
- DOYON, Y., MCCAMMON, J. M., MILLER, J. C., FARAJI, F., NGO, C., KATIBAH, G. E., AMORA, R., HOCKING, T. D., ZHANG, L., REBAR, E. J., GREGORY, P. D., URNOV, F. D. & AMACHER, S. L. 2008. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 26, 702-8.
- DU, S. J., FRENKEL, V., KINDSCHI, G. & ZOHAR, Y. 2001. Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein. *Dev Biol*, 238, 239-46.
- DUCY, P., ZHANG, R., GEOFFROY, V., RIDALL, A. L. & KARSENTY, G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747-54.
- EINHORN, T. A. 2005. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma*, 19, S4-6.
- EISEN, J. S. & SMITH, J. C. 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*, 135, 1735-43.
- EL GHOZZI, V., LE MERRER, M., PERRIN-SCHMITT, F., LAJEUNIE, E., BENIT, P., RENIER, D., BOURGEOIS, P., BOLCATO-BELLEMIN, A. L., MUNNICH, A. & BONAVENTURE, J. 1997. Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet*, 15, 42-6.
- ELNITSKI, L., HARDISON, R. C., LI, J., YANG, S., KOLBE, D., ESWARA, P., O'CONNOR, M. J., SCHWARTZ, S., MILLER, W. & CHIAROMONTE, F. 2003. Distinguishing regulatory DNA from neutral sites. *Genome Res*, 13, 64-72.
- FARAH, M. H., OLSON, J. M., SUCIC, H. B., HUME, R. I., TAPSCOTT, S. J. & TURNER, D. L. 2000. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development*, 127, 693-702.
- FIERAMONTI, L., BASSI, A., FOGLIA, E. A., PISTOCCHI, A., D'ANDREA, C., VALENTINI, G., CUBEDDU, R., DE SILVESTRI, S., CERULLO, G. & COTELLI, F. 2012. Time-gated optical projection tomography allows visualization of adult zebrafish internal structures. *PLoS One*, 7, e50744.
- FIRULLI, B. A., KRAWCHUK, D., CENTONZE, V. E., VARGESSON, N., VIRSHUP, D. M., CONWAY, S. J., CSERJESI, P., LAUFER, E. & FIRULLI, A. B. 2005. Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities. *Nat Genet*, 37, 373-81.
- FISHER, S., JAGADEESWARAN, P. & HALPERN, M. E. 2003. Radiographic analysis of zebrafish skeletal defects. *Dev Biol*, 264, 64-76.
- FOPPIANO, S., HU, D. & MARCUCIO, R. S. 2007. Signaling by bone morphogenetic proteins directs formation of an ectodermal signaling center that regulates craniofacial development. *Dev Biol*, 312, 103-14.
- FRANCO, H. L., CASASNOVAS, J., RODRIGUEZ-MEDINA, J. R. & CADILLA, C. L. 2011. Redundant or separate entities?--roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic Acids Res*, 39, 1177-86.
- FRANZ-ODENDAAL, T. A., HALL, B. K. & WITTEN, P. E. 2006. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*, 235, 176-90.
- FRAZER, J. K., MEEKER, N. D., RUDNER, L., BRADLEY, D. F., SMITH, A. C., DEMAREST, B., JOSHI, D., LOCKE, E. E., HUTCHINSON, S. A., TRIPP, S., PERKINS, S. L. & TREDE, N. S. 2009. Heritable T-cell malignancy models established in a zebrafish phenotypic screen. *Leukemia*, 23, 1825-35.

- FRIEDLAND, A. E., TZUR, Y. B., ESVELT, K. M., COLAIACOVO, M. P., CHURCH, G. M. & CALARCO, J. A. 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 10, 741-3.
- GALLAGHER, E. R., RATISOONTORN, C. & CUNNINGHAM, M. L. 1993. Saethre-Chotzen Syndrome. In: ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., PAGON, R. A., WALLACE, S. E., BEAN, L. J. H., STEPHENS, K. & AMEMIYA, A. (eds.) *GeneReviews((R))*. Seattle (WA).
- GAMA SOSA, M. A., DE GASPERI, R. & ELDER, G. A. 2010. Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct Funct*, 214, 91-109.
- GASIUNAS, G., BARRANGOU, R., HORVATH, P. & SIKSNYS, V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E2579-86.
- GERMANGUZ, I., LEV, D., WAISMAN, T., KIM, C. H. & GITELMAN, I. 2007. Four twist genes in zebrafish, four expression patterns. *Dev Dyn*, 236, 2615-26.
- GITELMAN, I. 2007. Evolution of the vertebrate twist family and synfunctionalization: a mechanism for differential gene loss through merging of expression domains. *Mol Biol Evol*, 24, 1912-25.
- GOETZ, R. & MOHAMMADI, M. 2013. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 166-80.
- GOLLING, G., AMSTERDAM, A., SUN, Z., ANTONELLI, M., MALDONADO, E., CHEN, W., BURGESS, S., HALDI, M., ARTZT, K., FARRINGTON, S., LIN, S. Y., NISSEN, R. M. & HOPKINS, N. 2002. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet*, 31, 135-40.
- GOOS, J. A., FENWICK, A. L., SWAGEMAKERS, S. M., MCGOWAN, S. J., KNIGHT, S. J., TWIGG, S. R., HOOGEBOOM, A. J., VAN DOOREN, M. F., MAGIELSEN, F. J., WALL, S. A., MATHIJSEN, I. M., WILKIE, A. O., VAN DER SPEK, P. J. & VAN DEN OUWELAND, A. M. 2016. Identification of Intragenic Exon Deletions and Duplication of TCF12 by Whole Genome or Targeted Sequencing as a Cause of TCF12-Related Craniosynostosis. *Hum Mutat*, 37, 732-6.
- GOUMENOS, A., TSOUTSOU, E., TRAEGER-SYNODINOS, J., PETYCHAKIS, D., GAVRA, M., KOLIALEXI, A. & FRYSIIRA, H. 2019. Two novel variants in the TCF12 gene identified in cases with craniosynostosis. *Appl Clin Genet*, 12, 19-25.
- GRAY, R. S., WILM, T. P., SMITH, J., BAGNAT, M., DALE, R. M., TOPCZEWSKI, J., JOHNSON, S. L. & SOLNICA-KREZEL, L. 2014. Loss of col8a1a function during zebrafish embryogenesis results in congenital vertebral malformations. *Dev Biol*, 386, 72-85.
- GREENE, H. S. 1933. Oxycephaly and Allied Conditions in Man and in the Rabbit. *J Exp Med*, 57, 967-76.
- GREENWALD, J. A., MEHRARA, B. J., SPECTOR, J. A., WARREN, S. M., FAGENHOLZ, P. J., SMITH, L. E., BOULETREAU, P. J., CRISERA, F. E., UENO, H. & LONGAKER, M. T. 2001. In vivo modulation of FGF biological activity alters cranial suture fate. *Am J Pathol*, 158, 441-52.
- GROENEN, P. M., BUNSCHOTEN, A. E., VAN SOOLINGEN, D. & VAN EMBDEN, J. D. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol*, 10, 1057-65.
- GROVA, M., LO, D. D., MONTORO, D., HYUN, J. S., CHUNG, M. T., WAN, D. C. & LONGAKER, M. T. 2012. Models of cranial suture biology. *J Craniofac Surg*, 23, 1954-8.
- HAFFTER, P., GRANATO, M., BRAND, M., MULLINS, M. C., HAMMERSCHMIDT, M., KANE, D. A., ODENTHAL, J., VAN EEDEN, F. J., JIANG, Y. J., HEISENBERG, C. P., KELSH, R. N., FURUTANI-SEIKI, M., VOGELANG, E., BEUCHLE, D., SCHACH, U., FABIAN, C. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123, 1-36.
- HAFFTER, P. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 1996. Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int J Dev Biol*, 40, 221-7.
- HALE, C. R., ZHAO, P., OLSON, S., DUFF, M. O., GRAVELEY, B. R., WELLS, L., TERNS, R. M. & TERNS, M. P. 2009. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 139, 945-56.

