

PATHOGENESE VON KRANIOSYNOSTOSEN

PATHOGENESIS OF CRANIOSYNOSTOSES



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

Vorgelegt von

EVA-MARIA KÖNIG

geboren in Erlenbach am Main

Würzburg, 2018



Eingereicht am: _____

MITGLIEDER DES PROMOTIONSKOMITEES:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Betreuer: Prof. Dr. Eva Klopocki

2. Betreuer: Prof. Dr. Franz Jakob

3. Betreuer: Prof. Dr. Christian Stigloher

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

AFFIDAVIT

I hereby confirm that my thesis entitled "PATHOGENESIS OF CRANIOSYNOSTOSES" 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 „PATHOGENESE 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

*» And above all,
watch with glittering eyes the whole world around you
because the greatest secrets are always hidden in the most unlikely places.
Those who don't believe in magic will never find it. «*

-ROALD DAHL-

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1. EINLEITUNG	5
1.1 Embryonale Kopfentwicklung	5
1.2 Schädelanatomie	6
1.3 Ossifikation (Knochenbildung)	7
1.4 Osteoblasten Differenzierung	10
1.4.1 Transkriptionsfaktoren	11
1.4.2 Regulatorische Signalwege	13
1.5 Suturen – Anatomie, Funktion und Wachstumsregulation	18
1.6 Kraniosynostose	20
1.7 Zielsetzung	23
2. MATERIAL & METHODEN	25
2.1 Material	25
2.1.1 Patienten	25
2.1.2 <i>Danio rerio</i> Haltung	29
2.1.3 Bakterienstamm	30
2.1.3 Primer	30
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien	30
2.1.5 Enzyme, Plasmide und Kits	30
2.1.6 Programme und Datenbanken	31
2.2 Allgemeine Methoden	32
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.2 Sanger Sequenzierung	33
2.3 Spezielle Methoden	35
2.3.1 <i>In vitro</i> Spleißanalyse durch Minigen-Konstrukte	35
2.3.2 RNA Isolation aus Blutproben	37
2.3.3 Mikroarray basierte vergleichende Genomhybridisierung (Array-CGH)	38
2.3.4 Quantitative Echtzeit-PCR	41
2.3.5 <i>Next Generation Sequencing</i>	42

2.3.6	<i>in-situ</i> Hybridisierung	46
2.3.7	Mikroinjektion von mRNA in <i>Danio rerio</i> Embryonen	49
3.	ERGEBNISSE	51
3.1	Array-CGH Analysen	51
3.1.1	Verlust 15q21.3	51
3.1.2	Zugewinn 5p15.1-p12	54
3.1.3	Verlust 2q37.3-qter und Zugewinn 5q35.2-qter	56
3.1.4	Zugewinn 2q34-qter und Verlust 17q25.3	57
3.1.5	Zugewinn 5q34-qter und Verlust 8p23.3-pter	59
3.1.6	Verlust 7q21.13-q21.3	61
3.2	Kraniosynostose NGS Genpanel	64
3.2.1	Homozygote <i>Missense</i> -Variante in <i>POR</i> - c.902G>A	67
3.2.2	Hemizygoter <i>Missense</i> -Variante in <i>HUWE1</i> - c.329G>A	69
3.2.3	Homozygote Spleißvariante in <i>MEGF8</i> - c.828G>A	70
3.2.4	Heterozygote <i>Missense</i> -Variante in <i>FGFR2</i> - c.1150G>A	73
3.2.5	Heterozygote <i>Frameshift</i> -Variante in <i>ERF</i> - c.151delG	75
3.2.6	Heterozygote <i>Missense</i> -Variante in <i>PTCH1</i> - c.3436G>A	76
3.2.7	Heterozygote <i>Missense</i> -Variante in <i>MSX2</i> - c.442C>G	77
3.2.8	Heterozygote <i>Missense</i> -Variante in <i>MEGF8</i> - c.5210C>G	79
3.2.9	Heterozygote <i>Nonsense</i> -Variante in <i>TCF12</i> - c.1885C>T	82
3.2.10	Heterozygote <i>Frameshift</i> -Variante in <i>TCF12</i> - c.825delG	83
3.2.11	Heterozygote Spleißvariante in <i>TCF12</i> - c.1036-1G>C	85
3.3	Sequenzierung des <i>SMAD6</i> Gens und des <i>BMP2</i> Risikoallels	86
3.4	Funktionelle Analysen	88
3.4.1	Analyse von Spleißsequenzvarianten durch ein <i>in vitro</i> Minigensystem	88
3.4.2	Expressionsmuster und Überexpression von <i>fgf10a</i> in <i>Danio rerio</i>	94
3.4.3	Expressionsmuster von <i>huwe1</i> in <i>Danio rerio</i>	97
4.	DISKUSSION	99
4.1	Varianten im Kontext der Osteoblasten Differenzierung	100
4.1.1	FGF Signalweg	100
4.1.2	BMP Signalweg	103
4.1.3	WNT Signalweg	105
4.1.4	IHH Signalweg	106
4.1.5	Transkriptionsfaktoren	109
4.1.6	weitere Faktoren	120

4.2	Fazit & Ausblick	125
5.	LITERATURVERZEICHNIS	128
	DANKSAGUNG	XII
	CURRICULUM VITAE	XIII
	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	XIV
	ANHANG	XVI
A)	Primersequenzen	XVI
B)	Ethikvotum	XVIII
C)	Genliste Kraniosynostose Panel	XX
D)	Auflistung Bereiche mit lückenhafter Abdeckung	XXII
E)	DECIPHER Patienten mit überlappenden Aberrationen	XXV
F)	Auswertung <i>SMAD6</i> Sequenzierungsprojekt	XXVIII
G)	Vektorkarten	XXIX

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Embryonale Entwicklung des Gesichts.....	6
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Schädeldachs eines Neugeborenen und eines Erwachsenen	7
Abbildung 1.3: Intramembranöse Ossifikation.....	8
Abbildung 1.4: Endochondrale Ossifikation.....	10
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der wichtigsten Transkriptionsfaktoren und Signalwege der Osteoblasten Differenzierung.....	13
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung einer kranialen Sutur.....	18
Abbildung 1.7: Schädelform nach Fusion einzelner Schädelnähte.....	21
Abbildung 2.1: Neurocranium von <i>Danio rerio</i>	29
Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf einer Array-CGH.....	39
Abbildung 2.3: Übersicht über die Anreicherungsschritte des <i>Nextera Rapid Capture Kits</i> (Illumina).....	44
Abbildung 2.4: Prinzip der <i>Cluster</i> Generierung.....	45
Abbildung 3.1: Stammbaum und Segregationsanalyse der Familie CRA_1/_2.....	52
Abbildung 3.2: Array-CGH Profil und qPCR Ergebnis der Patienten CRA_1 und CRA_2.....	53
Abbildung 3.3: Stammbaum der Familie von Patient CRA_10 (II-2).....	54
Abbildung 3.4: Array-CGH Profil von Chromosom 5 des Patienten CRA_10.....	55
Abbildung 3.5: Stammbaum der Familie von Patientin CRA_32 (II-1).....	56
Abbildung 3.6: Array-CGH Profil der Chromosomen 2 und 5 der Patientin CRA_32.....	57
Abbildung 3.7: Stammbaum und Ergebnisse von Patientin CRA_35.....	59
Abbildung 3.8: Stammbaum, Array-CGH Analyse und FISH von Patientin CRA_58.....	60
Abbildung 3.9: Stammbaum der Familie von Patient CRA_59 (II-1).....	61
Abbildung 3.10: Array-CGH Profil und qPCR Ergebnis von Patient CRA_59 und Eltern.....	63
Abbildung 3.11: Ergebnis des CNV Tools von GensearchNGS für Exon 6 von <i>TCF12</i>	66
Abbildung 3.12: Stammbaum und NGS Ergebnis des Patienten CRA_6.....	68
Abbildung 3.13: NGS Ergebnis des Patienten CRA_14 und Sanger Sequenzierung.....	70
Abbildung 3.14: NGS Ergebnis der Patienten CRA_18 und CRA_19, Spleißvorhersage und Segregationsanalyse.....	72
Abbildung 3.15: NGS Ergebnis des Patienten CRA_29 und Segregationsanalyse.....	74
Abbildung 3.16: NGS Ergebnis der Patientin CRA_34 (II-1) und Segregationsanalyse.....	76
Abbildung 3.17: NGS Ergebnis und Stammbaum des Patienten CRA_43.....	77
Abbildung 3.18: NGS Ergebnis des Patienten CRA_48 (II-3) und Segregationsanalyse.....	79
Abbildung 3.19: NGS Ergebnis von Patient CRA_49, Segregationsanalyse und <i>MEGF8</i> Expressionsanalyse.....	81
Abbildung 3.20: NGS Ergebnis des Patienten CRA_56 und Segregationsanalyse.....	82
Abbildung 3.21: NGS Ergebnis von Patientin CRA_64, Spleißvorhersage und Segregationsanalyse.....	84
Abbildung 3.22: NGS Ergebnis von Patientin CRA_80, Spleißvorhersage und Segregationsanalyse.....	85
Abbildung 3.23: <i>In vitro</i> Spleißanalyse der Variante <i>MEGF8</i> c.828G>A.....	90
Abbildung 3.24: <i>In vitro</i> Analyse der potentiellen Spleißvariante <i>TCF12</i> c.825delG.....	91
Abbildung 3.25: <i>In vitro</i> Spleißanalyse der Variante <i>TCF12</i> c.1036-1G>C.....	93
Abbildung 3.26: <i>Fgf10a</i> und <i>fgfr2</i> Expressionsanalyse in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben des Zebrafischs.....	94
Abbildung 3.27: Expressionsmuster von <i>fgf10a</i> und <i>fgfr2</i> in <i>Danio rerio</i> Embryonen.....	95
Abbildung 3.28: <i>Fgf10a</i> RNA Injektion in Zebrafisch Embryonen.....	96
Abbildung 3.29: <i>Huwe1</i> Expressionsanalyse in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben von <i>Danio rerio</i>	97
Abbildung 3.30 Expressionsanalyse von <i>huwe1</i> in <i>Danio rerio</i> Embryonen.....	98

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Signalwege der Osteoblasten Differenzierung.....	100
Abbildung 4.2: Lokalisation der detektieren <i>SMAD6</i> Varianten.....	104
Abbildung 4.3: Aminosäure Alignment der <i>MSX2</i> Homöodomäne verschiedener Spezies.....	111
Abbildung 4.4: Vergleich partieller 5q Trisomien von Kraniosynostose Patienten.....	112
Abbildung 4.5: Lokalisation der detektieren <i>TCF12</i> Varianten.....	116
Abbildung 4.6: Positionsvergleich von <i>TCF12</i> Deletionen und Duplikationen assoziiert mit Kraniosynostose.....	117
Abbildung 4.7: Lokalisation der <i>MEGF8</i> Varianten auf Genom- und Protein Ebene.....	121

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Klassische Kraniosynostose Gene und ihre assoziierten Syndrome.....	22
Tabelle 2.1: Kraniosynostose-Kohorte.....	25
Tabelle 2.2: <i>SMAD6</i> -Kohorte.....	28
Tabelle 2.3: Verwendete Programme und Datenbanken.....	31
Tabelle 3.1: Übersicht der Patienten mit (potentiell) pathogenen chromosomalen Veränderungen.....	51
Tabelle 3.2: Verwendete NGS Kontrollproben.....	64
Tabelle 3.3: Ergebnis der CNV Analyse für <i>TCF12</i> mit GensearchNGS.....	65
Tabelle 3.4: Patienten mit bekannten Kraniosynostose Mutationen.....	66
Tabelle 3.5: Patienten mit potentiell pathogenen Varianten.....	67
Tabelle 3.6: <i>SMAD6</i> Varianten der <i>SMAD6</i> -Kohorte.....	86
Tabelle 4.1: Phänotypischer Vergleich von Kraniosynostose Patienten mit <i>MSX2</i> p.P148 Substitution.....	109
Tabelle 4.2: Klinische Auffälligkeiten von Patienten mit partieller 5q Trisomie.....	113
Tabelle 4.3: Phänotypischer Vergleich von Patienten mit <i>MEGF8</i> Varianten.....	120
Tabelle 4.4: Phänotypischer Vergleich von Patienten mit <i>HUWE1</i> p.R110Q bzw. p.R110W Mutation.....	123

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

#	*	Stopcodon
	∅	Durchschnitt
	μg	Mikrogramm
	μl	Mikroliter
	μM	mikromolar
	μm	Mikrometer
	∞	unendlich
A	A	Auge
	Abb.	Abbildung
	ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
	AD	Aktivierungsdomäne
	Array-CGH	Mikroarray basierte CGH
	AS	Aminosäure
B	BBDS	<i>Bent Bone Dysplasia</i> Syndrom
	BCNS	<i>Basal Cell Nevus</i> Syndrom
	bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
	bp	Basenpaare
	bzw.	beziehungsweise
C	cDNA	komplementäre DNA
	CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
	cm	Zentimeter
	CNV	<i>copy number variant</i>
	Cy3	Cyanin 3
	Cy5	Cyanin 5
D	D	<i>damaging</i>
	ddH ₂ O	demineralisiertes Wasser
	ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
	Del	Deletion
	DIG	Digoxigenin
	DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
	Dup	Duplikation
E	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	engl.	englisch
	Exo	Exonuklease I
F	F	Flossenansätze
	FCS	fötales Kälberserum
	female	weiblichen Kontroll-DNA
	FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
	FLU	Fluorescein
	fs	<i>frameshift</i>
	fwd	<i>forward</i>
G	G	Gehirn
	g	Gramm
	gDNA	genomische DNA
	GRCh37	<i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i>
H	h	Stunde
	H	Herz
	HEK	<i>human embryonic kidney</i>

hem.	hemizygot
het.	heterozygot
hg19	Humane Genomversion 19
hom.	homozygot
hpf	<i>hours post fertilization</i>
HSF3	Human Splicing Finder
I IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
Ig	Immunglobulin
ISH	in-situ Hybridisierung
K K	Kontrolle
kb	Kilobasen
Kb	Kiemenbögen
Kba	Kiemenbögenanlagen
kg	Kilogramm
kon	Konsensus
lat.	lateinisch
M M	molar
M	Marker
MAF	<i>minor allele frequency</i>
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
Mh	Mittelhirn
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MNG	Mittelhirn-Nachhirn-Grenze
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
N N/A	not available
NBT/BCIP	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/ 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
ng	Nanogramm
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NLZ	Neuralleistenzellen
O OP	Operation
oV	otisches Vesikel
P P.	Perzentile
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	<i>possibly damaging</i>
PFA	Paraformaldehyd
pM	pico molar
pM	pikomolar
Q qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
R Ref.	Referenz
Rep	Repressordomäne
rev	<i>reverse</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S S	Schwanzknospe
s	Sekunde
s.f.	steril filtriert
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
Sequ.	Sequenz

	SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
	SSC	<i>saline sodium citrate</i>
	SSCT	SSC mit Tween 20
	SSW	Schwangerschaftswoche
T	Temp.	Temperatur
	ter	Telomer
	TM	Transmembran
U	U	units
V	V	Vorderhirn
	V.a.	Verdacht auf
	Var	Variante
W	WT	Wildtyp
Z	z.B.	zum Beispiel

ZUSAMMENFASSUNG

Das humane Schädeldach besteht aus fünf Schädelplatten, die durch intramembranöse Ossifikation entstehen. Wenn diese in der Embryonalentwicklung aufeinandertreffen, bilden sich Schädelnähte aus, die eine Fusion der Schädelplatten verhindern und damit ein Schädelwachstum parallel zu Gehirnentwicklung ermöglichen. Für diesen Prozess ist eine Balance aus Zellproliferation und Differenzierung nötig, deren Aufrechterhaltung wiederum durch eine komplexe Regulation von verschiedenen Signalwegen gewährleistet wird. Störungen in diesem regulatorischen System können zu einer vorzeitigen Fusion der Schädelplatten, Kraniosynostose genannt, führen. Die Kraniosynostose ist eine der häufigsten kraniofazialen Fehlbildungen beim Menschen. Durch kompensatorisches Wachstum an den nicht fusionierten Suturen entstehen charakteristische Schädeldeformationen, die sekundär einen erhöhten intrakranialen Druck zur Folge haben können. Eine vorzeitige Fusion der Suturen kann sowohl isoliert als auch syndromal zusammen mit weiteren klinischen Auffälligkeiten vorliegen. Bisher sind über 150 verschiedene Kraniosynostose Syndrome beschrieben und insgesamt 25-30% aller Kraniosynostose Patienten sind von einer syndromalen Form betroffen. Da die klinischen Merkmale der Kraniosynostose Syndrome variabel sind und zum Teil überlappen, ist eine klare klinische Diagnose häufig erschwert. Sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Veränderungen können die Ursache für Kraniosynostosen sein. Vor allem bei syndromalen Kraniosynostosen wurden genetische Veränderungen, wie beispielsweise Mutationen in den Genen *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1* und *EFNB1*, identifiziert. Darüber hinaus wurden chromosomale Veränderungen wie partielle Monosomien von 7p, 9p oder 11p sowie partielle Trisomien von 5q, 13q oder 15q mit Kraniosynostose assoziiert. Trotzdem ist in über 50% der Fälle die genetische Ursache unbekannt und die Pathogenese von Kraniosynostosen noch nicht vollständig geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es neue genetische Ursachen bei Kraniosynostose Patienten zu identifizieren und so zur Aufklärung der Pathogenese beizutragen. Es wurde die genomische DNA von 83 Patienten molekulargenetisch durch Mikroarray basierte vergleichende Genomhybridisierung (Array-CGH) oder durch ein speziell entworfenes *Next Generation Sequencing* (NGS) Genpanel untersucht. Bei 30% der Patienten konnte eine potentiell pathogene Veränderung identifiziert werden. Davon waren 23% chromosomale Aberrationen wie unbalancierte Translokationen, isolierte interstitielle Verluste und ein Zugewinn an genomischen Material. Bei zwei Patienten wurden unbalancierte Translokationen mit partieller 5q Trisomie nachgewiesen. Das Gen *MSX2* liegt innerhalb des duplizierten Bereichs, sodass möglicherweise eine *MSX2* Überexpression vorliegt. Für ein normales Schädelwachstum ist jedoch die richtige Menge an *MSX2* kritisch. Des Weiteren wurde eine partielle Deletion von

TCF12 detektiert, die in einer Haploinsuffizienz von *TCF12* resultiert. *TCF12* Mutationen sind mit Koronarnahtsynosten assoziiert. In einem anderen Fall lag das Gen *FGF10* innerhalb der duplizierten 5p15.1-p12 Region. Das Gen kodiert für einen Liganden des FGF Signalwegs und wurde bisher noch nicht mit Kraniosynostose assoziiert. Aufgrund dessen wurden Analysen im Tiermodell *Danio rerio* durchgeführt. Eine simulierte Überexpression durch Injektion der *fgf10a* mRNA in das 1-Zell Stadium führte zu schweren Gehirn-, Herz- und Augendefekten.

Mittels NGS wurden 77% der potentiell pathogenen genetischen Veränderungen identifiziert. Hierfür wurde in dieser Arbeit ein Genpanel erstellt, das 68 Gene umfasst. Es wurden sowohl bekannte Kraniosynostose- als auch Kandidaten-Gene sowie Gene, die mit der Ossifikation assoziiert sind, in die Analyse eingeschlossen. Das Genpanel wurde durch die Sequenzierung von fünf Kontrollproben mit bekannten Mutationen erfolgreich validiert. Anschließend wurde die genomische DNA von 66 Patienten analysiert. Es konnten 20 (potentiell) pathogene Varianten identifiziert werden. Neben bereits bekannten Mutationen in den Genen *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* und *TWIST1*, konnten zusätzlich 8 neue, potentiell pathogene Varianten in den Genen *ERF*, *MEGF8*, *MSX2*, *PTCH1* und *TCF12* identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei das Mutationsspektrum dieser Gene zu erweitern. Bei zwei der Varianten handelte es sich um potentielle Spleißvarianten. Für diese konnte in einem *in vitro* Spleißsystem gezeigt werden, dass sie eine Änderung des Spleißmusters bewirken. Der Nachweis von zwei seltenen Varianten in den Genen *FGFR2* und *HUWE1* hat außerdem dazu beigetragen die Pathogenität dieser spezifischen Varianten zu bekräftigen. Eine Variante in *POR*, die aufgrund bioinformatischer Analysen als potentiell pathogen bewertet wurde, wurde nach der Segregationsanalyse als wahrscheinlich benigne eingestuft. Zusammenfassend konnten bei etwa einem Drittel der Patienten, die mit dem NGS Genpanel analysiert wurden, eine genetische Ursache identifiziert werden. Dieses Genpanel stellt somit ein effizientes diagnostisches Tool dar, das zukünftig in der genetischen Routine-Diagnostik von Kraniosynostose-Patienten eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl eine Untersuchung auf CNVs als auch auf Sequenzänderungen bei Kraniosynostose Patienten sinnvoll ist.

SUMMARY

Cranial bones are formed by intramembranous ossification. During development, the cranial bones are separated by fibrous sutures, which function as bone growth sites and therefore, the cranial sutures need to remain patent to allow the expansion of the skull during brain development. Thus, there must be a balance of cell proliferation and differentiation within the suture. This complex process requires a tight regulation of gene expression and interacting signal pathways. Imbalances or dysfunction of the involved factors can result in abnormal skull growth. One of the most common congenital craniofacial disorders by affecting approximately one in 2500 newborns is craniosynostosis. It is defined as the premature ossification of one or more calvarial sutures. Compensatory growth of the skull leads to a characteristic dysmorphic cranial vault and facial asymmetry. Premature ossification of the cranial sutures can occur either as isolated malformation or as part of a syndrome. Isolated craniosynostoses are more frequent, nevertheless, 25-30% of all cases are syndromic craniosynostoses with more than 150 syndromes reported. There is a high intra- and interfamilial variability and clinical overlap of the different syndromes. Environmental influences as well as genetic defects like mutations and chromosomal aberrations are known to cause craniosynostosis. So far genetic causes have been identified mainly for syndromic craniosynostoses, i.e. mutations in *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, and *EFNB1*. Furthermore, chromosomal rearrangements like i.e. partial monosomy of 7p, 9p, and 11p as well as partial trisomy of 5q, 13q, and 15q, have been reported in 11-15% of the syndromic craniosynostosis cases. However, in more than 50% of the cases the underlying genetic cause remains unknown. Furthermore, the pathogenesis of craniosynostoses is still not fully understood.

In this project 83 craniosynostosis patients were analysed either by microarray-based comparative genomic hybridisation (array-CGH) or gene panel based next generation sequencing (NGS) to further investigate the pathogenesis of craniosynostosis. In a total of 30% of the patients a potential genetic cause was identified. Among those 23% had chromosomal rearrangements which are likely to cause the observed phenotypes, i.e. unbalanced translocations affecting several genes as well as interstitial deletions and an isolated duplication have been detected. Two patients had unbalanced translocations with partial 5q trisomies encompassing *MSX2*. *MSX2* gene dosage is critical for normal growth of the cranial bone plates as loss-of-function mutations lead to delayed and incomplete ossification of the parietal bones. Furthermore, we identified a partial *TCF12* deletion which is likely to result in *TCF12* haploinsufficiency. *TCF12* mutations frequently lead to premature fusion of the coronal sutures, although its pathogenesis is still not fully understood. In another case isolated duplication of 5p15.1-p12 includes *FGF10* which is a known ligand of the FGF signalling pathway. So far, no

association of FGF10 with craniosynostosis has been made. To investigate its potential role during development and in the pathogenesis of craniosynostosis functional experiments were performed in *Danio rerio*, an animal model for craniosynostosis. Simulation of *fgf10a* overexpression by injection of *fgf10a* RNA at 1-cell stage resulted in severe anomalies of the brain, heart and eyes.

In addition, 77% of the identified genetic causes were detected by NGS. For this study a gene panel was designed comprising 68 genes of known and candidate craniosynostosis genes as well as genes associated with bone development. Performance of the NGS gene panel was validated by sequencing five control patients with known mutations. Subsequently, genomic DNA of 66 patients was analysed by the designed craniosynostosis panel. 20 (potential) pathogenic variants were detected. Although, in most of the cases hot spot sequencing of one or more common craniosynostosis genes was performed prior to including the patients in the study, we determined 9 known mutations in the genes *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, and *TWIST1*. In addition, 8 novel, potentially disease-causing variants in the genes *ERF*, *MEGF8*, *MSX2*, *PTCH1*, and *TCF12* were identified. This work contributed to extend the mutational spectrum within those genes. Two of those variants were predicted to affect splice sites. Analysis by an *in vitro* splice assay revealed that those variants result in aberrant splicing. Furthermore, the detection of two rare variants of *FGFR2* and *HUWE1* adds support to their pathogenicity. An additional variant within *POR* had to be classified as likely benign after segregation analysis. Overall, in nearly one third of the analysed cases an underlying genetic cause could be identified by the designed gene panel. Thus, the NGS panel presents as an efficient tool for genetic diagnostics of craniosynostoses. The data of this work clearly show both copy number variant and single nucleotide variant analysis should be considered in genetic diagnostics of craniosynostosis patients.

1. EINLEITUNG

» **Life's true face is the skull.** «

Niko Kazantzakis

1.1 Embryonale Kopfentwicklung

Die Embryonalentwicklung des Kopfes lässt sich in fünf Phasen unterteilen: 1) Bildung von Neuralleistenzellen (NLZ), 2) Migration der NLZ, 3) Ausbildung der Gesichtswülste, 4) Fusion der Gesichtswülste und 5) Skelettbildung. Der Kopf entwickelt sich hauptsächlich aus paraxialem Mesoderm und pluripotenten kranialen NLZ. NLZ sind pluripotente Zellen, die zu Zellen des peripheren Nervensystems, Melanozyten, Odontoblasten, Chondroblasten, Osteoblasten und Myofibroblasten differenzieren können (DUPIN AND COELHO-AGUIAR 2013). Der Gesichtsschädel und ein Großteil des fazialen Bindegewebes entstammen von kranialen NLZ. Die NLZ entstehen vor und während der Neurulation an der Grenze von Neuralplatte und nicht-neuralem Ektoderm. Für die Bildung der Zellen spielen unter anderem der Transkriptionsfaktor SNAIL sowie räumliche Gradienten von BMP und WNT Signalen eine wichtige Rolle (SPERBER *et al.* 2010). Die NLZ durchlaufen anschließend eine epithelial-mesenchymale Transition (NODEN AND TRAINOR 2005). Durch den Verlust von Zell-Zell Kontakten, der Zellpolarität sowie durch Umorganisation des Zytoskeletts ändert sich ihr epithelialer Phänotyp zu dem einer Mesenchymzelle. An diesem Prozess sind vor allem Expressionsänderungen von Integrinen, Cadherinen und β -Catenin beteiligt (DE MELKER *et al.* 2004; TANEYHILL 2008). Nach der Transformation wandern die kranialen NLZ auf vorgegebenen Wegen von den Rhombomeren in den frontonasalen Bereich und in die 1.-4. Kiemenbögen des Embryos ein. Die Migration erfordert eine komplexe Regulation, die durch Kommunikation mit umliegenden Geweben erfolgt. An der gerichteten Wanderung der NLZ sind unter anderem Ephrine und Semaphorine beteiligt (WANG AND ANDERSON 1997; GOLDING *et al.* 2000). Zusätzlich zeigten *in vitro* Migrationsversuche mit murinen NLZ, dass FGF2 und FGF8 einen chemotaktischen Einfluss auf die Wanderungsaktivität der Zellen haben (KUBOTA AND ITO 2000). Nach Ankunft der kranialen NLZ im frontonasalen Bereich und im 1. Kiemenbogen beginnen die Zellen zu proliferieren und differenzieren, wodurch sich in der 4. Entwicklungswoche die Gesichtswülste ausbilden. Der Kopf entwickelt sich aus fünf um die primäre Mundhöhle gruppierten Gesichtswülste: der Stirnnasenwulst und den paarigen Unter- und Oberkieferwülsten (Abb. 1.1 A). Durch weitere Proliferation der Zellen wachsen die Fortsätze medial aufeinander zu. Reguliert wird dieser Prozess unter anderem von BMP, FGF und SHH Signalen. Im unteren Bereich der Stirnnasenwulst bilden sich die Riechplakoden aus, die sich später zur Riechgrube und letztendlich zu Geruchsepithelien entwickeln. An deren Seiten formt mesenchymales Gewebe die

lateralen und medialen Nasenwülste (Abb. 1.1 B). Durch Fusion der Nasenwülste und Oberkieferwülste entstehen Wangen, Nase, Philtrum, Oberkiefer und Gaumen. Der Unterkiefer entsteht durch die Verschmelzung der Unterkieferwülste. Diese fusionieren gleichzeitig lateral mit den Oberkieferwülsten, wodurch die Mundöffnung verkleinert wird (Abb. 1.1 C) (SPERBER *et al.* 2010). Störungen in diesem Fusionsprozess können zu Lippen- und Kieferspalten unterschiedlichster Art führen. Die Fusion ist in der 10. Entwicklungswoche abgeschlossen. Die letztendliche Morphologie des Schädels entsteht vor allem durch das Wachstum der Knochen. Bereits in der 7.-8. Entwicklungswoche bilden sich Ossifikationszentren aus. Die Prozesse der Knochenbildung werden in den Kapiteln 1.3 und 1.4 ausführlicher erläutert.