- HAMLET, M. R., YERGEAU, D. A., KULIYEV, E., TAKEDA, M., TAIRA, M., KAWAKAMI, K. & MEAD, P. E. 2006. Tol2 transposon-mediated transgenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis*, 44, 438-45.
- HAMMER, R. E., PURSEL, V. G., REXROAD, C. E., JR., WALL, R. J., BOLT, D. J., EBERT, K. M., PALMITER, R. D. & BRINSTER, R. L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315, 680-3.
- HAURWITZ, R. E., JINEK, M., WIEDENHEFT, B., ZHOU, K. & DOUDNA, J. A. 2010. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 329, 1355-8.
- HEBROK, M., WERTZ, K. & FUCHTBAUER, E. M. 1994. M-twist is an inhibitor of muscle differentiation. *Dev Biol*, 165, 537-44.
- HEPPNER GOSS, K., TRZEPACZ, C., TUOHY, T. M. F. & GRODEN, J. 2002. Attenuated *APC* alleles produce functional protein from internal translation initiation. 99, 8161-8166.
- HEUZE, Y., HOLMES, G., PETER, I., RICHTSMEIER, J. T. & JABS, E. W. 2014. Closing the Gap: Genetic and Genomic Continuum from Syndromic to Nonsyndromic Craniosynostoses. *Curr Genet Med Rep*, 2, 135-145.
- HOAGE, T., DING, Y. & XU, X. 2012. Quantifying cardiac functions in embryonic and adult zebrafish. *Methods Mol Biol*, 843, 11-20.
- HOEGG, S., BRINKMANN, H., TAYLOR, J. S. & MEYER, A. 2004. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J Mol Evol*, 59, 190-203.
- HORVATH, P., ROMERO, D. A., COUTE-MONVOISIN, A. C., RICHARDS, M., DEVEAU, H., MOINEAU, S., BOYAVAL, P., FREMAUX, C. & BARRANGOU, R. 2008. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 190, 1401-12.
- HOWARD, M. T., MALIK, N., ANDERSON, C. B., VOSKUIL, J. L., ATKINS, J. F. & GIBBONS, R. J. 2004. Attenuation of an amino-terminal premature stop codon mutation in the *ATRX* gene by an alternative mode of translational initiation. *J Med Genet*, 41, 951-6.
- HOWARD, T. D., PAZNEKAS, W. A., GREEN, E. D., CHIANG, L. C., MA, N., ORTIZ DE LUNA, R. I., GARCIA DELGADO, C., GONZALEZ-RAMOS, M., KLINE, A. D. & JABS, E. W. 1997. Mutations in *TWIST*, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet*, 15, 36-41.
- HOWE, D. G., BRADFORD, Y. M., CONLIN, T., EAGLE, A. E., FASHENA, D., FRAZER, K., KNIGHT, J., MANI, P., MARTIN, R., MOXON, S. A., PADDOCK, H., PICH, C., RAMACHANDRAN, S., RUEF, B. J., RUZICKA, L., SCHAPER, K., SHAO, X., SINGER, A., SPRUNGER, B., VAN SLYKE, C. E. & WESTERFIELD, M. 2013a. ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic Acids Res*, 41, D854-60.
- HOWE, K., CLARK, M. D., TORROJA, C. F., TORRANCE, J., BERTHELOT, C., MUFFATO, M., COLLINS, J. E., HUMPHRAY, S., MCLAREN, K., MATTHEWS, L., MCLAREN, S., SEALY, I., CACCAMO, M., CHURCHER, C., SCOTT, C., BARRETT, J. C., KOCH, R., RAUCH, G. J., WHITE, S., CHOW, W., KILIAN, B., QUINTAIS, L. T., GUERRA-ASSUNCAO, J. A., ZHOU, Y., GU, Y., YEN, J., VOGEL, J. H., EYRE, T., REDMOND, S., BANERJEE, R., CHI, J., FU, B., LANGLEY, E., MAGUIRE, S. F., LAIRD, G. K., LLOYD, D., KENYON, E., DONALDSON, S., SEHRA, H., ALMEIDA-KING, J., LOVELAND, J., TREVANION, S., JONES, M., QUAIL, M., WILLEY, D., HUNT, A., BURTON, J., SIMS, S., MCLAY, K., PLUMB, B., DAVIS, J., CLEE, C., OLIVER, K., CLARK, R., RIDDLE, C., ELLIOT, D., THREADGOLD, G., HARDEN, G., WARE, D., BEGUM, S., MORTIMORE, B., KERRY, G., HEATH, P., PHILLIMORE, B., TRACEY, A., CORBY, N., DUNN, M., JOHNSON, C., WOOD, J., CLARK, S., PELAN, S., GRIFFITHS, G., SMITH, M., GLITHERO, R., HOWDEN, P., BARKER, N., LLOYD, C., STEVENS, C., HARLEY, J., HOLT, K., PANAGIOTIDIS, G., LOVELL, J., BEASLEY, H., HENDERSON, C., GORDON, D., AUGER, K., WRIGHT, D., COLLINS, J., RAISEN, C., DYER, L., LEUNG, K., ROBERTSON, L., AMBRIDGE, K., LEONGAMORNLEERT, D., MCGUIRE, S., GILDERTHORP, R., GRIFFITHS, C., MANTHRAVADI, D., NICHOL, S., BARKER, G., et al. 2013b. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496, 498-503.
- HSU, P. D., SCOTT, D. A., WEINSTEIN, J. A., RAN, F. A., KONERMANN, S., AGARWALA, V., LI, Y., FINE, E. J., WU, X., SHALEM, O., CRADICK, T. J., MARRAFFINI, L. A., BAO, G. & ZHANG, F. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 31, 827-32.

- HU, J. S., OLSON, E. N. & KINGSTON, R. E. 1992. HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol Cell Biol*, 12, 1031-42.
- HUANG, P., XIAO, A., ZHOU, M., ZHU, Z., LIN, S. & ZHANG, B. 2011. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 29, 699-700.
- HUNZIKER, E. B. 1994. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech*, 28, 505-19.
- HUR, M., GISTELINCK, C. A., HUBER, P., LEE, J., THOMPSON, M. H., MONSTAD-RIOS, A. T., WATSON, C. J., MCMENAMIN, S. K., WILLAERT, A., PARICHY, D. M., COUCKE, P. & KWON, R. Y. 2017. MicroCT-based phenomics in the zebrafish skeleton reveals virtues of deep phenotyping in a distributed organ system. *Elife*, 6.
- HWANG, W. Y., FU, Y., REYON, D., MAEDER, M. L., TSAI, S. Q., SANDER, J. D., PETERSON, R. T., YEH, J. R. & JOUNG, J. K. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 31, 227-9.
- INAGAKI, H., KOGA, A., BESSHO, Y. & HORI, H. 1998. The tyrosinase gene from medakafish: transgenic expression rescues albino mutation. *Pigment Cell Res*, 11, 283-90.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING, C. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431, 931-45.
- ISHINO, Y., SHINAGAWA, H., MAKINO, K., AMEMURA, M. & NAKATA, A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 169, 5429-33.
- IZSVAK, Z., IVICS, Z. & PLASTERK, R. H. 2000. Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol*, 302, 93-102.
- JABS, E. W., MULLER, U., LI, X., MA, L., LUO, W., HAWORTH, I. S., KLISAK, I., SPARKES, R., WARMAN, M. L., MULLIKEN, J. B. & ET AL. 1993. A mutation in the homeodomain of the human *MSX2* gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell*, 75, 443-50.
- JAO, L. E., WENTE, S. R. & CHEN, W. 2013. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 13904-9.
- JIN, S. W., SIM, K. B. & KIM, S. D. 2016. Development and Growth of the Normal Cranial Vault : An Embryologic Review. *J Korean Neurosurg Soc*, 59, 192-6.
- JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J. A. & CHARPENTIER, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816-21.
- JINEK, M., EAST, A., CHENG, A., LIN, S., MA, E. & DOUDNA, J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2, e00471.
- JOHNSON, D., ISEKI, S., WILKIE, A. O. & MORRISS-KAY, G. M. 2000. Expression patterns of *Twist* and *Fgfr1*, -2 and -3 in the developing mouse coronal suture suggest a key role for *twist* in suture initiation and biogenesis. *Mech Dev*, 91, 341-5.
- JOHNSON, D. & WILKIE, A. O. 2011. Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet*, 19, 369-76.
- JURYNEC, M. J., SAWITZKE, A. D., BEALS, T. C., REDD, M. J., STEVENS, J., OTTERUD, B., LEPPERT, M. F. & GRUNWALD, D. J. 2018. A hyperactivating proinflammatory *RIPK2* allele associated with early-onset osteoarthritis. *Hum Mol Genet*, 27, 2383-2391.
- KAGUE, E., GALLAGHER, M., BURKE, S., PARSONS, M., FRANZ-ODENDAAL, T. & FISHER, S. 2012. Skeletogenic fate of zebrafish cranial and trunk neural crest. *PLoS One*, 7, e47394.
- KAGUE, E., ROY, P., ASSELIN, G., HU, G., SIMONET, J., STANLEY, A., ALBERTSON, C. & FISHER, S. 2016. *Osterix/Sp7* limits cranial bone initiation sites and is required for formation of sutures. *Dev Biol*, 413, 160-72.
- KAJIMOTO, Y. & ROTWEIN, P. 1991. Structure of the chicken insulin-like growth factor I gene reveals conserved promoter elements. *J Biol Chem*, 266, 9724-31.
- KANCZLER, J. M. & OREFFO, R. O. 2008. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*, 15, 100-14.

- KATSIANOY, M. A., ADAMOPOULOS, C., VASTARDIS, H. & BASDRA, E. K. 2016. Signaling mechanisms implicated in cranial sutures pathophysiology: Craniosynostosis. *BBA Clin*, 6, 165-176.
- KAUCKA, M., PETERSEN, J., TESAROVA, M., SZAROWSKA, B., KASTRITI, M. E., XIE, M., KICHEVA, A., ANNUSVER, K., KASPER, M., SYMMONS, O., PAN, L., SPITZ, F., KAISER, J., HOVORAKOVA, M., ZIKMUND, T., SUNADOME, K., MATISE, M. P., WANG, H., MARKLUND, U., ABDO, H., ERNFORS, P., MAIRE, P., WURMSER, M., CHAGIN, A. S., FRIED, K. & ADAMEYKO, I. 2018. Signals from the brain and olfactory epithelium control shaping of the mammalian nasal capsule cartilage. *Elife*, 7.
- KAWAKAMI, K. 2005. Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn*, 234, 244-54.
- KAWAKAMI, K. & NODA, T. 2004. Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics*, 166, 895-9.
- KAWAKAMI, K., SHIMA, A. & KAWAKAMI, N. 2000. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11403-8.
- KAWAKAMI, K., TAKEDA, H., KAWAKAMI, N., KOBAYASHI, M., MATSUDA, N. & MISHINA, M. 2004. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell*, 7, 133-44.
- KAWASAKI, K., BUCHANAN, A. V. & WEISS, K. M. 2009. Biomineralization in humans: making the hard choices in life. *Annu Rev Genet*, 43, 119-42.
- KEELING, K. M., XUE, X., GUNN, G. & BEDWELL, D. M. 2014. Therapeutics based on stop codon readthrough. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 15, 371-94.
- KIKUTA, H., FREDMAN, D., RINKWITZ, S., LENHARD, B. & BECKER, T. S. 2007. Retroviral enhancer detection insertions in zebrafish combined with comparative genomics reveal genomic regulatory blocks - a fundamental feature of vertebrate genomes. *Genome Biol*, 8 Suppl 1, S4.
- KIM, H. J., RICE, D. P., KETTUNEN, P. J. & THESLEFF, I. 1998. FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development*, 125, 1241-51.
- KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., ULLMANN, B. & SCHILLING, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203, 253-310.
- KLOPOCKI, E., LOHAN, S., BRANCATI, F., KOLL, R., BREHM, A., SEEMANN, P., DATHE, K., STRICKER, S., HECHT, J., BOSSE, K., BETZ, R. C., GARACI, F. G., DALLAPICCOLA, B., JAIN, M., MUENKE, M., NG, V. C., CHAN, W., CHAN, D. & MUNDLOS, S. 2011. Copy-number variations involving the IHH locus are associated with syndactyly and craniosynostosis. *Am J Hum Genet*, 88, 70-5.
- KOGA, A. 2004. Transposition mechanisms and biotechnology applications of the medaka fish Tol2 transposable element. *Adv Biophys*, 38, 161-80.
- KOGA, A., SUZUKI, M., INAGAKI, H., BESSHO, Y. & HORI, H. 1996. Transposable element in fish. *Nature*, 383, 30.
- KOKICH, V. 1986. The biology of sutures. In: COHEN, M. (ed.) *Craniosynostosis: diagnosis, evaluation, and management*. New York: Raven Press.
- KOMORI, T., YAGI, H., NOMURA, S., YAMAGUCHI, A., SASAKI, K., DEGUCHI, K., SHIMIZU, Y., BRONSON, R. T., GAO, Y. H., INADA, M., SATO, M., OKAMOTO, R., KITAMURA, Y., YOSHIKI, S. & KISHIMOTO, T. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89, 755-64.
- KOZAK, M. 1984. Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acids Res*, 12, 3873-93.
- KOZAK, M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234, 187-208.
- KURTH, I., KLOPOCKI, E., STRICKER, S., VAN OOSTERWIJK, J., VANEK, S., ALTMANN, J., SANTOS, H. G., VAN HARSSSEL, J. J., DE RAVEL, T., WILKIE, A. O., GAL, A. & MUNDLOS, S. 2009. Duplications of noncoding elements 5' of *SOX9* are associated with brachydactyly-anonychia. *Nat Genet*, 41, 862-3.
- LABRECHE, K., SIMEONOVA, I., KAMOUN, A., GLEIZE, V., CHUBB, D., LETOUZE, E., RIAZALHOSSEINI, Y., DOBBINS, S. E., ELAROUCI, N., DUCRAY, F., DE REYNIES, A., ZELENKA, D., WARDELL, C. P.,

- FRAMPTON, M., SAULNIER, O., PASTINEN, T., HALLOUT, S., FIGARELLA-BRANGER, D., DEHAIS, C., IDBAIH, A., MOKHTARI, K., DELATTRE, J. Y., HUILLARD, E., MARK LATHROP, G., SANSON, M., HOULSTON, R. S. & NETWORK, P. 2015. TCF12 is mutated in anaplastic oligodendroglioma. *Nat Commun*, 6, 7207.
- LAI, L., KANG, J. X., LI, R., WANG, J., WITT, W. T., YONG, H. Y., HAO, Y., WAX, D. M., MURPHY, C. N., RIEKE, A., SAMUEL, M., LINVILLE, M. L., KORTE, S. W., EVANS, R. W., STARZL, T. E., PRATHER, R. S. & DAI, Y. 2006. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 24, 435-6.
- LANA-ELOLA, E., RICE, R., GRIGORIADIS, A. E. & RICE, D. P. 2007. Cell fate specification during calvarial bone and suture development. *Dev Biol*, 311, 335-46.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, Y., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J. C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., HILLIER, L. W., MCPHERSON, J. D., MARRA, M. A., MARDIS, E. R., FULTON, L. A., CHINWALLA, A. T., PEPIN, K. H., GISH, W. R., CHISSOE, S. L., WENDL, M. C., DELEHAUNTY, K. D., MINER, T. L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J. B., COOK, L. L., FULTON, R. S., JOHNSON, D. L., MINX, P. J., CLIFTON, S. W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N., CHENG, J. F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- LANGLANDS, K., YIN, X., ANAND, G. & PROCHOWNIK, E. V. 1997. Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem*, 272, 19785-93.
- LAUE, K., POGODA, H. M., DANIEL, P. B., VAN HAERINGEN, A., ALANAY, Y., VON AMELN, S., RACHWALSKI, M., MORGAN, T., GRAY, M. J., BREUNING, M. H., SAWYER, G. M., SUTHERLAND-SMITH, A. J., NIKKELS, P. G., KUBISCH, C., BLOCH, W., WOLLNIK, B., HAMMERSCHMIDT, M. & ROBERTSON, S. P. 2011. Craniosynostosis and multiple skeletal anomalies in humans and zebrafish result from a defect in the localized degradation of retinoic acid. *Am J Hum Genet*, 89, 595-606.
- LAWRENCE, E. A., KAGUE, E., AGGLETON, J. A., HARNIMAN, R. L., RODDY, K. A. & HAMMOND, C. L. 2018. The mechanical impact of col11a2 loss on joints; col11a2 mutant zebrafish show changes to joint development and function, which leads to early-onset osteoarthritis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 373.
- LE LIEVRE, C. S. 1978. Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. *J Embryol Exp Morphol*, 47, 17-37.
- LE TANNO, P., POREAU, B., DEVILLARD, F., VIEVILLE, G., AMBLARD, F., JOUK, P. S., SATRE, V. & COUTTON, C. 2014. Maternal complex chromosomal rearrangement leads to TCF12 microdeletion in a patient presenting with coronal craniosynostosis and intellectual disability. *Am J Med Genet A*, 164A, 1530-6.
- LEE, C. C., CHEN, W. S., CHEN, C. C., CHEN, L. L., LIN, Y. S., FAN, C. S. & HUANG, T. S. 2012. TCF12 protein functions as transcriptional repressor of E-cadherin, and its overexpression is correlated with metastasis of colorectal cancer. *J Biol Chem*, 287, 2798-809.
- LEE, E., LE, T., ZHU, Y., ELAKIS, G., TURNER, A., LO, W., VENSELAAR, H., VERRENKAMP, C. A., SNOW, N., MOWAT, D., KIRK, E. P., SACHDEV, R., SMITH, J., BROWN, N. J., WALLIS, M., BARNETT, C., MCKENZIE, F., FRECKMANN, M. L., COLLINS, F., CHOPRA, M., GREGERSEN, N., HAYES, I., RAJAGOPALAN, S., TAN, T. Y., STARK, Z., SAVARIRAYAN, R., YEUNG, A., ADES, L., GATTAS, M.,

- GIBSON, K., GABBETT, M., AMOR, D. J., LATTANZI, W., BOYD, S., HAAN, E., GIANOUTSOS, M., COX, T. C., BUCKLEY, M. F. & ROSCIOLI, T. 2018. A craniosynostosis massively parallel sequencing panel study in 309 Australian and New Zealand patients: findings and recommendations. *Genet Med*, 20, 1061-1068.
- LEE, K. K. L., STANIER, P. & PAUWS, E. 2019. Mouse Models of Syndromic Craniosynostosis. *Mol Syndromol*, 10, 58-73.
- LEE, M. S., LOWE, G. N., STRONG, D. D., WERGEDAL, J. E. & GLACKIN, C. A. 1999. TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage. *J Cell Biochem*, 75, 566-77.
- LEE, O., GREEN, J. M. & TYLER, C. R. 2015. Transgenic fish systems and their application in ecotoxicology. *Crit Rev Toxicol*, 45, 124-41.
- LEGGATT, R. A., SUNDSTROM, L. F., WOODWARD, K. & DEVLIN, R. H. 2017. Growth-Enhanced Transgenic Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Strains Have Varied Success in Simulated Streams: Implications for Risk Assessment. *PLoS One*, 12, e0169991.
- LEMAIRE, C., HEILIG, R. & MANDEL, J. L. 1988. The chicken dystrophin cDNA: striking conservation of the C-terminal coding and 3' untranslated regions between man and chicken. *EMBO J*, 7, 4157-62.
- LENTON, K. A., NACAMULI, R. P., WAN, D. C., HELMS, J. A. & LONGAKER, M. T. 2005. Cranial suture biology. *Curr Top Dev Biol*, 66, 287-328.
- LETTICE, L. A., HEANEY, S. J., PURDIE, L. A., LI, L., DE BEER, P., OOSTRA, B. A., GOODE, D., ELGAR, G., HILL, R. E. & DE GRAAFF, E. 2003. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet*, 12, 1725-35.
- LETTICE, L. A. & HILL, R. E. 2005. Preaxial polydactyly: a model for defective long-range regulation in congenital abnormalities. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 294-300.
- LI, J. F., NORVILLE, J. E., AACH, J., MCCORMACK, M., ZHANG, D., BUSH, J., CHURCH, G. M. & SHEEN, J. 2013a. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 31, 688-91.
- LI, W., TENG, F., LI, T. & ZHOU, Q. 2013b. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 31, 684-6.
- LI, Y., BRAUER, P. M., SINGH, J., XHIKU, S., YOGANATHAN, K., ZUNIGA-PFLUCKER, J. C. & ANDERSON, M. K. 2017. Targeted Disruption of TCF12 Reveals HEB as Essential in Human Mesodermal Specification and Hematopoiesis. *Stem Cell Reports*, 9, 779-795.
- LIEBER, M. R. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 79, 181-211.
- LIN, C. H., STOECK, J., RAVANPAY, A. C., GUILLEMOT, F., TAPSCOTT, S. J. & OLSON, J. M. 2004. Regulation of neuroD2 expression in mouse brain. *Dev Biol*, 265, 234-45.
- LIN, S., YANG, S. & HOPKINS, N. 1994. lacZ expression in germline transgenic zebrafish can be detected in living embryos. *Dev Biol*, 161, 77-83.
- LOEYS, B. L., CHEN, J., NEPTUNE, E. R., JUDGE, D. P., PODOWSKI, M., HOLM, T., MEYERS, J., LEITCH, C. C., KATSANIS, N., SHARIFI, N., XU, F. L., MYERS, L. A., SPEVAK, P. J., CAMERON, D. E., DE BACKER, J., HELLEMANS, J., CHEN, Y., DAVIS, E. C., WEBB, C. L., KRESS, W., COUCKE, P., RIFKIN, D. B., DE PAEPE, A. M. & DIETZ, H. C. 2005. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet*, 37, 275-81.
- LOGAN, C. Y. & NUSSE, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781-810.
- LUUKKONEN, B. G., TAN, W. & SCHWARTZ, S. 1995. Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. *J Virol*, 69, 4086-94.