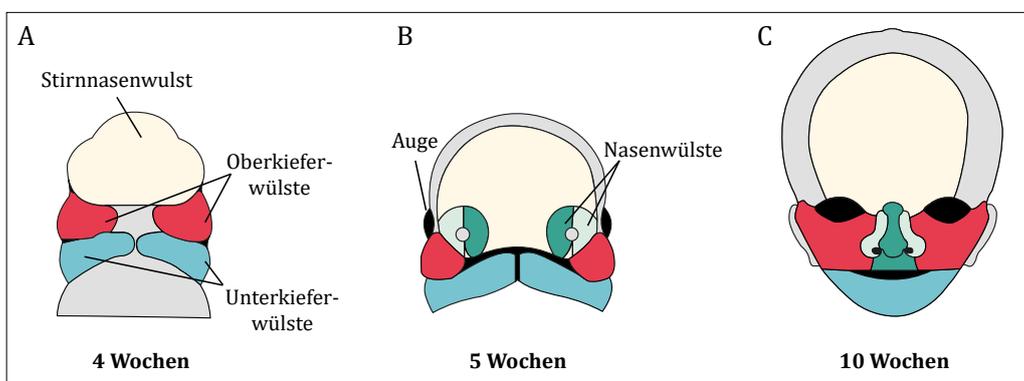


Abbildung 1.1: Embryonale Entwicklung des Gesichts. **A** 4. Entwicklungswoche. Proliferierende NLZ bilden die fünf Gesichtswülste um die primitive Mundhöhle aus. **B** 5. Entwicklungswoche. Durch mediales Wachstum nähern sich die Gesichtswülste an. In der Stirnnasenwulst entsteht die Riechplakode und die lateralen und medialen Nasenwülste. **C** 10. Entwicklungswoche. Die Fusion der Gesichtswülste zu Nase, Oberkiefer und Unterkiefer ist abgeschlossen.

1.2 Schädelanatomie

Der menschliche Schädel wird unterteilt in Gesichtsschädel (lat. *Viscerocranium*) und Hirnschädel (lat. *Neurocranium*). Unter Viscerocranium werden die Strukturen des Nasen- und Kieferskeletts zusammengefasst. Das Neurocranium setzt sich aus der Schädelbasis und dem Schädeldach zusammen. Das Schädeldach wiederum besteht aus fünf Knochenplatten: dem paarigen Stirnbein (lat. *Os frontale*), dem paarigen Scheitelbein (lat. *Os parietale*) und dem unpaarigen Hinterhauptsbein (lat. *Os occipitale*) (Abb. 1.2). Studien mit transgenen Mäusen, die das NLZ Markergen *Wnt1* zusammen mit der β -Galaktosidase *R26R* exprimieren, zeigten, dass das paarige Stirnbein sich von NLZ ableitet, die paarigen Scheitelbeine jedoch von paraxialem Mesoderm. Das Hinterhauptsbein hat sich aus beiden Vorläufern entwickelt (JIANG *et al.* 2002).

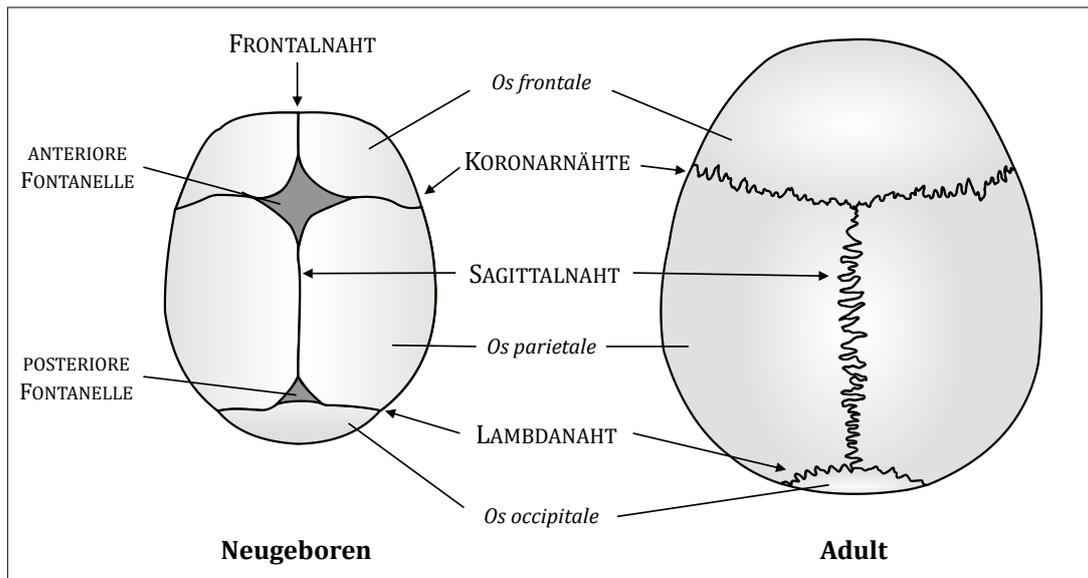


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Schädeldachs eines Neugeborenen und eines Erwachsenen. Die Schädelplatten, Schädelnähte und Fontanellen sind gekennzeichnet.

Bereiche, an denen zwei Schädelplatten aufeinandertreffen, werden Schädelnähte (Suturen) genannt, Stellen, an denen mehrere Platten aufeinandertreffen, hingegen Fontanellen. Es gibt vier unterschiedliche Suturen: die Frontalnaht (metopisch, lat. *Sutura metopica*), die Sagittalnaht (lat. *Sutura sagittalis/interparietalis*), zwei Koronarnähte (lat. *Sutura coronalis*) und die Lambdanaht (lat. *Sutura lambdoidea*) (Abb. 1.2). Bei einem Neugeborenen sind die Schädelplatten noch nicht fusioniert, sondern durch mesenchymales Gewebe getrennt (Abb. 1.2 Neugeboren). An diesen Bereichen findet das Schädelwachstum statt. Die Anatomie der Suturen und die Wachstumsregulation werden in Kapitel 1.5 beschrieben. Die posteriore Fontanelle schließt sich zwischen dem 2. und 3. Lebensmonat, die anteriore Fontanelle innerhalb des 2. Lebensjahres. Die Fusion der Frontalnaht ist ebenfalls im 2. Lebensjahr abgeschlossen. Die anderen Suturen verknöchern hingegen erst zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr (Abb. 1.2 Adult) (AVIV *et al.* 2002). Im Alter von 10 Jahren ist jedoch bereits 95% des neurokranialen und 65% des fazialen Wachstums des Kopfes abgeschlossen (SPERBER *et al.* 2010).

1.3 Ossifikation (Knochenbildung)

Es gibt zwei Arten der Knochenbildung: intramembranöse und endochondrale Ossifikation. Das Schädeldach, Teile des Viscerocraniums, wie z.B. Teile des Unterkiefers, und die Schlüsselbeine entstehen durch intramembranöse Ossifikation (Abb. 1.3). Die Schädelbasis hingegen und das restliche Skelett werden durch endochondrale Ossifikation gebildet (Abb. 1.4). Der Unterschied der beiden Osteogenese Arten liegt darin, dass bei der endochondralen Knochenbildung zunächst ein Knorpelgerüst gebildet wird, das anschließend durch Knochen ersetzt wird (Abb. 1.4). Bei der intramembranösen Ossifikation wird Knochen direkt aus mesenchymalem Bindegewebe gebildet, weswegen auch häufig die Bezeichnung desmale Ossifikation verwendet

wird (Abb. 1.3). Durch diese Ossifikationsart entsteht Knochen, der als platter Knochen (lat. *Ossa planum*) bezeichnet wird. Die initialen Schritte zur Ausbildung von Ossifikationszentren sind jedoch bei beiden Ossifikationsarten gleich. Während der Embryonalentwicklung des kraniofazialen Skeletts wandern multipotente kraniale NLZ in die Kiemenbögen zu den Stellen der späteren Knochen (siehe Kapitel 1.1). Diese Zellen besitzen das Potential zu Osteoblasten, Chondrozyten, Myoblasten und Adipozyten zu differenzieren (DUPIN AND COELHO-AGUIAR 2013). Die genauen molekularen Vorgänge, die dazu führen, dass diese multipotenten Mesenchymzellen anschließend aggregieren, sind noch weitestgehend unbekannt. Epitheliale und mesenchymale Interaktionen spielen bei der Induktion der Kondensation jedoch eine Rolle (RICE 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass sich die Kondensationen durch eine höhere Zelldichte und die Expression von extrazellulärer Matrix- und Zelloberflächenmolekülen, wie Tenascin, Syndecane, N-CAM und N-Cadherin, vom umgebenden Bindegewebe unterscheiden. Kontrolliert wird die Expression unter anderem von TGF- β , Fibronectin, BMP2 und MSX1 (HALL AND MIYAKE 1995). Mausstudien zeigten, dass eine bestimmte Größe der Kondensation notwendig ist, damit eine Differenzierung der Zellen stattfindet (RICHMAN AND MITCHELL 1996). An diesem Punkt beginnen sich die beiden Ossifikationsarten zu unterscheiden.

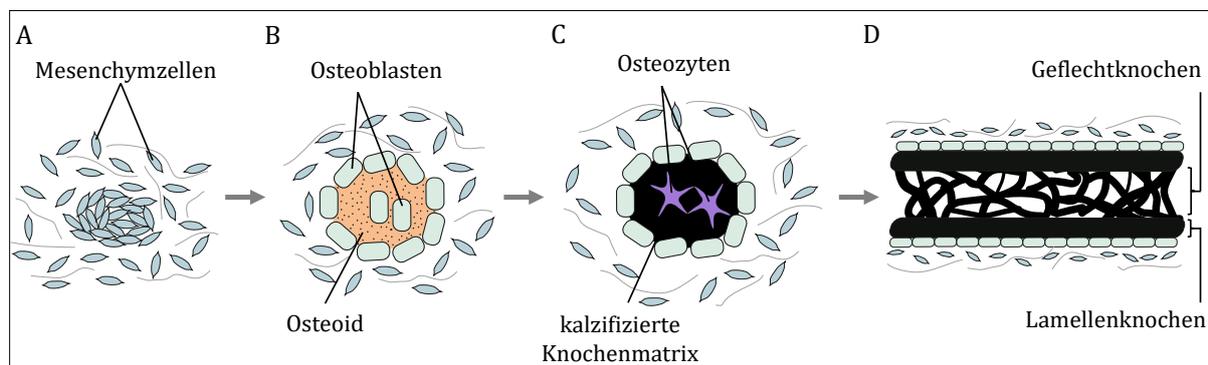


Abbildung 1.3: Intramembranöse Ossifikation. **A** Kondensation von mesenchymalen oder Neuralleisten Zellen. **B** Differenzierung zu Osteoblasten und Osteoid Sekretion. **C** Mineralisierung von Osteoid und Osteozyten Differenzierung. **D** Schematischer Aufbau der platten Knochen.

An Stellen der intramembranösen Knochenbildung differenzieren die Vorläuferzellen zu Osteoblasten (Abb. 1.3 B). Die Osteoblasten Differenzierung und die beteiligten Signalwege werden ausführlicher in Kapitel 1.4 erläutert. Essentiell für die Differenzierung sind die Transkriptionsfaktoren RUNX2, Osterix (OSX/SP7) und ATF4 sowie das Signalmolekül β -Catenin (RUTKOVSKIY *et al.* 2016). Osteoblasten bilden und sezernieren unmineralisierte Osteoid Matrix bestehend aus Typ I Kollagen, Bone Sialoprotein (BSP), Osteopontin und Osteocalcin (Abb. 1.3 B). Anschließend kommt es zur Anreicherung von Hydroxylapatit und der Expression von Alkalischer Phosphatase, wodurch die extrazelluläre Matrix kalzifiziert wird und harte Knochenmatrix entsteht (RICHTSMEIER AND FLAHERTY 2013). Die Osteoblasten werden nach und nach in Osteoid bzw. kalzifizierter Knochenmatrix eingeschlossen und ein Teil differenziert über

mehrere Zwischenstufen zu Osteozyten (Abb. 1.3 C). Der andere Teil unterläuft Apoptose. Osteozyten machen 95% der Zellen eines Knochens aus. Die Morphologie der reifen Osteozyten unterscheidet sich deutlich von den Osteoblasten. Das Volumen des Zellkörpers sowie die Anzahl der Zellorganellen ist in Osteozyten deutlich reduziert und es werden lange Zellfortsätze ausgebildet, über die sie miteinander in Verbindung stehen (FRANZ-ODENDAAL *et al.* 2006). Statt Osteoblasten-spezifischer Gene erfolgt die Expression von Osteozyten Markern wie beispielsweise Sclerostin, *FGF23*, *DMP1* und *RANKL* (BONEWALD 2011). Osteozyten spielen eine Rolle bei der Mechanosensorik, Regulation der Osteoblasten und Osteoklasten Differenzierung sowie der Regulation der Phosphat Homöostase (CAPULLI *et al.* 2014). Die Knochenmatrix bildet ein zufälliges Netzwerk um die embryonalen Blutgefäße, sodass sich aus den feinen Knochenbälkchen ungeordneter schwammartiger Geflechtknochen bildet. Die Außenseite der Geflechtknochen ist umgeben von mesenchymalen Zellen, die differenzieren und das Periost, bestehend aus einer äußeren Kollagenschicht und einer inneren zellreichen Schicht mit Osteoblasten, bilden. Letztendlich erfolgt in den ersten Lebensjahren eine Umbildung des schwammartigen Knochens. Dieser wird an den Rändern durch kompakten Lamellenknochen ersetzt, sodass die sandwichartige Struktur der platten Knochen entsteht (Abb. 1.3 D). Im Inneren bleibt der schwammartige Knochen erhalten und das vaskuläre Gewebe wird zu Knochenmark. Die paarigen Stirnbeinplatten entstehen aus je einem Ossifikationszentrum. Die Scheitelbeinplatten und das Hinterhauptsbein werden aus je zwei auseinanderliegenden Zentren gebildet, die im 4. Entwicklungsmonat zu den Schädelplatten verschmelzen (SPERBER *et al.* 2010). Anschließend fusionieren die aufeinandertreffenden Schädelplatten nicht, sondern es erfolgt die Ausbildung von Suturen (siehe Kapitel 1.5).

Im Gegensatz zu den Schädelplatten wird die Schädelbasis durch endochondrale Ossifikation gebildet. Beispielhaft wird diese an den Röhrenknochen (lat. *Ossa longa*) des Skeletts erläutert. Nach der Kondensation der mesenchymalen Zellen (Abb. 1.4 A) erfolgt die Differenzierung zu Typ II Kollagen sezernierenden Chondroblasten. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der Transkriptionsfaktor SOX9 sowie die Faktoren SOX5 und SOX6. Es folgt die Differenzierung zu Chondrozyten, die Knorpelmatrix bestehend aus Typ II, IX und XI Kollagen und Proteoglykane sezernieren und das Knorpelgerüst bilden (Abb. 1.4 B) (GOLDRING *et al.* 2006). Um die Knorpelanlage herum bildet sich das Perichondrium, das aus einer Kollagenfaserschicht und einer zellreichen Schicht besteht. Mesenchymale Zellen differenzieren ringsum zu Osteoblasten, sodass um das Knorpelgerüst eine Manschette aus Knochen entsteht (Abb. 1.4 D). Hier findet appositionelles Knochenwachstum statt. In der zentralen Region der Knorpelanlage (Diaphyse) befinden sich Chondrozyten, die zunächst rasch proliferieren, dann in einen Zellzyklusarrest übergehen und ihr Zellvolumen vergrößern. Anschließend erfolgt die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten (Abb. 1.4 C). Die Expression von Typ X Kollagen und den Proteinase MMP9 und 13 bewirkt eine Remodellierung der Knorpelmatrix. Dies ermöglicht das

Einwandern von Blutgefäßen in die Diaphyse (Abb. 1.4 D). Dadurch gelangen Osteoblasten Vorläufer in den Knorpel und das primäre Ossifikationszentrum wird gebildet.

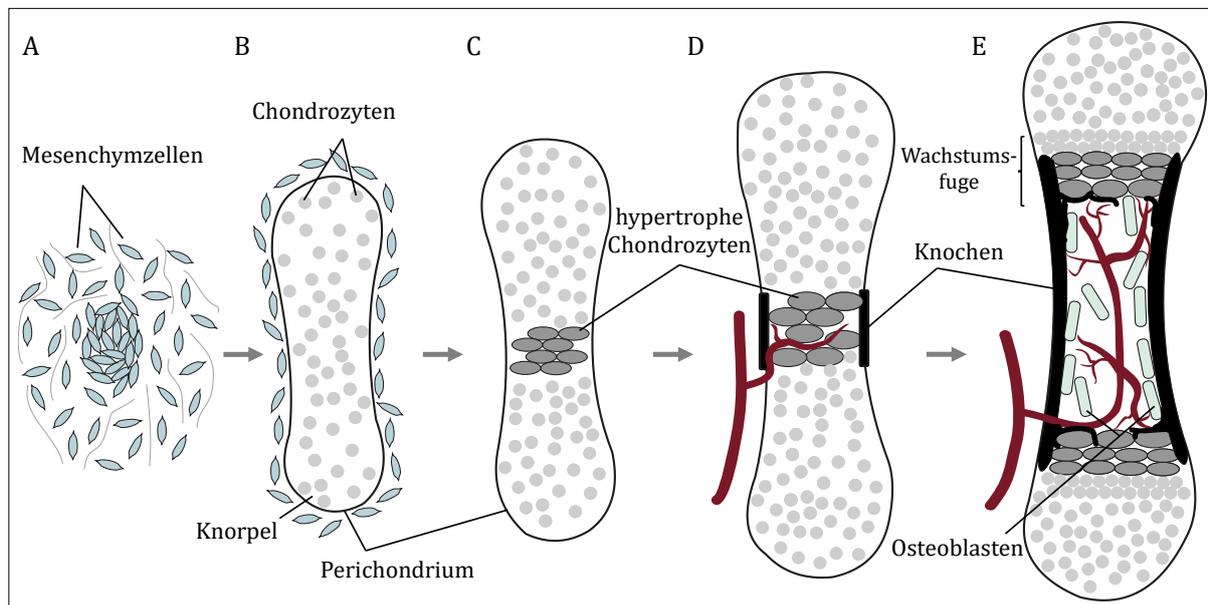


Abbildung 1.4: Endochondrale Ossifikation. **A** Kondensation von multipotenten Mesenchymzellen. **B** Ausbildung eines Knorpelgerüsts durch Chondrozyten. **C** Differenzierung von hypertrophen Chondrozyten in der Diaphyse. **D** Ausbildung einer Knochenmanschette und Einwandern von Blutgefäßen in die Diaphyse. **E** Differenzierung von Osteoblasten und Ersatz des Knorpels durch Knochen.

Die Differenzierung zu Osteoblasten erfolgt und das Knorpelgerüst wird nach und nach durch schwammartigen Knochen ersetzt. Die noch knorpeligen Bereiche proximal und distal der Diaphyse werden Epiphyse genannt (Abb. 1.4 E). Hier wird die Wachstumsfuge ausgebildet, die das Längenwachstum (interstitielles Wachstum) der Röhrenknochen ermöglicht (BILEZIKIAN *et al.* 2002; LONG AND ORNITZ 2013). Die Wachstumsfugen bestehen aus mehreren Zonen mit Knorpelzellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien. An der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Wachstumsfuge sind viele regulatorischen Signale der FGF-, BMP- und WNT- Signalwegen beteiligt. Wichtige Regulatoren für die Zonenbildung sind jedoch PTHrP und IHH (BILEZIKIAN *et al.* 2002). Da der Fokus dieser Arbeit auf der Entwicklung und dem Wachstum der Schädelplatten liegt, wird die Regulation des interstitiellen Wachstums der Röhrenknochen nicht näher erläutert.

1.4 Osteoblasten Differenzierung

Die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten ist sowohl bei der intramembranösen als auch bei der endochondralen Knochenbildung erforderlich. Die Vorläuferzellen haben das Potential sich zu Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten, Fibroblasten und Myoblasten zu entwickeln. Die Osteoblasten Differenzierung erfolgt über mehrere Zwischenstufen von Osteo-Chondro-Vorläufern zu Präosteoblasten und schließlich zu

Osteoblasten. Ein weites Spektrum an regulatorischen Signalen ist hierfür notwendig, von denen die meisten an vielen Prozessen der Embryonalentwicklung beteiligt sind (Abb. 1.5). Im Folgenden werden die wichtigsten Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Signalwege für die Osteoblasten Differenzierung erläutert.

1.4.1 Transkriptionsfaktoren

Für die Osteoblasten Differenzierung sind spezifische Transkriptionsfaktoren notwendig, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Differenzierung exprimiert und durch viele Signale reguliert werden. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren sind RUNX2, OSX und ATF4. Sie vermitteln die Expression von Osteoblast-spezifischen Genen wie *COL1A1*, *IBSP*, *SPP1* (Osteopontin) und *BGLAP* (Osteocalcin) (Abb. 1.5).

RUNX2

Essentiell für die Osteogenese ist der Transkriptionsfaktor RUNX2, der eine Runt DNA Bindedomäne besitzt und an das DNA Motiv TGPYGGPyPy bindet. Die Heterodimerbildung mit dem Koaktivator CBF β ist *in vitro* für die DNA Bindung nötig (KOMORI 2006). Des Weiteren zeigte die verzögerte Ossifikation in *Cbfb*^{-/-} Mäusen, dass der Koaktivator auch *in vivo* für eine normale Skelettentwicklung wichtig ist (YOSHIDA *et al.* 2002). RUNX2 Bindungsstellen wurden unter anderem in den Promotoren der Osteoblasten Markergene *COL1A1*, *IBSP*, *SPP1* und *BGLAP* identifiziert (KOMORI 2005). Der homozygote Knockout von *Runx2* in Mäusen hat zur Folge, dass weder endochondrale noch intramembranöse Ossifikation stattfindet. Es liegt ein reines Knorpelskelett vor, das auch Defekte in der Chondrozyten Differenzierung aufweist (KOMORI *et al.* 1997; OTTO *et al.* 1997). Bestätigt wurde dies auch in Zellkultur, *Runx2* defiziente murine Zellen aus Calvarien können nicht zu Osteoblasten differenzieren. Allerdings ist eine Differenzierung zu Adipozyten und Chondrozyten weiterhin möglich (KOBAYASHI *et al.* 2000). Diese Studien zeigen, dass RUNX2 eine essentielle Rolle in der frühen Osteoblasten Differenzierung spielt und die Etablierung des Osteo-Chondro-Vorläufers aus den multipotenten Mesenchymzellen vermittelt. RUNX2 wird aufgrund dessen auch als Masterregulator der Osteoblasten Differenzierung bezeichnet. Heterozygote *Runx2*^{+/-} Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie Menschen mit heterozygoten *RUNX2* Mutationen: verzögerte Verknöcherung der calvarialen Suturen und Fontanellen, dentale Anomalien, hypoplastische oder fehlende Schlüsselbeine und Kleinwuchs (KOMORI *et al.* 1997; LEE *et al.* 1997; MUNDLOS *et al.* 1997; OTTO *et al.* 1997). Die Skeletterkrankung wird als Kleidokraniale Dysplasie (OMIM 119600) bezeichnet. Viele Faktoren nehmen Einfluss auf die Expression, Funktion oder Aktivität von RUNX2, wie beispielsweise MSX2, DLX5 und STAT1. Einer dieser Faktoren ist auch TWIST1. *Twist1*^{+/-} Mäuse zeigen im Schädeldach den gegenteiligen Effekt von *Runx2*^{+/-} Mäusen, die Schädelplatten fusionieren (EL GHOUZZI *et al.* 1997; HOWARD *et al.* 1997). Eine heterozygote Inaktivierung beider

Gene führt jedoch zu einer normalen Schädelentwicklung (BIALEK *et al.* 2004). Dies legt die Vermutung nahe, dass TWIST1 die Osteoblasten Differenzierung durch RUNX2 inhibiert. Zellkulturanalysen zeigen, dass TWIST1 direkt mit RUNX2 interagiert und dadurch die transaktivierende Funktion von RUNX2 inhibiert (BIALEK *et al.* 2004). Heterozygote Mutationen von *TWIST1* sind im Menschen assoziiert mit dem Saethre-Chotzen Syndrom.

Osterix

RUNX2 dirigiert multipotente Zellen in die Osteoblasten und Chondrozyten Richtung, die Differenzierung zu Osteoblasten erfolgt jedoch erst zusammen mit dem Transkriptionsfaktor OSX und dem Signalmolekül β -Catenin. OSX ist ein Zinkfinger Transkriptionsfaktor, der die Expression von *COL1A1*, *IBSP*, *SPP1*, *BGLAP* und *ALPL* (Alkalische Phosphatase) vermittelt (STEIN *et al.* 1996). *Osx* ist in Mäusen essentiell für die Knochenbildung, da *Osx* defiziente Mäuse nur ein Knorpelskelett ausbilden. Es konnte keine Expression von Osteoblasten Markern nachgewiesen werden, wohingegen die Expression von *Runx2* normal war. Im Gegensatz dazu findet in *Runx2*^{-/-} Mäusen keine *Osx* Expression statt (NAKASHIMA *et al.* 2002). Folglich scheint die OSX Aktivität nach RUNX2 zu erfolgen. Weitere Studien zeigten, dass die OSX Expression durch BMP2 induzierbar und durch p53 und p38 MAPK reprimierbar ist, sowie, dass die OSX Transaktivität durch NFATC1 verstärkt werden kann (NAKASHIMA *et al.* 2002; CELIL AND CAMPBELL 2005; KOGA *et al.* 2005; WANG *et al.* 2007b).

ATF4

Zu den Transkriptionsfaktoren mit basischer Leucin-Zipper Domäne zählt ATF4. Dieser Transkriptionsfaktor ist vor allem für die terminale Osteoblasten Differenzierung wichtig. *Atf4* defiziente Mäuse zeigen embryonal eine verzögerte Ossifikation, vor allem in den frontalen und parietalen Schädelplatten, aber auch in den Schlüsselbeinen und Röhrenknochen. Die Expression der Osteoblasten Marker Bsp und Osteocalcin ist in diesen Mäusen reduziert, wohingegen *Runx2* und *Osx* normal exprimiert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die ATF4 Aktivität nach RUNX2 und OSX erfolgt. Zusätzlich fiel auf, dass in *Atf4*^{-/-} Mäusen die *Col1a1* Expression normal, die Synthese von Typ I Kollagen jedoch gestört war (YANG *et al.* 2004). Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch unbekannt. *In vitro* Experimente zeigten außerdem, dass ATF4 zusammen mit RUNX2 am Osteocalcin Promoter interagiert und die Aktivität von RUNX2 verdreifacht (XIAO *et al.* 2005). Des Weiteren konnte *in vitro* eine Erhöhung der β -Catenin Menge durch ATF4 festgestellt werden. Hierbei ändert sich jedoch nicht das Level an β -Catenin mRNA, sondern ATF4 wirkt durch einen unbekanntem Mechanismus auf posttranskriptioneller Ebene (YU *et al.* 2013). Das Signalmolekül β -Catenin spielt ebenfalls eine essentielle Rolle bei der Osteoblasten Differenzierung (siehe 1.4.2 WNT).

1.4.2 Regulatorische Signalwege

Vier entwicklungsbiologisch wichtige Signalwege tragen hauptsächlich zur Osteoblasten Differenzierung bei und nehmen unter anderem Einfluss auf die genannten Transkriptionsfaktoren (Abb. 1.5). Die Signaltransduktion durch WNT, BMP, FGF, und IHH und ihre Beteiligung an der Differenzierung von Osteoblasten wird im Folgenden erläutert.

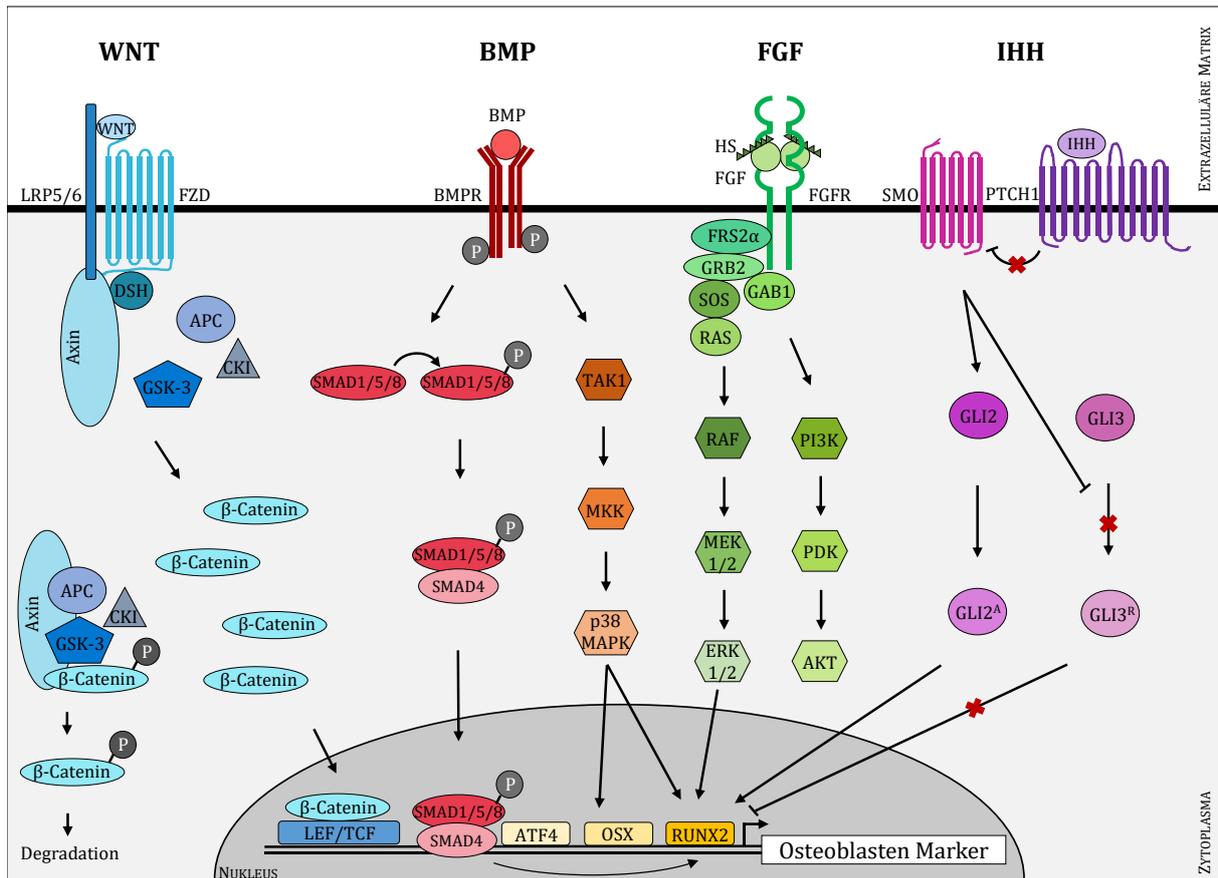


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der wichtigsten Transkriptionsfaktoren und Signalwege der Osteoblasten Differenzierung. Die Osteoblasten Differenzierung ist ein Prozess, der einer komplexen Regulation von vielen grundlegenden Signalwegen unterliegt. Die essentiellen Transkriptionsfaktoren RUNX2, OSX und ATF4 vermitteln die Expression von Osteoblast-spezifischen Genen. Weitere Regulation erfolgt durch die Signalwege: WNT, BMP, FGF und IHH.