- MAAS, S. A., SUZUKI, T. & FALLON, J. F. 2011. Identification of spontaneous mutations within the long-range limb-specific Sonic hedgehog enhancer (ZRS) that alter Sonic hedgehog expression in the chicken limb mutants oligozeugodactyly and silkie breed. *Dev Dyn*, 240, 1212-22.
- MADDIN, H. C., PIEKARSKI, N., SEFTON, E. M. & HANKEN, J. 2016. Homology of the cranial vault in birds: new insights based on embryonic fate-mapping and character analysis. *R Soc Open Sci*, 3, 160356.
- MAKAROVA, K. S., ARAVIND, L., WOLF, Y. I. & KOONIN, E. V. 2011a. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol Direct*, 6, 38.
- MAKAROVA, K. S., HAFT, D. H., BARRANGOU, R., BROUNS, S. J., CHARPENTIER, E., HORVATH, P., MOINEAU, S., MOJICA, F. J., WOLF, Y. I., YAKUNIN, A. F., VAN DER OOST, J. & KOONIN, E. V. 2011b. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 9, 467-77.
- MALI, P., YANG, L., ESVELT, K. M., AACH, J., GUELL, M., DICARLO, J. E., NORVILLE, J. E. & CHURCH, G. M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 823-6.
- MALIK, S., PERCIN, F. E., BORNHOLDT, D., ALBRECHT, B., PERCESEPE, A., KOCH, M. C., LANDI, A., FRITZ, B., KHAN, R., MUMTAZ, S., AKARSU, N. A. & GRZESCHIK, K. H. 2014. Mutations affecting the BHLHA9 DNA-binding domain cause MSSD, mesoaxial synostotic syndactyly with phalangeal reduction, Malik-Percin type. *Am J Hum Genet*, 95, 649-59.
- MARIE, P. J. 2015. Osteoblast dysfunctions in bone diseases: from cellular and molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*, 72, 1347-61.
- MARIOTTI, M., CARNOVALI, M. & BANFI, G. 2015. Danio rerio: the Janus of the bone from embryo to scale. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 12, 188-94.
- MARKS, S. C., HERMEY, D.C. 1996. The Structure and Development of Bone. . In: BILEZEKIAN JP, R. L., RODAN GA (EDS). ACADEMIC (ed.) *Principles of Bone Biology*. SanDiego: Academic Press.
- MARKUS, M., DU, Z. & BENEZRA, R. 2002. Enhancer-specific modulation of E protein activity. *J Biol Chem*, 277, 6469-77.
- MASEPOHL, B., GORLITZ, K. & BOHME, H. 1996. Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120. *Biochim Biophys Acta*, 1307, 26-30.
- MASSARI, M. E. & MURRE, C. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, 20, 429-40.
- MATTHEWS, M. & VARGA, Z. M. 2012. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR J*, 53, 192-204.
- MCBRATNEY-OWEN, B., ISEKI, S., BAMFORTH, S. D., OLSEN, B. R. & MORRISS-KAY, G. M. 2008. Development and tissue origins of the mammalian cranial base. *Dev Biol*, 322, 121-32.
- MCCARTHY, N., SIDIK, A., BERTRAND, J. Y. & EBERHART, J. K. 2016. An Fgf-Shh signaling hierarchy regulates early specification of the zebrafish skull. *Dev Biol*, 415, 261-277.
- MCLELLAN, A. S., LANGLANDS, K. & KEALEY, T. 2002. Exhaustive identification of human class II basic helix-loop-helix proteins by virtual library screening. *Mech Dev*, 119 Suppl 1, S285-91.
- MEHRARA, B. J., SPECTOR, J. A., GREENWALD, J. A., UENO, H. & LONGAKER, M. T. 2002. Adenovirus-mediated transmission of a dominant negative transforming growth factor-beta receptor inhibits in vitro mouse cranial suture fusion. *Plast Reconstr Surg*, 110, 506-14.
- MENDELL, J. T. & DIETZ, H. C. 2001. When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell*, 107, 411-4.
- MENG, X., NOYES, M. B., ZHU, L. J., LAWSON, N. D. & WOLFE, S. A. 2008. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 26, 695-701.
- MESMAN, S., KRUSE, S. J. & SMIDT, M. P. 2018. Expression analyzes of early factors in midbrain differentiation programs. *Gene Expr Patterns*, 27, 8-15.
- MESMAN, S. & SMIDT, M. P. 2017. Tcf12 Is Involved in Early Cell-Fate Determination and Subset Specification of Midbrain Dopamine Neurons. *Front Mol Neurosci*, 10, 353.
- MESSING-JÜNGER, A. M., MARTINI, M. 2018. Syndromale Kraniosynostosen. In: BÄCHLI, H. L., J: MESSING-JÜNGER, M (ed.) *Pädiatrische Neurochirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- MEYER, A. & SCHARTL, M. 1999. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 699-704.

- MEYER, A. & VAN DE PEER, Y. 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*, 27, 937-45.
- MIANNE, J., CODNER, G. F., CAULDER, A., FELL, R., HUTCHISON, M., KING, R., STEWART, M. E., WELLS, S. & TBOUL, L. 2017. Analysing the outcome of CRISPR-aided genome editing in embryos: Screening, genotyping and quality control. *Methods*, 121-122, 68-76.
- MIRAOU, H., SEVERE, N., VAUDIN, P., PAGES, J. C. & MARIE, P. J. 2010. Molecular silencing of Twist1 enhances osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells: implication of FGFR2 signaling. *J Cell Biochem*, 110, 1147-54.
- MOJICA, F. J., DIEZ-VILLASENOR, C., GARCIA-MARTINEZ, J. & SORIA, E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 60, 174-82.
- MOJICA, F. J., FERRER, C., JUEZ, G. & RODRIGUEZ-VALERA, F. 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol*, 17, 85-93.
- MONGERA, A., SINGH, A. P., LEVESQUE, M. P., CHEN, Y. Y., KONSTANTINIDIS, P. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 2013. Genetic lineage labeling in zebrafish uncovers novel neural crest contributions to the head, including gill pillar cells. *Development*, 140, 916-25.
- MOONEY, M. P., ASTON, C. E., SIEGEL, M. I., LOSKEN, H. W., SMITH, T. D., BURROWS, A. M., WENGER, S. L., CARUSO, K., SIEGEL, B. & FERRELL, R. E. 1996. Craniosynostosis with autosomal dominant transmission in New Zealand white rabbits. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 16, 52-63.
- MOONEY, M. P., BURROWS, A. M., SMITH, T. D., LOSKEN, H. W., OPPERMAN, L. A., DECHANT, J., KREITHEN, A. M., KAPUCU, R., COOPER, G. M., OGLE, R. C. & SIEGEL, M. I. 2001. Correction of coronal suture synostosis using suture and dura mater allografts in rabbits with familial craniosynostosis. *Cleft Palate Craniofac J*, 38, 206-25.
- MORK, L. & CRUMP, G. 2015. Zebrafish Craniofacial Development: A Window into Early Patterning. *Curr Top Dev Biol*, 115, 235-69.
- MUENKE, M., GRIPP, K. W., MCDONALD-MCGINN, D. M., GAUDENZ, K., WHITAKER, L. A., BARTLETT, S. P., MARKOWITZ, R. I., ROBIN, N. H., NWOKORO, N., MULVIHILL, J. J., LOSKEN, H. W., MULLIKEN, J. B., GUTTMACHER, A. E., WILROY, R. S., CLARKE, L. A., HOLLWAY, G., ADES, L. C., HAAN, E. A., MULLEY, J. C., COHEN, M. M., JR., BELLUS, G. A., FRANCOMANO, C. A., MOLONEY, D. M., WALL, S. A., WILKIE, A. O. & ET AL. 1997. A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet*, 60, 555-64.
- MUENKE, M., SCHELL, U., HEHR, A., ROBIN, N. H., LOSKEN, H. W., SCHINZEL, A., PULLEYN, L. J., RUTLAND, P., REARDON, W., MALCOLM, S. & ET AL. 1994. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet*, 8, 269-74.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- MUNOZ-LOPEZ, M. & GARCIA-PEREZ, J. L. 2010. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics*, 11, 115-28.
- MURRE, C., BAIN, G., VAN DIJK, M. A., ENGEL, I., FURNARI, B. A., MASSARI, M. E., MATTHEWS, J. R., QUONG, M. W., RIVERA, R. R. & STUIVER, M. H. 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1218, 129-35.
- MURRE, C., MCCAWE, P. S., VAESSIN, H., CAUDY, M., JAN, L. Y., JAN, Y. N., CABRERA, C. V., BUSKIN, J. N., HAUSCHKA, S. D., LASSAR, A. B. & ET AL. 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58, 537-44.
- NASEVICIUS, A. & EKKER, S. C. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet*, 26, 216-20.
- NISHIKAWA, T., OTA, T. & ISOGAI, T. 2000. Prediction whether a human cDNA sequence contains initiation codon by combining statistical information and similarity with protein sequences. *Bioinformatics*, 16, 960-7.

- NODEN, D. M. 1982. Patterns and organization of craniofacial skeletogenic and myogenic mesenchyme: a perspective. *Prog Clin Biol Res*, 101, 167-203.
- NODEN, D. M. & TRAINOR, P. A. 2005. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat*, 207, 575-601.
- NUSSLEIN-VOLHARD, C., WIESCHAUS, E. & KLUDING, H. 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* : I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilehm Roux Arch Dev Biol*, 193, 267-282.
- O'NEIL, J., SHANK, J., CUSSON, N., MURRE, C. & KELLIHER, M. 2004. TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell*, 5, 587-96.
- OGLE, R. C., THOLPADY, S. S., MCGLYNN, K. A. & OGLE, R. A. 2004. Regulation of cranial suture morphogenesis. *Cells Tissues Organs*, 176, 54-66.
- OPPERMAN, L. A. 2000. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn*, 219, 472-85.
- OPPERMAN, L. A., CHHABRA, A., CHO, R. W. & OGLE, R. C. 1999. Cranial suture obliteration is induced by removal of transforming growth factor (TGF)-beta 3 activity and prevented by removal of TGF-beta 2 activity from fetal rat calvaria in vitro. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 19, 164-73.
- OPPERMAN, L. A., CHHABRA, A., NOLEN, A. A., BAO, Y. & OGLE, R. C. 1998. Dura mater maintains rat cranial sutures in vitro by regulating suture cell proliferation and collagen production. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 18, 150-8.
- OPPERMAN, L. A., MOURSI, A. M., SAYNE, J. R. & WINTERGERST, A. M. 2002. Transforming growth factor-beta 3(Tgf-beta3) in a collagen gel delays fusion of the rat posterior interfrontal suture in vivo. *Anat Rec*, 267, 120-30.
- OPPERMAN, L. A., NOLEN, A. A. & OGLE, R. C. 1997. TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 exhibit distinct patterns of expression during cranial suture formation and obliteration in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*, 12, 301-10.
- OPPERMAN, L. A., PASSARELLI, R. W., MORGAN, E. P., REINTJES, M. & OGLE, R. C. 1995. Cranial sutures require tissue interactions with dura mater to resist osseous obliteration in vitro. *J Bone Miner Res*, 10, 1978-87.
- OSHIMA, A., TANABE, H., YAN, T., LOWE, G. N., GLACKIN, C. A. & KUDO, A. 2002. A novel mechanism for the regulation of osteoblast differentiation: transcription of periostin, a member of the fasciclin I family, is regulated by the bHLH transcription factor, twist. *J Cell Biochem*, 86, 792-804.
- OTA, S., HISANO, Y., IKAWA, Y. & KAWAHARA, A. 2014. Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes Cells*, 19, 555-64.
- OVCHARENKO, I., NOBREGA, M. A., LOOTS, G. G. & STUBBS, L. 2004. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res*, 32, W280-6.
- OZISIK, G., MANTOVANI, G., ACHERMANN, J. C., PERSANI, L., SPADA, A., WEISS, J., BECK-PECCOZ, P. & JAMESON, J. L. 2003. An alternate translation initiation site circumvents an amino-terminal DAX1 nonsense mutation leading to a mild form of X-linked adrenal hypoplasia congenita. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 417-23.
- PALMITER, R. D., BRINSTER, R. L., HAMMER, R. E., TRUMBAUER, M. E., ROSENFELD, M. G., BIRNBERG, N. C. & EVANS, R. M. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300, 611-5.
- PARICHY, D. M., ELIZONDO, M. R., MILLS, M. G., GORDON, T. N. & ENGESZER, R. E. 2009. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev Dyn*, 238, 2975-3015.
- PARKER, M. H., PERRY, R. L., FAUTEUX, M. C., BERKES, C. A. & RUDNICKI, M. A. 2006. MyoD synergizes with the E-protein HEB beta to induce myogenic differentiation. *Mol Cell Biol*, 26, 5771-83.
- PAUL, S., SCHINDLER, S., GIOVANNONE, D., DE MILLO TERRAZZANI, A., MARIANI, F. V. & CRUMP, J. G. 2016. Ihha induces hybrid cartilage-bone cells during zebrafish jawbone regeneration. *Development*, 143, 2066-76.

- PAUMARD-HERNANDEZ, B., BERGES-SORIA, J., BARROSO, E., RIVERA-PEDROZA, C. I., PEREZ-CARRIZOSA, V., BENITO-SANZ, S., LOPEZ-MESSA, E., SANTOS, F., GARCIA, R., II, ROMANCE, A., BALLESTA-MARTINEZ, J. M., LOPEZ-GONZALEZ, V., CAMPOS-BARROS, A., CRUZ, J., GUILLEN-NAVARRO, E., SANCHEZ DEL POZO, J., LAPUNZINA, P., GARCIA-MINAUR, S. & HEATH, K. E. 2015. Expanding the mutation spectrum in 182 Spanish probands with craniosynostosis: identification and characterization of novel TCF12 variants. *Eur J Hum Genet*, 23, 907-14.
- PEDERSEN, A. G., BALDI, P., CHAUVIN, Y. & BRUNAK, S. 1999. The biology of eukaryotic promoter prediction--a review. *Comput Chem*, 23, 191-207.
- PENNACCHIO, L. A., AHITUV, N., MOSES, A. M., PRABHAKAR, S., NOBREGA, M. A., SHOUKRY, M., MINOVITSKY, S., DUBCHAK, I., HOLT, A., LEWIS, K. D., PLAJSER-FRICK, I., AKIYAMA, J., DE VAL, S., AFZAL, V., BLACK, B. L., COURONNE, O., EISEN, M. B., VISEL, A. & RUBIN, E. M. 2006. In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature*, 444, 499-502.
- PERCIVAL, C. J. & RICHTSMEIER, J. T. 2013. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn*, 242, 909-22.
- PERLYN, C. A., MORRIS-KAY, G., DARVANN, T., TENENBAUM, M. & ORNITZ, D. M. 2006. A model for the pharmacological treatment of crouzon syndrome. *Neurosurgery*, 59, 210-5; discussion 210-5.
- PIARD, J., ROZE, V., CZORNY, A., LENOIR, M., VALDUGA, M., FENWICK, A. L., WILKIE, A. O. & MALDERGEM, L. V. 2015. TCF12 microdeletion in a 72-year-old woman with intellectual disability. *Am J Med Genet A*, 167A, 1897-901.
- POLYCHRONOPOULOS, D., KING, J. W. D., NASH, A. J., TAN, G. & LENHARD, B. 2017. Conserved non-coding elements: developmental gene regulation meets genome organization. *Nucleic Acids Res*, 45, 12611-12624.
- POURCEL, C., SALVIGNOL, G. & VERGNAUD, G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151, 653-663.
- QUARTO, N. & LONGAKER, M. T. 2005. The zebrafish (*Danio rerio*): a model system for cranial suture patterning. *Cells Tissues Organs*, 181, 109-18.
- RACHWALSKI, M., KHONSARI, R. H. & PATERNOSTER, G. 2019. Current Approaches in the Development of Molecular and Pharmacological Therapies in Craniosynostosis Utilizing Animal Models. *Mol Syndromol*, 10, 115-123.
- RAVANPAY, A. C. & OLSON, J. M. 2008. E protein dosage influences brain development more than family member identity. *J Neurosci Res*, 86, 1472-81.
- RAWLS, J. F., MELLGREN, E. M. & JOHNSON, S. L. 2001. How the zebrafish gets its stripes. *Dev Biol*, 240, 301-14.
- RENN, J. & WINKLER, C. 2009. Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. *Dev Dyn*, 238, 241-8.
- RICE, D. P., ABERG, T., CHAN, Y., TANG, Z., KETTUNEN, P. J., PAKARINEN, L., MAXSON, R. E. & THESLEFF, I. 2000. Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development*, 127, 1845-55.
- RICHT, J. A., KASINATHAN, P., HAMIR, A. N., CASTILLA, J., SATHIYASEELAN, T., VARGAS, F., SATHIYASEELAN, J., WU, H., MATSUSHITA, H., KOSTER, J., KATO, S., ISHIDA, I., SOTO, C., ROBL, J. M. & KUROIWA, Y. 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol*, 25, 132-8.
- RICHTSMEIER, J. T. & FLAHERTY, K. 2013. Hand in glove: brain and skull in development and dysmorphogenesis. *Acta Neuropathol*, 125, 469-89.
- RISSONE, A. & BURGESS, S. M. 2018. Rare Genetic Blood Disease Modeling in Zebrafish. *Front Genet*, 9, 348.
- ROCHA-MARTINS, M., CAVALHEIRO, G. R., MATOS-RODRIGUES, G. E. & MARTINS, R. A. 2015. From Gene Targeting to Genome Editing: Transgenic animals applications and beyond. *An Acad Bras Cienc*, 87, 1323-48.