WNT

Die WNT Liganden sind sezernierte Glykoproteine, deren Signaltransduktion an vielen Entwicklungsprozessen beteiligt ist und beispielsweise Einfluss auf die Polarität, Migration, Proliferation oder Differenzierung einer Zelle haben kann. In Menschen und Mäusen wurden bisher 19 *WNT* Gene identifiziert (WANG *et al.* 2014). Die Signalübertragung durch die WNT Liganden kann über den kanonischen Signalweg durch das Signalmolekül β -Catenin oder den nicht-kanonischen Signalweg durch intrazelluläre Kalziumfreisetzung oder planare Zellpolarität erfolgen (LOGAN AND NUSSE 2004; KOHN AND MOON 2005; JENNY 2010). An der Osteoblasten Differenzierung ist hauptsächlich der kanonische Weg beteiligt (Abb. 1.5). Die WNT Liganden interagieren mit einem Rezeptor der Frizzeld (FZD) Familie und den Ko-Rezeptoren LRP5 oder

LRP6. Dadurch wird das zytoplasmatische Phosphoprotein Dishevelled (DSH) aktiviert und vermittelt die Dissoziation eines Proteinkomplexes bestehend aus Axin, APC, CKI und GSK-3 Kinase. Dieser Komplex phosphoryliert β -Catenin, was zu dessen Degradation führt. Durch die Inaktivierung des Komplexes akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma und gelangt letztendlich in den Nukleus. Dort bildet es einen Komplex mit LEF1 und TCF und vermittelt die Transkription von Osteoblasten Genen. Der konditionelle Knockout der Ko-Rezeptoren *Lrp5/6* im embryonalen Mesenchym von Mäusen zeigte die Wichtigkeit des kanonischen WNT Signalwegs für die Osteoblasten Differenzierung und damit für die embryonale Entwicklung des Skeletts. Die Mäuse bildeten keine Osteoblasten und zeigten Skelettfehlbildungen (JOENG *et al.* 2011). Die Inaktivierung von β -Catenin in Vorläuferzellen verhinderte ebenfalls die Differenzierung zu Osteoblasten und führte dazu, dass die Zellen zu Chondrozyten differenzierten (GUO *et al.* 2004; DAY *et al.* 2005; HILL *et al.* 2005; HU *et al.* 2005; RODDA AND MCMAHON 2006). β -Catenin ist somit schon zu einem frühen Zeitpunkt für die Osteoblasten Differenzierung wichtig und unterdrückt die Chondrozyten Differenzierung. An der Skelettbildung beteiligte WNT Liganden sind vor allem WNT3a, WNT5a/b, WNT6 und WNT10a/b (YAMAGUCHI *et al.* 1999; YANG *et al.* 2003; NIEMANN *et al.* 2004; BENNETT *et al.* 2005; BENNETT *et al.* 2007; TAKADA *et al.* 2007; STEVENS *et al.* 2010; CAWTHORN *et al.* 2012). Die Signaltransduktion durch WNT kann durch mehrere Antagonisten reguliert und inhibiert werden. WIF-1 und sFRPs sind sezernierte Proteine, die extrazellulär an WNT Liganden binden und somit eine Bindung an den FZD Rezeptor verhindern (LEYNS *et al.* 1997; HSIEH *et al.* 1999). Des Weiteren können die Ko-Rezeptoren durch DKK1 zusammen mit Kremen2 oder durch Sclerostin inaktiviert werden (BAFICO *et al.* 2001; LIU *et al.* 2002; MAO *et al.* 2002; SEMENOV *et al.* 2005).

BMP

Zu der TGF- β Superfamilie gehören die sezernierten BMP Wachstumsfaktoren. Diese Signalproteine spielen eine wichtige Rolle in vielen prä- und postnatalen Prozessen wie z.B. Herzentwicklung, Skelettbildung sowie Organ- und Gewebemöostase. An der Osteogenese sind vor allem die Wachstumsfaktoren BMP2, 4, 5, 6, 7 und 9 beteiligt (LUU *et al.* 2007). Die Rezeptoren bilden einen heterotetrameren Komplex aus Typ I und II BMPR. Bei den Rezeptoren handelt es sich um Serin/Threonin Kinasen. Nach der Bindung des BMP Liganden kann die Signaltransduktion über zwei Wege erfolgen: den SMAD abhängigen Signalweg oder den MAPK Signalweg (Abb. 1.5). Beide sind an der Osteoblasten Differenzierung beteiligt. Bei der Signaltransduktion über SMAD werden die regulatorischen SMADs 1, 5 oder 8 durch die Rezeptoren phosphoryliert und können mit dem Kofaktor SMAD4 einen Komplex bilden. Im Zellkern vermittelt dieser Komplex zusammen mit weiteren Koaktivatoren die Transkription von Osteoblasten Genen, unter anderem auch von *RUNX2* (LEE *et al.* 2002; WU *et al.* 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex auch direkt mit *RUNX2* interagieren

kann und so die Osteoblasten Genexpression beeinflusst (FRANCESCHI AND XIAO 2003). Die Beteiligung der Signaltransduktion über SMAD1 an der Osteoblasten Differenzierung konnten Wang et al. in Mäusen durch die Osteoblasten spezifische Inaktivierung von Smad1 nachweisen. Die Embryonen zeigten eine gestörte Osteoblasten Proliferation und Differenzierung (WANG *et al.* 2011).

Nach der Rezeptoraktivierung kann die Signalweiterleitung auch über den SMAD unabhängigen Weg stattfinden. Hierbei erfolgt die Aktivierung der Kinasen TAK1, MKK, und p38 MAPK, was wiederum zur Phosphorylierung von RUNX2, OSX und DLX5 führt (ULSAMER *et al.* 2008; ORTUNO *et al.* 2010; GE *et al.* 2012). Dies steigert deren Transkriptionsaktivität, da die Interaktion mit Kofaktoren durch die Phosphorylierung erleichtert wird. Lee et al. zeigten außerdem, dass die Signaltransduktion über MAPK *in vitro* die RUNX2 und OSX Expression positiv beeinflusst (LEE *et al.* 2002).

Am besten untersucht im Zusammenhang mit der Osteoblasten Differenzierung sind die Liganden BMP2 und BMP7. BMP2 steigert unter anderem die Osteocalcin und OSX Expression sowie die Alkalische Phosphatase Aktivität (LEE *et al.* 2003; LUU *et al.* 2007; WANG *et al.* 2010). Für BMP7 konnte die Expressionsinduktion von Osteoblasten Markern wie Alkalische Phosphatase und die Förderung der Kalzium Mineralisierung nachgewiesen werden (GU *et al.* 2004; SHEN *et al.* 2010). Die BMP Signaltransduktion ist außerdem auch an der Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten beteiligt, indem sie Einfluss auf die SOX9 Expression nimmt (PARK *et al.* 2005; PAN *et al.* 2008).

Inhibiert werden kann die BMP Signaltransduktion durch zahlreiche Antagonisten wie z.B. Noggin, Chordin oder inhibitorische SMADs. Der bekannteste Antagonist ist das extrazelluläre Protein Noggin. Es bindet BMPs und verhindert so deren Rezeptorbindung. *Noggin*^{-/-} Mäuse zeigen schwere Skelettfehlbildungen aufgrund einer gestörten BMP Signaltransduktion (BRUNET *et al.* 1998; WIJGERDE *et al.* 2005). Eine Überexpression von Noggin *in vitro* verhindert die Osteoblasten Differenzierung (DEVLIN *et al.* 2003; WU *et al.* 2003). Die Expression des BMP Antagonisten wird nicht nur durch FGF Signaltransduktion oder SOX9 vermittelt, sondern auch durch BMPs induziert, sodass eine negative Rückkopplung durch den BMP Signalweg entsteht (GAZZERRO *et al.* 1998).

FGF

An vielen Entwicklungsprozessen ist auch die Signaltransduktion über die FGF Wachstumsfaktoren beteiligt. Bei der Skelettentwicklung tragen sie unter anderem zur Osteoblasten Differenzierung bei. FGFs sind sezernierte Polypeptide, die an Tyrosin Kinase Rezeptoren (FGFR) binden. 22 FGF Liganden und vier Rezeptoren wurden im Menschen identifiziert. Die Rezeptoren besitzen drei extrazelluläre Immunglobulin (Ig) ähnliche Domänen. Durch alternatives Spleißen können Varianten dieser Ig Domänen in FGFR1-4 ausgebildet

werden, sodass die Isoformen der Rezeptoren unterschiedliche Ligandenaffinitäten aufweisen. Die Bildung der Isoformen ist hierbei gewebespezifisch, die b-Form liegt in epithelialem und die c-Form in mesenchymalem Gewebe vor (JOHNSON AND WILLIAMS 1993; ORNITZ *et al.* 1996). Zusammen mit einer Heparinsulfat Kette bindet der Ligand an den Rezeptor. Die Rezeptoren mit Liganden bilden Homodimere aus, wodurch die Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Rezeptorbereiche erfolgt. An die phosphorylierten Stellen können Adaptorproteine wie FRS2 α binden, die weitere Signalmoleküle rekrutieren und letztendlich zur Aktivierung von drei möglichen Signalwegen führen (Abb. 1.5). Eine Möglichkeit ist die Aktivierung der RAS/MAPK Kaskade, die beteiligt ist an Zellproliferation und -differenzierung. Hierbei werden die Kinasen JNK, ERK1/2 und p38 MAPK aktiviert. Des Weiteren kann der PI3/AKT Signalweg durch FGFR aktiviert werden. Dieser spielt eine Rolle bei der Zellpolarität und -überleben. Eine weitere Option ist die Signaltransduktion über PLC γ (ESWARAKUMAR *et al.* 2005). Die FGF Signaltransduktion wird durch verschiedene Inhibitoren reguliert. So binden beispielsweise Proteine der SPRY Familie an RAF oder konkurrieren mit GRB2 um die Bindung an FRS2 α und verhindern dadurch die Weiterleitung des Signals (HANAFUSA *et al.* 2002; TIMSAH *et al.* 2014). Die Phosphorylierung der Effektor kinase ERK kann durch SEF verhindert oder durch DUSP6 wieder aufgehoben werden (CAMPS *et al.* 2000; TORII *et al.* 2004; LI *et al.* 2007).

In den Osteoblasten Vorläuferzellen und in Osteoblasten werden hauptsächlich die Rezeptoren FGFR1 und FGFR2 exprimiert (DELEZOIDE *et al.* 1998; OHBAYASHI *et al.* 2002). FGFR3 hingegen wird vor allem in proliferierenden Chondrozyten exprimiert (NASKI AND ORNITZ 1998; RICE *et al.* 2000). Ein wichtiger Ligand während der Osteoblasten Differenzierung ist FGF2. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass FGF2 die Transkription von Osteocalcin, *BMP2* und *TWIST1* fördert (NEWBERRY *et al.* 1999; RICE *et al.* 2000; YOON *et al.* 2014). Des Weiteren reguliert FGF2 die Funktion von RUNX2, vermutlich über Phosphorylierung durch ERK1 (XIAO *et al.* 2002; PARK *et al.* 2010). Eine reduzierte Osteogenese ist die Folge, wenn die FGF2 Aktivität in Hühnerembryonen blockiert wird (MOORE *et al.* 2002). Dahingegen zeigen neugeborene *Fgf2*^{-/-} Mäuse keine skelettalen Auffälligkeiten. Adulte Mäuse haben jedoch ein reduziertes Knochenwachstum und eine geringere Knochendichte (ZHOU *et al.* 1998; MONTERO *et al.* 2000). Neben FGF2 spielt auch FGF18 eine Rolle in der Osteoblasten Differenzierung. Die Expression des Liganden kann durch β -Catenin und RUNX2 vermittelt werden (REINHOLD AND NASKI 2007). *In vitro* wiederum hat FGF18 durch die Effektor kinase ERK einen Einfluss auf die *RUNX2* Expression (HAMIDOUCHE *et al.* 2010). *Fgf18* defiziente Mäuse zeigen eine verzögerte Ossifikation des Skeletts, was zur Annahme führt, dass FGF18 wichtig für die Osteoblasten Differenzierung ist (LIU *et al.* 2002; OHBAYASHI *et al.* 2002).

Mutationen in den Rezeptorengenen *FGFR1-3* sind im Menschen mit diversen Skeletterkrankungen assoziiert, die zum Teil auf die Beteiligung der FGF Signaltransduktion bei der Osteoblasten Differenzierung zurückzuführen sind. Jacob *et al.* konnten zeigen, dass FGFR1

die Differenzierung fördert, jedoch ohne einen Effekt auf RUNX2. Des Weiteren zeigte sich auch, dass der Einfluss von FGFR1 Zeitpunkt spezifisch ist. Vorläuferzellen werden durch FGFR1 zur Differenzierung stimuliert, in Osteoblasten hingegen wird eine weitere Differenzierung inhibiert (JACOB *et al.* 2006). Sowohl die Präosteoblasten Proliferation als auch die Funktion der differenzierten Osteoblasten wird durch FGFR2 gefördert (YU *et al.* 2003). Zudem konnte in humanen Osteoblasten gezeigt werden, dass aktivierende *FGFR2* Mutationen die *RUNX2* Expression steigern (TANIMOTO *et al.* 2004; BARONI *et al.* 2005). Die verschiedenen Rezeptoren haben zum einen unterschiedliche Funktionen in der Regulation der Proliferation der Vorläuferzellen und der Differenzierung zu Osteoblasten und zum anderen kann jeder Rezeptor unterschiedliche, Zeitpunkt spezifische Effekte haben. Die regulatorischen Mechanismen sind jedoch noch nicht im Detail bekannt.