- RODRIGUEZ-ZABALA, M., AZA-CARMONA, M., RIVERA-PEDROZA, C. I., BELINCHON, A., GUERRERO-ZAPATA, I., BARRAZA-GARCIA, J., VALLESPIN, E., LU, M., DEL POZO, A., GLUCKSMAN, M. J., SANTOS-SIMARRO, F. & HEATH, K. E. 2017. FGF9 mutation causes craniosynostosis along with multiple synostoses. *Hum Mutat*, 38, 1471-1476.
- ROSCHLAU, K., ROMMEL, P., ANDREEWA, L., ZACKEL, M., ROSCHLAU, D., ZACKEL, B., SCHWERIN, M., HUHN, R. & GAZARJAN, K. G. 1989. Gene transfer experiments in cattle. *J Reprod Fertil Suppl*, 38, 153-60.
- SANDBERG, M., TAHER, L., HU, J., BLACK, B. L., NORD, A. S. & RUBENSTEIN, J. L. R. 2018. Genomic analysis of transcriptional networks directing progression of cell states during MGE development. *Neural Dev*, 13, 21.
- SANDER, J. D., CADE, L., KHAYTER, C., REYON, D., PETERSON, R. T., JOUNG, J. K. & YE, J. R. 2011. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol*, 29, 697-8.
- SANDER, J. D. & JOUNG, J. K. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 32, 347-55.
- SANDER, J. D., MAEDER, M. L., REYON, D., VOYTAS, D. F., JOUNG, J. K. & DOBBS, D. 2010. ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. *Nucleic Acids Res*, 38, W462-8.
- SANDER, J. D., ZABACK, P., JOUNG, J. K., VOYTAS, D. F. & DOBBS, D. 2007. Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic Acids Res*, 35, W599-605.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SATO, Y., KASAI, T., NAKAGAWA, S., TANABE, K., WATANABE, T., KAWAKAMI, K. & TAKAHASHI, Y. 2007. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev Biol*, 305, 616-24.
- SEHNERT, A. J., HUQ, A., WEINSTEIN, B. M., WALKER, C., FISHMAN, M. & STAINIER, D. Y. 2002. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat Genet*, 31, 106-10.
- SENARATH-YAPA, K., CHUNG, M. T., MCARDLE, A., WONG, V. W., QUARTO, N., LONGAKER, M. T. & WAN, D. C. 2012. Craniosynostosis: molecular pathways and future pharmacologic therapy. *Organogenesis*, 8, 103-13.
- SHAH, A. N., DAVEY, C. F., WHITEBIRCH, A. C., MILLER, A. C. & MOENS, C. B. 2015. Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish. *Nat Methods*, 12, 535-40.
- SHAH, S. A., ERDMANN, S., MOJICA, F. J. & GARRETT, R. A. 2013. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. *RNA Biol*, 10, 891-9.
- SHAN, Q., WANG, Y., LI, J., ZHANG, Y., CHEN, K., LIANG, Z., ZHANG, K., LIU, J., XI, J. J., QIU, J. L. & GAO, C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 31, 686-8.
- SHARMA, V. P., FENWICK, A. L., BROCKOP, M. S., MCGOWAN, S. J., GOOS, J. A., HOOGEBOOM, A. J., BRADY, A. F., JEELANI, N. O., LYNCH, S. A., MULLIKEN, J. B., MURRAY, D. J., PHIPPS, J. M., SWEENEY, E., TOMKINS, S. E., WILSON, L. C., BENNETT, S., CORNALL, R. J., BROXHOLME, J., KANAPIN, A., WHOLE-GENOME SEQUENCES, C., JOHNSON, D., WALL, S. A., VAN DER SPEK, P. J., MATHIJSSSEN, I. M., MAXSON, R. E., TWIGG, S. R. & WILKIE, A. O. 2013. Mutations in TCF12, encoding a basic helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nat Genet*, 45, 304-7.
- SHEN, Y., YUE, F., MCCLEARY, D. F., YE, Z., EDSALL, L., KUANG, S., WAGNER, U., DIXON, J., LEE, L., LOBANENKOV, V. V. & REN, B. 2012. A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature*, 488, 116-20.
- SHIN, J. T., PRIEST, J. R., OVCHARENKO, I., RONCO, A., MOORE, R. K., BURNS, C. G. & MACRAE, C. A. 2005. Human-zebrafish non-coding conserved elements act in vivo to regulate transcription. *Nucleic Acids Res*, 33, 5437-45.
- SICCARDI, A. J., 3RD, PADGETT-VASQUEZ, S., GARRIS, H. W., NAGY, T. R., D'ABRAMO, L. R. & WATTS, S. A. 2010. Dietary strontium increases bone mineral density in intact zebrafish (*Danio rerio*): a potential model system for bone research. *Zebrafish*, 7, 267-73.

- SIMPSON, P. 1983. Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics*, 105, 615-32.
- SINGLEMAN, C. & HOLTZMAN, N. G. 2014. Growth and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*: a staging tool for teaching and research. *Zebrafish*, 11, 396-406.
- SKABKIN, M. A., SKABKINA, O. V., HELLEN, C. U. & PESTOVA, T. V. 2013. Reinitiation and other unconventional posttermination events during eukaryotic translation. *Mol Cell*, 51, 249-64.
- SONG, L., LI, Y., WANG, K., WANG, Y. Z., MOLOTKOV, A., GAO, L., ZHAO, T., YAMAGAMI, T., WANG, Y., GAN, Q., PLEASURE, D. E. & ZHOU, C. J. 2009. Lrp6-mediated canonical Wnt signaling is required for lip formation and fusion. *Development*, 136, 3161-71.
- STELNICKI, E. J., VANDERWALL, K., HARRISON, M. R., LONGAKER, M. T., KABAN, L. B. & HOFFMAN, W. Y. 1998a. The in utero correction of unilateral coronal craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg*, 101, 287-96.
- STELNICKI, E. J., VANDERWALL, K., HOFFMAN, W. Y., HARRISON, M. R., GLOWACKI, J. & LONGAKER, M. T. 1998b. A new in utero sheep model for unilateral coronal craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg*, 101, 278-86.
- STEWART, S., GOMEZ, A. W., ARMSTRONG, B. E., HENNER, A. & STANKUNAS, K. 2014. Sequential and opposing activities of Wnt and BMP coordinate zebrafish bone regeneration. *Cell Rep*, 6, 482-98.
- STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. & SINGER, F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291, 293-6.
- STUART, G. W., MCMURRAY, J. V. & WESTERFIELD, M. 1988. Replication, integration and stable germline transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development*, 103, 403-12.
- STUART, G. W., VIELKIND, J. R., MCMURRAY, J. V. & WESTERFIELD, M. 1990. Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Development*, 109, 577-84.
- SYMINGTON, L. S. 2014. End resection at double-strand breaks: mechanism and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.
- TAMMIMIES, K., MARSHALL, C. R., WALKER, S., KAUR, G., THIRUVAHINDRAPURAM, B., LIONEL, A. C., YUEN, R. K., UDDIN, M., ROBERTS, W., WEKSBERG, R., WOODBURY-SMITH, M., ZWAIGENBAUM, L., ANAGNOSTOU, E., WANG, Z., WEI, J., HOWE, J. L., GAZZELLONE, M. J., LAU, L., SUNG, W. W., WHITTEN, K., VARDY, C., CROSBIE, V., TSANG, B., D'ABATE, L., TONG, W. W., LUSCOMBE, S., DOYLE, T., CARTER, M. T., SZATMARI, P., STUCKLESS, S., MERICO, D., STAVROPOULOS, D. J., SCHERER, S. W. & FERNANDEZ, B. A. 2015. Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *JAMA*, 314, 895-903.
- TEBOUL, L., MURRAY, S. A. & NOLAN, P. M. 2017. Phenotyping first-generation genome editing mutants: a new standard? *Mamm Genome*, 28, 377-382.
- TENG, C. S., CAVIN, L., MAXSON, R. E. J., SANCHEZ-VILLAGRA, M. R. & CRUMP, J. G. 2019. Resolving homology in the face of shifting germ layer origins: Lessons from a major skull vault boundary. *Elife*, 8.
- TENG, C. S., TING, M. C., FARMER, D. T., BROCKOP, M., MAXSON, R. E. & CRUMP, J. G. 2018. Altered bone growth dynamics prefigure craniosynostosis in a zebrafish model of Saethre-Chotzen syndrome. *Elife*, 7.
- THISSE, B., EL MESSAL, M. & PERRIN-SCHMITT, F. 1987. The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res*, 15, 3439-53.
- THISSE, B., THISSE, C. . 2004. *Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis*. ZFIN Direct Data Submission [Online]. Available: <http://zfin.org> [Accessed].
- THISSE, C., AND THISSE, B. 2005. *High Throughput Expression Analysis of ZF-Models Consortium Clones*. ZFIN Direct Data Submission. [Online]. Available: <http://zfin.org> [Accessed].
- TIMBERLAKE, A. T., WU, R., NELSON-WILLIAMS, C., FUREY, C. G., HILDEBRAND, K. I., ELTON, S. W., WOOD, J. S., PERSING, J. A. & LIFTON, R. P. 2018. Co-occurrence of frameshift mutations in SMAD6 and TCF12 in a child with complex craniosynostosis. *Hum Genome Var*, 5, 14.

- TOPCZEWSKA, J. M., SHOELA, R. A., TOMASZEWSKI, J. P., MIRMIRA, R. B. & GOSAIN, A. K. 2016. The Morphogenesis of Cranial Sutures in Zebrafish. *PLoS One*, 11, e0165775.
- UITTENBOGAARD, M. & CHIARAMELLO, A. 1999. Expression of the basic Helix-Loop-Helix ME1 E-protein during development and aging of the murine cerebellum. *Neurosci Lett*, 274, 191-4.
- UITTENBOGAARD, M. & CHIARAMELLO, A. 2002. Expression of the bHLH transcription factor Tcf12 (ME1) gene is linked to the expansion of precursor cell populations during neurogenesis. *Brain Res Gene Expr Patterns*, 1, 115-21.
- URASAKI, A., MITO, T., NOJI, S., UEDA, R. & KAWAKAMI, K. 2008. Transposition of the vertebrate Tol2 transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 425, 64-8.
- VARSHNEY, G. K., LU, J., GILDEA, D. E., HUANG, H., PEI, W., YANG, Z., HUANG, S. C., SCHOENFELD, D., PHO, N. H., CASERO, D., HIRASE, T., MOSBROOK-DAVIS, D., ZHANG, S., JAO, L. E., ZHANG, B., WOODS, I. G., ZIMMERMAN, S., SCHIER, A. F., WOLFSBERG, T. G., PELLEGRINI, M., BURGESS, S. M. & LIN, S. 2013. A large-scale zebrafish gene knockout resource for the genome-wide study of gene function. *Genome Res*, 23, 727-35.
- VAVOURI, T. & LEHNER, B. 2009. Conserved noncoding elements and the evolution of animal body plans. *Bioessays*, 31, 727-35.
- VIRCHOW, R. 1851. Über den Cretinismus namentlich in Franken, und über pathologische Schädelformen. *Verh Phys Med Gesellsch Würzburg*, 2, 231-271.
- VISEL, A., MINOVITSKY, S., DUBCHAK, I. & PENNACCHIO, L. A. 2007. VISTA Enhancer Browser--a database of tissue-specific human enhancers. *Nucleic Acids Res*, 35, D88-92.
- VU, H. L., PANCHAL, J., PARKER, E. E., LEVINE, N. S. & FRANCEL, P. 2001. The timing of physiologic closure of the metopic suture: a review of 159 patients using reconstructed 3D CT scans of the craniofacial region. *J Craniofac Surg*, 12, 527-32.
- WALKER, M. B. & KIMMEL, C. B. 2007. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech Histochem*, 82, 23-8.
- WALSHE, J. & MASON, I. 2003. Fgf signalling is required for formation of cartilage in the head. *Dev Biol*, 264, 522-36.
- WANG, D., CLAUS, C. L., VACCARELLI, G., BRAUNSTEIN, M., SCHMITT, T. M., ZUNIGA-PFLUCKER, J. C., ROTHENBERG, E. V. & ANDERSON, M. K. 2006. The basic helix-loop-helix transcription factor HEBAIt is expressed in pro-T cells and enhances the generation of T cell precursors. *J Immunol*, 177, 109-19.
- WANG, H., YANG, H., SHIVALILA, C. S., DAWLATY, M. M., CHENG, A. W., ZHANG, F. & JAENISCH, R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153, 910-8.
- WANG, L. H. & BAKER, N. E. 2015. E Proteins and ID Proteins: Helix-Loop-Helix Partners in Development and Disease. *Dev Cell*, 35, 269-80.
- WANG, X., GREGORY-EVANS, C. Y. J. C. & SCIENCES, M. L. 2015. Nonsense suppression therapies in ocular genetic diseases. 72, 1931-1938.
- WANG, Y., LI, Y. P., PAULSON, C., SHAO, J. Z., ZHANG, X., WU, M. & CHEN, W. 2014. Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19, 379-407.
- WANG, Y., XIAO, R., YANG, F., KARIM, B. O., IACOVELLI, A. J., CAI, J., LERNER, C. P., RICHTSMEIER, J. T., LESZL, J. M., HILL, C. A., YU, K., ORNITZ, D. M., ELISSEFF, J., HUSO, D. L. & JABS, E. W. 2005. Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2(+/-S252W) mouse. *Development*, 132, 3537-48.
- WEHNER, D., CIZELSKY, W., VASUDEVARO, M. D., OZHAN, G., HAASE, C., KAGERMEIER-SCHENK, B., RÖDER, A., DORSKY, R. I., MORO, E., ARGENTON, F., KUHL, M. & WEIDINGER, G. 2014. Wnt/beta-catenin signaling defines organizing centers that orchestrate growth and differentiation of the regenerating zebrafish caudal fin. *Cell Rep*, 6, 467-81.
- WEST, A. G., GASZNER, M. & FELSENFELD, G. 2002. Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev*, 16, 271-88.
- WESTERFIELD, M. 2000. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, Univ. of Oregon Press.

- WHITE, R. M., SESSA, A., BURKE, C., BOWMAN, T., LEBLANC, J., CEOL, C., BOURQUE, C., DOVEY, M., GOESSLING, W., BURNS, C. E. & ZON, L. I. 2008. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell*, 2, 183-9.
- WHITTON, A., HYZY, S. L., BRITT, C., WILLIAMS, J. K., BOYAN, B. D. & OLIVARES-NAVARRETE, R. 2016. Differential spatial regulation of BMP molecules is associated with single-suture craniosynostosis. *J Neurosurg Pediatr*, 18, 83-91.
- WIECHERS, L., SAMANTA, A. & NAGEL-WOLFRUM, K. J. M. G. 2017. Das Überlesen von Nonsense-Mutationen. 29, 217-224.
- WILKIE, A. O. M., JOHNSON, D. & WALL, S. A. 2017. Clinical genetics of craniosynostosis. *Curr Opin Pediatr*, 29, 622-628.
- WOOLFE, A., GOODSON, M., GOODE, D. K., SNELL, P., MCEWEN, G. K., VAVOURI, T., SMITH, S. F., NORTH, P., CALLAWAY, H., KELLY, K., WALTER, K., ABNIZOVA, I., GILKS, W., EDWARDS, Y. J., COOKE, J. E. & ELGAR, G. 2005. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol*, 3, e7.
- WU, K., LI, S., BODHINATHAN, K., MEYERS, C., CHEN, W., CAMPBELL-THOMPSON, M., MCINTYRE, L., FOSTER, T. C., MUZYCZKA, N. & KUMAR, A. 2012. Enhanced expression of Pctk1, Tcf12 and Ccnd1 in hippocampus of rats: Impact on cognitive function, synaptic plasticity and pathology. *Neurobiol Learn Mem*, 97, 69-80.
- WU, X. & GU, Y. 2019. Signaling Mechanisms Underlying Genetic Pathophysiology of Craniosynostosis. *Int J Biol Sci*, 15, 298-311.
- XU, X., MEILER, S. E., ZHONG, T. P., MOHIDEEN, M., CROSSLEY, D. A., BURGGREN, W. W. & FISHMAN, M. C. 2002. Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nat Genet*, 30, 205-9.
- YAFFE, D., NUDEL, U., MAYER, Y. & NEUMAN, S. 1985. Highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mRNAs coding for homologous proteins in distantly related species. *Nucleic Acids Res*, 13, 3723-37.
- YANG, D. C., TSAI, C. C., LIAO, Y. F., FU, H. C., TSAY, H. J., HUANG, T. F., CHEN, Y. H. & HUNG, S. C. 2011. Twist controls skeletal development and dorsoventral patterning by regulating runx2 in zebrafish. *PLoS One*, 6, e27324.
- YEN, S. T., ZHANG, M., DENG, J. M., USMAN, S. J., SMITH, C. N., PARKER-THORNBURG, J., SWINTON, P. G., MARTIN, J. F. & BEHRINGER, R. R. 2014. Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Dev Biol*, 393, 3-9.
- YI, S., YU, M., YANG, S., MIRON, R. J. & ZHANG, Y. 2017. Tcf12, A Member of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors, Mediates Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation In Vitro and In Vivo. *Stem Cells*, 35, 386-397.
- YILMAZ, E., MIHCI, E., NUR, B. & ALPER, O. M. 2019. Coronal craniosynostosis due to TCF12 mutations in patients from Turkey. *Am J Med Genet A*.
- YU, K., HERR, A. B., WAKSMAN, G. & ORNITZ, D. M. 2000. Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14536-41.
- ZHANG, H., DVORNIKOV, A. V., HUTTNER, I. G., MA, X., SANTIAGO, C. F., FATKIN, D. & XU, X. 2018. A Langendorff-like system to quantify cardiac pump function in adult zebrafish. *Dis Model Mech*, 11.
- ZHOU, Y. X., XU, X., CHEN, L., LI, C., BRODIE, S. G. & DENG, C. X. 2000. A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Mol Genet*, 9, 2001-8.
- ZHUANG, Y., CHENG, P. & WEINTRAUB, H. 1996. B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol*, 16, 2898-905.