IHH

Neben seiner Funktion innerhalb der Wachstumsfuge trägt IHH auch zur Differenzierung von Osteoblasten bei. Das Signalprotein IHH bindet an den PTCH1 Rezeptor, wodurch die Inhibierung des Membranproteins SMO aufgehoben wird (Abb. 1.5). Daraufhin vermittelt SMO im Zytoplasma die Bildung der Aktivatorversion von GLI2 (GLI2^A) und hemmt die Bildung von inhibitorischem GLI3^R. Durch die Aktivierung und Derepression der Zinkfinger Transkriptionsfaktoren erfolgt die Transkriptionsregulation verschiedener Gene. IHH wird hauptsächlich in prähyperthrophen und frühen hypertrophen Chondrozyten exprimiert und wirkt auf die Osteoblasten Vorläufer im Perichondrium des Knorpelgerüsts (BITGOOD AND MCMAHON 1995). Dadurch spielt der IHH Signalweg vor allem bei der Osteoblasten Differenzierung in der endochondralen Ossifikation eine Rolle. *Ihh* defiziente Mäuse sind minderwüchsig und zeigen eine verzögerte und gestörte Ossifikation des axialen Skeletts. Das endochondrale Skelett dieser Mäuse weist keine reifen Osteoblasten auf (ST-JACQUES *et al.* 1999). Es zeigte sich, dass die Osteoblasten Vorläufer dieser Mäuse kein *Runx2* bilden (RAZZAQUE *et al.* 2005). Eine erzwungene *Runx2* Expression führte jedoch zu keiner Aufhebung des Phänotyps, sodass IHH die Osteoblasten Differenzierung vermutlich noch über einen weiteren Effektor vermittelt (TU *et al.* 2012). IHH hat jedoch auch Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblasten während der intramembranösen Osteogenese. *Ihh*^{-/-} Mäuse zeigen breitere Suturen und ein verzögertes Wachstum der Schädelplatten im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (ST-JACQUES *et al.* 1999; TU *et al.* 2012). Es zeigte sich, dass *Ihh* auch an den Fronten der Schädelplatten exprimiert wird (JACOB *et al.* 2007). Klopocki *et al.* identifizierten Duplikationen am *IHH* Locus bei Patienten mit vorzeitiger Fusion der Schädelplatten und Syndaktylie (KLOPOCKI *et al.* 2011). Eine gesteigerte *Ihh* Expression durch Verdopplung von Enhancerregionen führt auch in Mäusen zur Fusion der Schädelplatten (WILL *et al.* 2017). Dies zeigt, dass IHH auch bei der intramembranösen Ossifikation zur Regulation der Osteoblasten Proliferation und

Differenzierung beiträgt. *In vitro* wurden im Zusammenhang mit der Osteoblasten Differenzierung auch die Interaktion von IHH mit dem BMP und WNT Signalweg nachgewiesen (DAY AND YANG 2008; LENTON *et al.* 2011).

1.5 Suturen – Anatomie, Funktion und Wachstumsregulation

Von den intramembranösen Ossifikationszentren aus wachsen die Schädeldachknochen apikal aufeinander zu. Treffen zwei Schädelplatten während der pränatalen Entwicklung aufeinander, so werden Suturen gebildet, die eine Fusion der Schädelknochen verhindern. Die beiden Platten bleiben durch faseriges Bindegewebe getrennt. Eine Suture ist ein Komplex aus den Wachstumsfronten der aufeinandertreffenden Schädelknochen, dem dazwischen liegenden zellreichen Bindegewebe, der darunterliegenden Dura mater sowie dem darüberliegenden Pericranium (Abb. 1.6). Hierbei überlappen die Schädelplatten *Os frontale* und *Os parietale* an den Koronarnähten sowie *Os parietale* und *Os occipitale* an der Lambdanaht. An der Frontal- und Sagittalnaht hingegen treffen die Platten stumpf aufeinander (COHEN 1993). Die wichtigste Funktion der Suturen ist, dass sie Wachstumsstellen darstellen. An den Wachstumsfronten kann neuer Knochen gebildet werden, sodass parallel zur Gehirnentwicklung das Schädeldach vergrößert werden kann. Des Weiteren sind die faserigen Verbindungen zwischen den Schädelplatten ein Vorteil bei der Geburt. Sie ermöglichen eine minimale Verformung des Schädels und erleichtern somit den Durchgang durch den Geburtskanal. Zusätzlich können Suturen vor allem im Kindesalter ein gewisses Maß an mechanischen Stress absorbieren (RICE 2008).

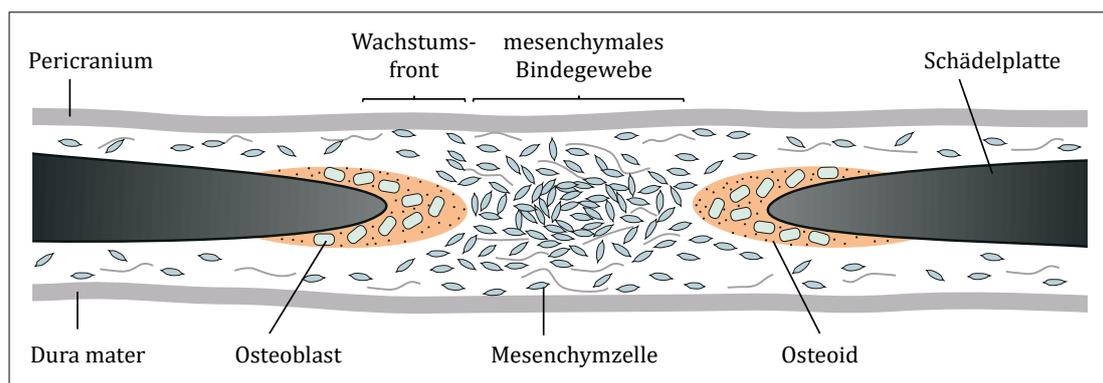


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung einer kranialen Suture. Die beiden Schädelplatten sind durch mesenchymales Bindegewebe getrennt. In der Suturenmittle findet die Proliferation der Vorläuferzellen statt. Im Bereich der Wachstumsfront differenzieren die Zellen zu Osteoblasten und es wird neue Knochenmatrix gebildet. Begrenzt wird der suturale Komplex oben vom Pericranium und unten von der Dura mater.

Um einen vorzeitigen Verschluss der Schädelnähte zu verhindern und gleichzeitig ein gleichmäßiges Knochenwachstum sicherzustellen, ist eine komplexe Regulation durch die an der Osteoblasten Differenzierung beteiligten Signalwege und ihre Antagonisten notwendig (Kapitel

1.4). Expressionsgradienten der Signalmoleküle und Rezeptoren sind erforderlich, um eine Differenzierung der proliferierenden Vorläuferzellen im Bindegewebe zu inhibieren und an den Wachstumsfronten zu induzieren. Die Signale gehen hierbei von allen Komponenten des suturalen Komplexes aus. So zeigten Transplantationsexperimente an Ratten, dass die Dura mater pränatal bei der Bildung der Suturen keine Rolle spielt, jedoch postnatal Einfluss auf die Fusion oder die Durchgängigkeit der Suturen hat (OPPERMAN *et al.* 1993; LEVINE *et al.* 1998). Außerdem gibt es regionale Signalunterschiede in der Dura mater, sodass in Ratten die interfrontale Schädelnaht teilweise fusioniert, die restlichen Schädelnähte jedoch offen bleiben (LEVINE *et al.* 1998). Die genauen Mechanismen und Interaktionen der beteiligten Signalwege an der suturalen Wachstumsregulation sind teilweise noch immer unklar. Viele Studien wurden im Zusammenhang mit dem FGF Signalweg durchgeführt. *In vivo* führt eine gesteigerte FGF Signaltransduktion zur vorzeitigen Fusion der Schädelplatten (CARLTON *et al.* 1998; ZHOU *et al.* 2000; CHEN *et al.* 2003; ESWARAKUMAR *et al.* 2004). Mit Ausnahme der Liganden FGF3, 4, 5, 6 und 8 werden alle FGF Liganden im suturalen Komplex exprimiert (ISEKI *et al.* 1999; HAJIHOSEINI AND HEATH 2002). Besonders stark exprimiert, vor allem im mesenchymalen Bindegewebe und der Dura mater, sind die Signalmoleküle FGF2 und FGF9 (KIM *et al.* 1998; RICE *et al.* 2000; WARREN *et al.* 2003). Die Expression der Rezeptoren erfolgt in definierten Zonen innerhalb der Suturen. In den differenzierten Osteoblasten an der Wachstumsfront wird FGFR1 und in den angrenzenden proliferierenden Präosteoblasten FGFR2 exprimiert. Das Expressionsmuster von FGFR3 deckt sich mit dem von FGFR2, allerdings wird FGFR3 deutlich schwächer exprimiert (ISEKI *et al.* 1997; ISEKI *et al.* 1999; JOHNSON *et al.* 2000; YOSHIDA *et al.* 2005). Iseki *et al.* konnten zeigen, dass eine geringe FGF Signaltransduktion über FGFR2 assoziiert ist mit der Proliferation der Vorläuferzellen und im Gegensatz dazu verstärkte FGF Signale zur FGFR1 Expression und Osteoblasten Differenzierung führen (ISEKI *et al.* 1999; YU *et al.* 2003). Der FGF Signalweg trägt somit dazu bei, dass die Schädelplatten wachsen, allerdings nicht vorzeitig fusionieren. Auf die *FGFR2* Expression und somit auch auf die Aufrechterhaltung der Suturen hat unter anderem TWIST1 Einfluss. Hierbei ist der Effekt auf die *FGFR2* Expression abhängig davon mit welchem Partner TWIST1 ein Dimer bildet. TWIST1 kann mit sogenannten E Proteinen Heterodimere ausbilden und dadurch die Transkription anderer Gene vermitteln. Homodimere (T/T) fördern und Heterodimere (T/E) inhibieren die *FGFR2* Expression (CONNERNEY *et al.* 2006). Welches Dimer gebildet wird ist wiederum abhängig von der Expression der Id Proteine. Id Proteine verhindern die T/E Bildung durch Bindung der E Proteine (MASSARI AND MURRE 2000). Im suturalen Komplex werden Id Proteine in Zellen nahe der Wachstumsfront exprimiert, sodass in diesem Bereich T/T überwiegt und in den undifferenzierten Mesenchymzellen der Suturenmitte T/E vorliegt. TWIST1 trägt somit zur Bildung der Grenze von starker und geringer FGF Signalgebung bei. Auch hier gibt es Interaktionen mit anderen Signalwegen, so kann die Id Expression durch den BMP Signalweg induziert werden (CONNERNEY *et al.* 2006; CONNERNEY *et al.*

2008). Neben den in Kapitel 1.4 genannten Signalwegen spielen bei der Wachstumsregulation der Schädelplatten noch weitere Faktoren wie MSX2, FOXC1, Eph/Ephrine und TGF- β eine Rolle (RICE 2008). Über die grundlegenden Signale, die die Expression der Faktoren der unterschiedlichen Signalwege vermitteln, ist noch wenig bekannt. Mechanische Kräfte scheinen allerdings daran beteiligt zu sein. Das wachsende Gehirn erzeugt Druck und Spannung auf die Suturen. Mechanischer Stress kann über die extrazelluläre Matrix eine Verformung des Zytoskeletts bewirken und dadurch Änderungen in der zellulären Signalgebung vermitteln (MAO AND NAH 2004; TEMIYASATHIT AND JACOBS 2010). Case et al. konnten *in vitro* zeigen, dass β -Catenin in Präosteoblasten akkumuliert, wenn diese mechanischem Stress ausgesetzt werden (CASE *et al.* 2008). Es sind jedoch noch weitere Studien nötig, um die genauen Zusammenhänge der Wachstumsregulation des Schädels zu identifizieren.

1.6 Kraniosynostose

Wenn die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung in den Suturen durch Fehlregulation der unter Kapitel 1.4 und 1.5 beschriebenen Signalwege gestört wird, kann es zu einer fehlerhaften Ossifikation des Schädels kommen. Dazu zählt unter anderem die vorzeitige Fusion einer oder mehrerer Suturen. Dies wird als Kraniosynostose bezeichnet. Kraniosynostose ist eine der häufigsten angeborenen kraniofazialen Fehlbildungen mit einer Inzidenz von 1:2100-2500 (LAJEUNIE *et al.* 1995; BOULET *et al.* 2008; JOHNSON AND WILKIE 2011). Dabei kann die vorzeitige Fusion isoliert oder zusammen mit weiteren klinischen Auffälligkeiten als Teil eines Syndroms vorliegen. Ca. 70% der Fälle haben isolierte Kraniosynostose (WILKIE *et al.* 2017). Allerdings sind über 150 Syndrome bekannt, bei denen Kraniosynostose Teil des Phänotyps ist (OMIM Datenbank).

Verschließt sich eine Schädelnaht zu früh, so findet kompensatorisches Wachstum an den noch offenen Suturen statt, um eine normale Gehirnentwicklung zu ermöglichen. Dadurch entsteht ein deformierter Schädel. Abhängig davon welche Schädelnaht von Kraniosynostose betroffen ist, entsteht eine charakteristische Kopfform (Abb. 1.7). So führt beispielsweise eine vorzeitig fusionierte Sagittalnaht zu verstärktem longitudinalem Wachstum der parietalen Knochen, sodass sich ein Skaphozephalus, auch Dolichocephalus genannt, bildet. Die Sagittalnaht ist mit über 50% die am häufigsten von einer vorzeitigen Verknöcherung betroffene Schädelnaht. Ebenfalls sehr häufig sind unilaterale oder bilaterale Fusionen der Koronarnähte (20-30%) (KIMONIS *et al.* 2007; CIUREA AND TOADER 2009).