## ANHANG

### A) Primer-Sequenzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software Primer3Plus erstellt und über die Firmen Eurofins oder Sigma-Aldrich bezogen.

<b>Klonierung der <i>tcf12</i>:EGFP Promoter Konstrukte</b>	
<i>tcf12</i> promoter For <i>attB4</i>	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCTCACTAGACTTCTTGCAGACA
<i>tcf12</i> promoter Rev <i>attB1R</i>	GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGCCTTTTCACAAACC CGCTCC
<b>Klonierung der Plasmide für <i>tcf12</i> Enhancer Analysen</b>	
hs357_ <i>attB</i> _Insert_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGGCTCAGAT GATGCGATATCCA
hs357_ <i>attB</i> _Insert_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGAATCTCACA GGTTTTTGCAGCAT
hs623_ <i>attB</i> _Insert_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACATATGTAA TTTTGTAGATTTGTATTATTATTATTATTATTGCT
hs623_ <i>attB</i> _Insert_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTACACACACAAA CATCACAATGCCAA
CNE3_ <i>attB</i> _Insert_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATTAGTATCC ACACTCCACAGCCT
CNE3_ <i>attB</i> _Insert_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCCCAGTTTGG ATGTTTGCG
<b>Whole-mount in-situ Hybridisierungen</b>	
<i>tcf12</i> _isH_for	AGGTGTATTGGCCAGTCAGG
<i>tcf12</i> _isH_rev	GGCACTTGCCAGTTTTCTTC
twist1a_isH_for	GATTTAGGTGACACTATAGAAGTGAAGTCACTGGAAGGAGC
twist1a_isH_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGGATCTATTCTGCATTGTGAC
twist1b_isH_for	GATTTAGGTGACACTATAGAATATGTTGCTCACGAGCGTTT
twist1b_isH_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGGAGGCTTCAATTCCCATTTT C
<b>Screening-Primer für Klonierungen</b>	
Sp6 Primer	ATTTAGGTGACACTATAG
T7 Primer	TAATACGACTCACTATAGGG
<b>Klonierung der Plasmide für das Dual-Glo Luciferase Assay System</b>	
TCF12_C316_A>G_for	GATCTGATGGGAAAACATCAGAGAGAGGCTCATTTTCCC
TCF12_C316_A>G_rev	TGAGTTCATGAAAGGTGTTGGGACAAGCCTTCATGGGCT
TCF12_C1807_C>T_for	TGGATGGCTAACAATGCCAGAGAACGCTTACGCGTG
TCF12_C1807_C>T_rev	CCTCTCCTTCTCCCTTTCTATCTTCTGTTTCAGGGTTCA
TCF12_c1885_C>T_for	TAGCTTCACTTGAAGAGTGAAAAACCCCAAACAAACTCC
Tcf12_c1885_C>T_rev	ACACATTCCGCCAAGCTCTTTGAATGCTTCATTAATATCC

Tcf12_c1921_CT_for	TTCCTTATTCTTCATCAAGCCGTGGCAGTCATCCTTAGTC
Tcf12_c1921_CT_rev	TTTTGTTTGGGGTTTTTCACTCTTCAAGTGAAGCTGACAC
Tcf12_c1930_CT_for	TTTCATCAAGCCGTGGCAGTCATCCTTAGTCTAGAACAG
Tcf12_c1930_CT_rev	AATAAGGAGTTTTGTTTGGGGTTTTTCACTCTTCAAGTG
Tcf12_c1921_CT_mit c1930_CT_for	TTTCATCAAGCCGTGGCAGTCATCCTTAGTCTAGAACAG
Tcf12_c1921_CT_mit c1930_CT_rev	AATAAGGAATTTTTGTTTGGGGTTTTTCACTCTTCAAGTG
tcf12_zf_Ex2_T>A_for	AGCACCATCTCCCAGCTCAGAGGACTTCAACAGAGACTCT
tcf12_zf_Ex2_T>A_rev	TACACCGATTTTTCCGTTGTAGTAATACATGCTGCCCATTC
tcf12_zf_Ex8_Insertion_for	AGACTTGCTGGACGATGCGATCCACGTCCTGAGGAAT
tcf12_zf_Ex8_Insertion_rev	GTCCAGCAAGTCGGTCCCTCCATCCGAGACAGAGAG
tcf12_zf_Insertion_for	ATGGACCCAAAGCAGCCTGCCTTAAGAGGAGGGAGGA
tcf12_zf_Ex12_Insertion_rev	G TTCAGGTTCTCTCTCTGACTTGCTGTTTCGAGGCTGAGA
tcf12_zf_Ex12_UTR- Region_for	TCCCGATGGCGTGTGTTAGACTAGTCTCGACGGTACCTTT
tcf12_zf_Ex12_UTR- Region_rev	TCCATTTGATCTGGCTGTTACAGATGGCCCATAGGGTTG
<b>TCF12/TWIST1 WT Klonierung in pIS14</b>	
tcf12_cDNA_zf_BamHI_for	GAAGGATCCATGTATTGCGCCT
tcf12_cDNA_zf_SpeI_rev	TAAACTAGTTCACAGATGGCCC
TWIST1_cDNA_BamHI_for	GAAGGATCCATGCCCGAAGAGC
TWIST1_cDNA_SpeI_rev	TAAACTAGTCTAGTGAGATGCA
twist1a_cDNA_zf_BamHI_for	GAAGGATCCATGTTTGAGGAAG
twist1a_cDNA_zf_SpeI_rev	TAAACTAGTTTAGTGGGATGTT
twist1b_cDNA_zf_BamHI_for	GAAGGATCCATGCCCGAAGAGC
twist1b_cDNA_zf_SpeI_rev	TAAACTAGTCTAGTGAGATGCA
pIS14_Seq_for	AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC
pIS14_Seq_rev	GCTGCTTTGGGGTTAAGGTT
Sequenz TCF12 Ebox Genfragment Klonierung in pGL427-Ebox-Luc	ACGAGCTAGCAACACCTGCATTTGAGGAAGAACACCTGCAG CTCTCCAGAAACACCTGCAGAGCAAGACGAACACCTGCAA GCTTGTTA
pNL427_cs_for	AAATAGGCTGTCCCCAGTGC
pNL427_cs_rev	CTTTGTGCAGCTGCTCGC
<b>Genotypisierung der Knockout-Linien</b>	
tcf12_exon6_gDNA_fwd	TAGAGTGCAGGAGGGCTTGT
tcf12_exon6_gDNA_rev	AGCTATGAGGGCCACTGTGT
tcf12_exon8_gDNA_fwd	TTGTCCAGGGTCCACATTTTG
tcf12_exon8_gDNA_rev	CTTCACTCCCTCGCGTATGT
tcf12_exon11_gDNA_fwd	TGGTCCATGTTCAAAATGC
tcf12_exon11_gDNA_rev	ATAGCCAGCAGTGCCAGATT
tcf12_exon12_gDNA_fwd	CCCAACACTGCAGCTCAATA
tcf12_exon12_gDNA_rev	ATGCACTTGCTGCATGTCTC

<b>Zielsequenzen für die sgRNAs</b>			
sgRNA	Zielsequenz	Oligonukleotid 1	Oligonukleotid 2
Exon 6	GGGAGACCCCACTGGA GTGG	TAGGGAGACCCCACTGG AGTGG	AAACCCACTCCAGTGGG GTCTC
Exon 8	GGAGGACCGACTTGAC AGGC	TAGGAGGACCGACTTGA CAGGC	AAACGCCTGTCAAGTCG GTCCT
Exon 11	GGAGAATGAGCAGTTT GGTC	TAGGAGAATGAGCAGT TTGGTC	AAACGACCAAACCTGCTC ATTCT
Exon 12	GGAGAATGAGCAGTTT GGTC	TAGGAGAATGAGCAGT TTGGTC	AAACGACCAAACCTGCTC ATTCT

## B) Detektion von *tcf12* Transkripten mittels *in-situ* Hybridisierungs-Proben

Die Transkripte sind nach ihrer Priorität gemäß der Ensembl Datenbank gelistet.

Name	Transkript ID (Ensembl Version GRCz11)	bp	Protein	Von ISH detektiert
tcf12-210	ENSDART00000174218.2	4447	557 AS	Ja
tcf12-201	ENSDART00000009938.11	4276	533 AS	Ja
tcf12-207	ENSDART00000161387.3	4982	726 AS	Ja
tcf12-212	ENSDART00000174335.2	4431	520 AS	Ja
tcf12-211	ENSDART00000174292.2	4429	551 AS	Ja
tcf12-213	ENSDART00000174355.2	4947	713 AS	Ja
tcf12-209	ENSDART00000174117.2	4875	689 AS	Ja
tcf12-202	ENSDART00000073766.6	1817	336 AS	Nein
tcf12-203	ENSDART00000131282.3	2291	702 AS	Nein
tcf12-214	ENSDART00000174369.2	749	250 AS	Nein
tcf12-205	ENSDART00000138263.2	1099	177 AS	Nein

tcf12-204	ENSDART00000136745.2	513	54 AS	Nein
tcf12-208	ENSDART00000174049.2	1184	Kein Protein	Nein
tcf12-206	ENSDART00000140338.3	839	Kein Protein	Nein

## C) Vektorkarten