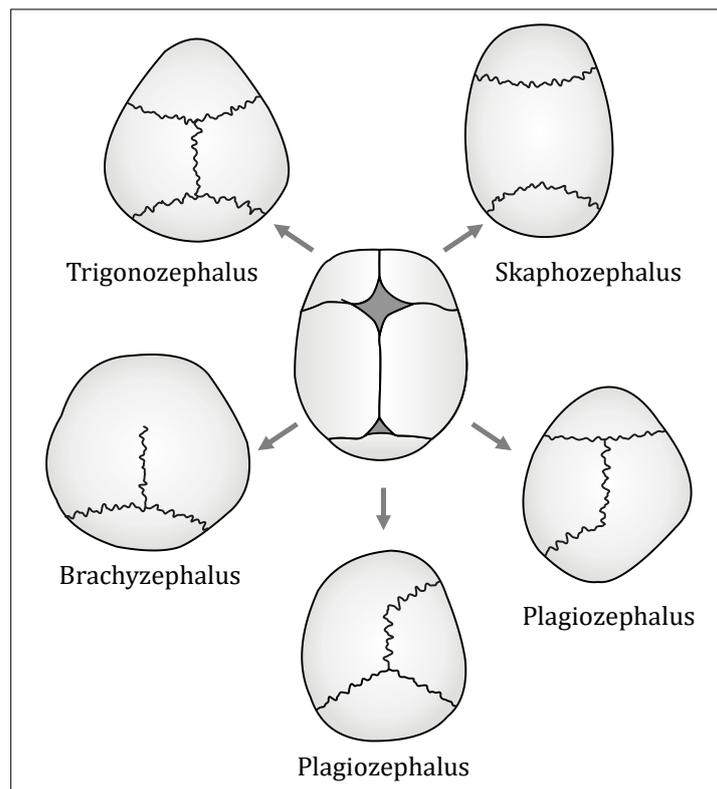


Abbildung 1.7: Schädelform nach Fusion einzelner Schädelnähte. Durch die vorzeitige Verknöcherung einer Suture findet vermehrtes Wachstum an den anderen Wachstumsfronten statt, sodass ohne chirurgische Korrektur ein deformierter Schädel entsteht.

Sekundäre Folgen von Kraniosynostosen können ein erhöhter intrakranieller Druck, faziale Deformationen, Intelligenzminderung oder seltener auch Hörstörungen sein. Das Sehvermögen, die Atemwege und die Zahnstellung können wiederum durch die fazialen Deformationen beeinträchtigt werden. Die einzige therapeutische Möglichkeit für Kraniosynostosen ist bisher eine Operation. Die chirurgische Korrektur wird gewöhnlich innerhalb des ersten Lebensjahres durchgeführt und dient meist dazu eine normale Gehirnentwicklung zu ermöglichen. Häufig spielen bei der Entscheidung zur Operation auch psychosoziale Aspekte in Bezug auf die Deformationen eine Rolle.

Die Pathogenese von Kraniosynostosen ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings sind neben genetischen Ursachen auch Umwelteinflüsse als Risikofaktoren beschrieben. Zu diesen zählen eine verminderte Fruchtwassermenge, Mehrlingsschwangerschaften, Rachitis durch Vitamin D Mangel, maternale Hyperthyreose sowie Teratogene wie Retinoide oder Methotrexat (ROY *et al.* 1981; RIDGWAY AND WEINER 2004; RASMUSSEN *et al.* 2007; WANG *et al.* 2007a; SANCHEZ-LARA *et al.* 2010). Kraniosynostosen sind genetisch betrachtet eine sehr heterogene Erkrankung mit assoziierten Mutationen in vielen verschiedenen Genen sowie beschriebenen Aberrationen fast aller Chromosomen. Bei ca. 24% der Patienten kann eine genetische Ursache identifiziert werden, der Großteil davon weist syndromale Kraniosynostosen auf (WILKIE *et al.* 2017). Chromosomale Aberrationen wie z.B. partielle Monosomien von 7p, 9p und 11p oder partielle

Trisomien von 5q, 13q und 15q wurden mit Kraniosynostose assoziiert und bei ca. 11-15% der syndromalen Patienten detektiert (WILKIE *et al.* 2010; WILKIE *et al.* 2017). Bisher sind außerdem Mutationen in mindestens 57 Genen beschrieben, deren Assoziation mit Kraniosynostose validiert ist (TWIGG AND WILKIE 2015). Unter diesen Mutationen sind sowohl Veränderungen, die einen Funktionsverlust (engl. *loss-of-function*) als auch Veränderungen, die einen Funktionsgewinn (engl. *gain-of-function*) zur Folge haben. Am häufigsten treten Kraniosynostose Mutationen in den Genen *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1* und *TCF12* auf (WILKIE *et al.* 2017). In Tabelle 1.1 sind klassische Kraniosynostose Gene mit Mutationen und ihren assoziierten Syndromen gelistet. Hierbei können zum einen Mutationen in verschiedenen Genen zu dem gleichen Phänotyp führen (z.B. *FGFR1/FGFR2* - Pfeiffer Syndrom) und zum anderen gleiche Mutation unterschiedliche Syndrome ergeben (z.B. *FGFR2* S267P – Crouzon Syndrom/Pfeiffer Syndrom). Veränderungen in den *FGFR* Genen sind die häufigsten (ca. 45%) identifizierten genetischen Ursachen bei Kraniosynostose Patienten (WILKIE *et al.* 2017). Alle *FGFR* Mutationen werden dominant vererbt und haben einen *gain-of-function* Effekt, der die Liganden unabhängige Rezeptordimerisierung vermittelt oder die Affinität der Liganden Bindung ändern.

Tabelle 1.1. Klassische Kraniosynostose Gene und ihre assoziierten Syndrome

Gen	Mutationen	Kraniosynostose / Syndrom	OMIM
<i>EFNB1</i>	>70 ¹	Kraniofrontonasale Dysplasie	304110
<i>FGFR1</i>	P252R	Jackson-Weiss Syndrom	123150
	P252R	Pfeiffer Syndrom	101600
<i>FGFR2</i>	S252W, P253R	Apert Syndrom	101200
	>30 ²	Crouzon Syndrom	123500
	A344G	Jackson-Weiss Syndrom	123150
	>30 ²	Pfeiffer Syndrom	101600
<i>FGFR3</i>	A391E	Crouzonodermoskeletales Syndrom	123500
	P250R	Muenke Syndrom	602849
<i>MSX2</i>	P148H, P148L	Kraniosynostose 2	604757
<i>RAB23</i>	6 ²	Carpenter Syndrom	201000
<i>TCF12</i>	>40 ³	Kraniosynostose 3	615314
<i>TWIST1</i>	A186T, S188L	Kraniosynostose 1	123100
	>100 ¹	Saethre-Chatzen Syndrom	101400

¹ (RICE 2008)

² (MUENKE *et al.* 2011)

³ (SHARMA *et al.* 2013; DI ROCCO *et al.* 2014; PAUMARD-HERNANDEZ *et al.* 2015; LEE *et al.* 2017)

Kraniosynostose Syndrome zeigen eine große klinische Variabilität und phänotypische Überlappung, dennoch gibt es einige syndromspezifische Merkmale, die im Folgenden für die sogenannten klassischen Kraniosynostose Syndrome kurz erläutert werden. Patienten, die vom Apert Syndrom betroffen sind, haben häufig folgende kraniofaziale Auffälligkeiten: bilaterale

Koronarnahtsynostose, Mittelgesichtshypoplasie, Exophthalmus, trapezförmige Oberlippe sowie dentale Anomalien. Besonders charakteristisch sind jedoch symmetrische Syndaktylien der Hände und Füße. Die phänotypischen Merkmale des Crouzon Syndroms sind sehr variabel. Häufig sind multiple Suturen fusioniert, was zu einem Turmschädel führt. Die typische Crouzon Fazies entsteht durch Exophthalmus, Hypertelorismus, Hypoplasie des Oberkiefers und einer schnabelförmigen Nase. Eher unspezifisch sind die Merkmale des Muenke Syndroms, die in ihrer Ausprägung von nicht sichtbar bis zu phänotypisch komplex reichen können. Es ist vor allem genetisch durch die *FGFR3* Substitution P250R definiert. Koronarnahtsynostosen, milde Brachydaktylie, Hörstörungen sowie variable mentale Einschränkungen wurden bei Muenke Patienten beschrieben. Ein Kleeblattschädel mit Fusion aller Suturen tritt häufiger bei Patienten mit Pfeiffer Syndrom auf. Des Weiteren sind Patienten oft von Exophthalmus, Oberkiefer Hypoplasie, partiellen Syndaktylien und verbreiterten Daumen und Großzehen betroffen. Eine Haploinsuffizienz von *TWIST1* ist die Ursache für das Saethre-Chatzen Syndrom. Hauptmerkmale dieses Syndroms sind Koronarnahtsynostosen, eine hohe Stirn mit tiefem Haaransatz, kleine Ohren mit prominenter Helix und partielle Syndaktylie des 2. und 3. Fingers (MUEKKE *et al.* 2011; FORREST AND HOPPER 2013).

1.7 Zielsetzung

Die Pathogenese von Kraniosynostosen ist noch nicht vollständig geklärt. Eine komplexe Regulation von Genexpression und Signalwegen ist notwendig, um ein normales Wachstum der Schädelplatten zu gewährleisten. In über 50% der Kraniosynostose Fälle ist die genetische Ursache bisher unbekannt. Das Ziel dieser Arbeit ist es neue genetische Ursachen für Kraniosynostose zu identifizieren, um so dazu beizutragen die Pathogenese von Kraniosynostosen weiter aufzuklären. Die Aufklärung und das Verständnis des grundlegenden Mechanismus der Erkrankung könnte in Zukunft zur Entwicklung neuer Therapieansätze führen. Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Patienten Kohorte, die in Kooperation mit der Pädiatrischen Neurochirurgie der Universitätsklinik Würzburg erstellt wird, molekulargenetisch untersucht werden. Hierzu sollen die genetischen Analysen mit den Methoden Mikroarray-basierter komparativer genomischer Hybridisierung (Array-CGH) und *Next Generation Sequencing* (NGS) erfolgen. Hochauflösende Array-CGH ermöglicht eine genomweite Analyse von Verlusten und Zugewinnen an genomischen Materialen. Diese Kopienanzahlveränderungen (engl. *copy number variants*; CNV) können benigne sein oder aber eine pathogene Genomveränderung zur Folge haben. Wie kritisch die Dosis mancher Faktoren in der Schädelentwicklung sein kann, zeigen die Beispiele *RUNX2* und *TWIST1*. Haploinsuffizienzen von *RUNX2* bzw. *TWIST1* durch Mutationen oder CNVs können zu Kleidokranialer Dysplasie bzw. Saethre-Chatzen Syndrom führen (GRIPP *et al.* 2000; OTTO *et al.* 2002). Bei der Auswertung der

Array-CGH Daten der Kraniosynostose Kohorte soll aber auch besonders auf konservierte, nicht-kodierende Bereiche im größeren Umfeld von Genen, die an der Osteogenese beteiligt sind, geachtet werden. Man nimmt an, dass strukturelle Veränderungen von regulatorischen Bereichen Änderungen in der Genexpression bewirken können und somit Einfluss auf die komplexe Regulation der Schädelbildung nehmen. Dieser Mechanismus wird auch als Ursache für einige Fälle von Kraniosynostose Typ Philadelphia vermutet. Betroffenen Patienten haben Mikroduplikationen, die im Intron von *NHEJ1*, einem Nachbarn von *IHH*, überlappen. In dieser Region liegen konservierte nicht-kodierende Elemente, die Einfluss auf die *IHH* Expression nehmen. Eine Duplikation dieses Bereichs führt zu einer gesteigerten *IHH* Expression (KLOPOCKI *et al.* 2011; WILL *et al.* 2017).

Des Weiteren soll im Rahmen dieser Arbeit ein NGS Kraniosynostose Genpanel, das die gleichzeitige Analyse von mehreren Zielgenen ermöglicht, erstellt und die Kohorte damit molekulargenetisch untersucht werden. Die phänotypischen Auffälligkeiten syndromaler Kraniosynostosen sind zum einen oft unterschiedlich stark ausgeprägt und zum anderen häufig nicht syndromspezifisch, sodass es oft schwer ist eine Diagnose anhand des Phänotyps zu treffen. Häufig müssen in der molekulargenetischen Diagnostik mehrere Gene separat analysiert werden, was zeitaufwändig und kostenintensiv sein kann. Neben bekannten Kraniosynostose Genen soll das Genpanel auch weitere an der Osteogenese beteiligten Gene umfassen. Das Panel soll zum einen als zeitsparendes diagnostisches Tool verwendet werden und zum anderen dazu beitragen neue potentiell pathogene Varianten zu identifizieren, um das Mutationsspektrum bekannter Kraniosynostose Genen zu erweitern. Neue potentiell pathogene Ursachen aus beiden Analysemethoden sollen durch anschließende Analysen, wie beispielsweise Segregationsanalysen durch Sanger Sequenzierung oder quantitative Polymerasekettenreaktion, bestätigt werden. Des Weiteren sollen, soweit möglich, funktionelle Untersuchungen in Zellkultur oder dem Modellorganismus *Danio rerio* durchgeführt werden.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

Die Auswahl und Zusammensetzung der Patienten Kohorten wird erläutert sowie eine Auflistung der Hersteller, von denen Chemikalien und Kits bezogen wurden, und die Quellenangaben zu den genutzten Datenbanken und Software. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer befindet sich unter 2.2 und 2.3 bei der jeweiligen Methode.

2.1.1 Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit sollen genetische Analysen durchgeführt werden, um die Pathogenese von Kraniosynostose weiter aufzuklären. Hierzu wurde eine Kraniosynostose Patienten Kohorte erstellt, die zum einen aus dem Kollektiv des Diagnostiklabors des Institut für Humangenetik stammt und zum anderen über die kraniofaziale Sprechstunde der Pädiatrischen Neurochirurgie der Universitätsklinik Würzburg durch OA PD Dr. med. T. Schweitzer rekrutiert wurden (Tabelle 2.1). Die Kohorte umfasst 83 Kraniosynostose Patienten mit isolierter und syndromaler Kraniosynostose. Bei 62 Patienten wurden bereits zuvor genetische Analysen, wie z.B. Sequenzierung der Gene *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* und *TWIST1*, durchgeführt und waren ohne Ergebnis.

Tabelle 2.1: Kraniosynostose-Kohorte

Patienten-ID	Kraniosynostose	Auffälligkeiten Extremitäten	zusätzliche Auffälligkeiten	Diagnostik	Array-CGH	NGS
CRA_1	koronar unilateral	-	-	+	+	-
CRA_2	koronar bilateral	-	-	+	-	-
CRA_3	sagittal, koronar	-	+	+	-	+
CRA_4	sagittal, koronar	-	-	+	+	-
CRA_5	koronar	-	-	+	+	-
CRA_6	lambda	-	+	+	-	+
CRA_7	koronar bilateral	-	-	+	+	-
CRA_8	koronar bilateral	+	+	+	+	-
CRA_9	sagittal, koronar	-	-	+	+	-
CRA_10	sagittal	-	+	+	+	-
CRA_11	sagittal, koronar	-	-	+	+	-
CRA_12	metopisch, koronar	-	-	+	+	-
CRA_13	koronar bilateral	-	+	+	+	+
CRA_14	metopisch, lambda	-	+	+	-	+
CRA_15	lambda	-	-	+	+	-

CRA_16	+	+	+	+	+	+
CRA_17	koronar unilateral	-	+	+	-	+
CRA_18	+	+	+	+	+	+
CRA_19	sagittal	+	+	-	-	+
CRA_20	metopisch, sagittal	-	+	+	-	+
CRA_21	koronar, lambda	-	+	+	+	+
CRA_22	+	N/A	+	+	+	+
CRA_23	metopisch	-	-	+	-	+
CRA_24	metopisch	-	-	-	-	+
CRA_25	multiple	+	+	+	+	+
CRA_26	+	N/A	+	+	-	+
CRA_27	koronar unilateral	-	N/A	+	-	+
CRA_28	sagittal, koronar	-	+	+	-	+
CRA_29	+	+	-	+	-	+
CRA_30	metopisch	-	+	+	+	-
CRA_31	sagittal	-	+	+	+	+
CRA_32	koronar, lambda	-	+	+	+	-
CRA_33	multiple	-	+	+	+	+
CRA_34	sagittal	+	+	+	+	+
CRA_35	koronar unilateral	-	+	+	+	-
CRA_36	+	+	+	+	-	+
CRA_37	sagittal, koronar	-	+	+	-	+
CRA_38	sagittal	N/A	N/A	-	+	-
CRA_39	sagittal	N/A	N/A	-	+	-
CRA_40	koronar	-	+	+	+	-
CRA_41	koronar	+	-	+	+	+
CRA_42	koronar	+	-	+	-	+
CRA_43	metopisch	+	N/A	+	-	+
CRA_44	+	N/A	+	+	-	+
CRA_45	metopisch, koronar	-	+	+	+	-
CRA_46	koronar bilateral	-	+	+	-	+
CRA_47	metopisch	-	+	+	+	+
CRA_48	lambda	+	+	+	-	+
CRA_49	metopisch	+	+	+	+	+
CRA_50	sagittal	+	+	+	-	+
CRA_51	sagittal	-	+	+	-	+
CRA_52	sagittal	-	+	+	-	+
CRA_53	metopisch	-	+	N/A	+	+
CRA_54	+	N/A	N/A	N/A	-	+
CRA_55	+	-	+	+	-	+

CRA_56	koronar bilateral	-	-	+	-	+
CRA_57	+	-	+	+	-	+
CRA_58	multiple	-	+	-	+	-
CRA_59	multiple	-	+	-	+	-
CRA_60	metopisch	-	+	+	-	+
CRA_61	+	+	-	+	-	+
CRA_62	koronar, lambda	+	+	-	-	+
CRA_63	metopisch	-	+	+	-	+
CRA_64	multiple	+	+	+	+	+
CRA_65	+	N/A	+	-	-	+
CRA_66	+	-	+	+	-	+
CRA_67	koronar	-	+	-	-	+
CRA_68	koronar	-	-	-	-	+
CRA_69	+	-	N/A	-	-	+
CRA_70	koronar	-	N/A	-	-	+
CRA_71	metopisch	N/A	N/A	-	-	+
CRA_72	metopisch, sagittal	-	+	+	-	+
CRA_73	sagittal	-	-	-	-	+
CRA_74	koronar	-	-	-	-	+
CRA_75	koronar bilateral	-	+	+	-	+
CRA_76	koronar	-	-	-	-	+
CRA_77	sagittal	-	+	-	-	+
CRA_78	koronar	-	+	-	-	+
CRA_79	koronar	-	-	-	-	+
CRA_80	koronar	-	+	+	-	+
CRA_81	koronar unilateral	-	-	+	-	+
CRA_82	koronar	-	+	+	-	+
CRA_83	koronar unilateral	-	+	+	-	+

+: ja; -: nein; N/A: nicht bekannt

Für das Teilprojekt 3.4 wurde eine zusätzliche Patienten Kohorte erstellt (Tabelle 2.2). Diese 96 Patienten weisen einen vorzeitigen Verschluss der Frontal- oder Sagittalnaht auf und wurden aus dem Kollektiv des humangenetischen Diagnostiklabors des Instituts ausgewählt. Die klinischen und persönlichen Daten aller Patienten wurden von den betreuenden Ärzten erhoben und pseudonymisiert. Für die genetischen Analysen wurde genomische DNA (gDNA) aus peripherem Blut als Untersuchungsmaterial verwendet. Die Isolation der gDNA aus den Blutproben fand durch das humangenetische Diagnostiklabor statt. Ein Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg sowie die Einverständniserklärungen der Patienten bzw. der Eltern für die Durchführung von genetischen Analysen liegen vor (Votum Nr. 89/13, Anlage B).

Tabelle 2.2: SMAD6-Kohorte

Patienten ID	Kraniosynostose	Patienten ID	Kraniosynostose	Patienten ID	Kraniosynostose
P01	sagittal	P33	sagittal	P65	sagittal
P02	sagittal	P34	sagittal	P66	sagittal
P03	metopisch	P35	metopisch	P67	metopisch
P04	metopisch	P36	sagittal	P68	sagittal
P05	metopisch	P37	metopisch, sagittal	P69	metopisch
P06	metopisch	P38	sagittal	P70	sagittal
P07	metopisch, sagittal	P39	sagittal	P71	metopisch
P08	metopisch	P40	sagittal	P72	sagittal
P09	metopisch	P41	sagittal	P73	sagittal
P10	metopisch	P42	metopisch	P74	sagittal
P11	metopisch	P43	sagittal	P75	sagittal
P12	sagittal	P44	sagittal	P76	sagittal, +
P13	metopisch	P45	metopisch	P77	sagittal
P14	metopisch	P46	sagittal	P78	sagittal
P15	metopisch, sagittal	P47	metopisch	P79	metopisch
P16	metopisch	P48	sagittal	P80	sagittal
P17	sagittal	P49	sagittal	P81	sagittal
P18	sagittal	P50	sagittal	P82	sagittal
P19	metopisch	P51	sagittal	P83	metopisch
P20	metopisch	P52	sagittal	P84	metopisch
P21	sagittal	P53	metopisch	P85	metopisch
P22	sagittal	P54	sagittal	P86	metopisch
P23	metopisch	P55	metopisch	P87	metopisch
P24	metopisch	P56	sagittal	P88	metopisch
P25	metopisch	P57	sagittal	P89	sagittal
P26	sagittal	P58	sagittal	P90	sagittal
P27	metopisch, sagittal	P59	sagittal	P91	metopisch
P28	sagittal	P60	metopisch	P92	sagittal
P29	metopisch	P61	sagittal	P93	sagittal
P30	sagittal, +	P62	sagittal	P94	sagittal
P31	metopisch	P63	metopisch	P95	sagittal
P32	metopisch	P64	sagittal	P96	metopisch

+ V. a. Fusion einer weiteren Naht

2.1.2 *Danio rerio* Haltung

Der Zebrafisch (*Danio rerio*), umgangssprachlich Zebrafisch genannt, ist beheimatet in südasiatischen Süßgewässern und gehört zu der Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*). Adulte Fische können bis zu 5 cm groß werden und besitzen das namensgebende Muster aus goldenen und blauschwarzen Längsstreifen. Die Fische wurden nach Kimmel und Westerfield gehalten (KIMMEL *et al.* 1995; WESTERFIELD 1995). Die leichte und kostengünstige artgerechte Haltung, die hohe Nachkommenszahl sowie eine kurze Generationszeit trugen dazu bei, dass der Zebrafisch ein wichtiger Modellorganismus wurde. Des Weiteren erleichtern die extrakorporale Entwicklung und die Transparenz der Larven die Untersuchungen der embryonalen Entwicklung. Weitere Vorteile sind die hohe genetische Ähnlichkeit zwischen Zebrafisch und Säugetieren und die Vielzahl an Methoden, die zur genetischen Manipulation (z.B. Morpholinos, ektopische RNA Expression, CRISPR/Cas9) zur Verfügung stehen. Dies alles macht den Zebrafisch zu einem guten Modell für humane genetische Erkrankungen. Auch für Kraniosynostosen ist der Zebrafisch ein geeigneter Modellorganismus. Das Zebrafisch Neurocranium entsteht wie bei Säugetieren durch intramembranöse Ossifikation und besitzt die gleichen cranialen Suturen (Abb. 2.1). Auch die Morphologie der Suturen ist ähnlich (QUARTO AND LONGAKER 2005). Im Gegensatz zum Menschen bleiben jedoch alle Suturen lebenslang offen.

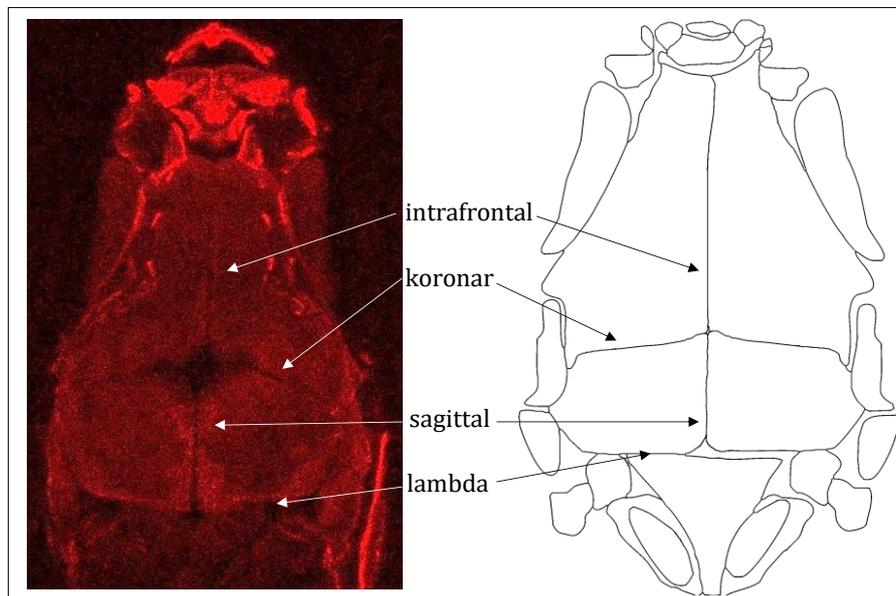


Abbildung 2.1: Neurocranium von *Danio rerio*. Das linke Bild zeigt eine konfokale Aufnahme eines 10 Wochen alten Zebrafischs (*nac⁻/tra⁻*). Die Färbung der Knochen erfolgte mit Alizarinrot. Das Neurocranium Schema links wurde modifiziert nach Kague et al. (KAGUE *et al.* 2012). Die Schädelnähte sind gekennzeichnet.

Neben dem Wildtyp Stamm *AB/AB* wurde im Rahmen dieses Projekts auch der *nac⁻/tra⁻* Stamm verwendet. Die *nac⁻/tra⁻* Fische sind auch als adulte Fische transparent, da Mutationen in den Genen *mitfa* und *mpv17* ein Verlust der Melanozyten und Iridophoren bewirken.

In dieser Arbeit wurden neben Zebrafisch Embryonen auch komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*; cDNA) von wildtypischen Zebrafischen verwendet. Sie diente als Template für die Amplifikation der Hybridisierungssonden und der kodierenden Sequenz von *fgf10a* und *huwe1*. Die cDNA der Stadien 4 Zell, 1k Zell, Dome, Shield, 1-3 Somiten, 24 hpf (engl. *hours post fertilization*), 32 hpf und 48 hpf war bereits vorhanden und wurde zu gleichen Anteilen zu einem Stadien-Mix vermischt. Des Weiteren wurden diese cDNAs und cDNA aus Augen, Gehirn, Haut, Hoden, Kiemen, Leber und Muskel für Expressionsanalysen verwendet.

2.1.3 Bakterienstamm

Im Rahmen dieser Arbeit wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* DH5 α von Life Technologies verwendet.

2.1.3 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit dem Programm Primer3Plus erstellt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden hierfür die Voreinstellungen verwendet. Mit BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) wurde sichergestellt, dass keine weiteren Bindungsstellen des Primers im Genom vorliegen. Die Primer wurden über die Firmen Sigma-Aldrich und Eurofins bezogen. Sinnstrang-Primer werden als *forward* (fwd) und Gegenstrang-Primer als *reverse* (rev) bezeichnet. Die Primersequenzen können dem Anhang A entnommen werden.

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Applied Biosystems, Beckman Coulter, Biotek, Chemikalien Schellert, Merck, Serva, Sigma-Aldrich, Roche sowie Roth bezogen.

2.1.5 Enzyme, Plasmide und Kits

Die jeweiligen Hersteller der verwendeten Enzyme, Plasmide und Kits sind innerhalb der Methodenbeschreibungen vermerkt.

2.1.6 Programme und Datenbanken

Tabelle 2.3 beinhaltet eine Auflistung der verwendeten Software, Online Tools und Datenbanken sowie ihrer Quellen.

Tabelle 2.3: Verwendete Programme und Datenbanken

Software/Datenbank	Quelle
Alamut 2.7-1	Interactive Biosoftware
ApE	http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/
BioEdit	http://en.bio-soft.net/format/BioEdit.html
CodonCode Aligner 7.1.2 Demo	CodonCode Corporation
CytoGenomics 4.02.21	Agilent Technologies
Database of Genomic Variants (DGV)	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home
DECIPHER GRCh37	https://decipher.sanger.ac.uk/
ECR Browser	https://ecrbrowser.dcode.org/
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
Ensembl BLAST	http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/Blast
ExAC Browser	http://exac.broadinstitute.org/
Fruitfly	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
GensearchNGS 1.6.58	PhenoSystems
HaploPainter 1.043	http://haploPainter.sourceforge.net/index.html
Hbond Score	https://www2.hhu.de/rna/html/hbond_score.php
Human Splicing Finder v3.1	http://www.umd.be/HSF3/HSF.shtml
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
NEB T _m Calculator	https://tmcalculator.neb.com/#!/main
OMIM	https://www.omim.org/
Osteogenesis Imperfecta Variant Database	https://oi.gene.le.ac.uk/home.php?select_db=COL1A2
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Primer3plus	https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi
QuantStudio™ Real-Time PCR	Applied Biosystems
SIFT	http://sift.jcvi.org/
UCSC Genome Browser	https://genome.ucsc.edu/
UniProt	http://www.uniprot.org/

2.2 Allgemeine Methoden

Die wichtigsten molekulargenetischen Standardmethoden innerhalb dieser Arbeit werden im Folgenden beschrieben. Methoden wie Gelelektrophorese, Restriktionsverdau, Transformation, Plasmid Präparation und Quantifizierung von Nukleinsäuren werden allerdings nicht weiter ausgeführt.

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Durch Oligonukleotid-Primer begrenzte DNA-Abschnitte können mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) amplifiziert werden (MULLIS *et al.* 1986). Eine PCR besteht aus drei sich zyklisch wiederholenden Schritten: Denaturierung, Primerhybridisierung und Synthese. Die in einem Zyklus entstehenden PCR Produkte dienen im folgenden Zyklus wiederum als Matrize, wodurch eine exponentielle Amplifikation des entsprechenden DNA-Abschnitts erreicht wird. Für diese Arbeit wurden die DNA-Polymerasen Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs; NEB) und Platinum Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet. Als Template DNA dienten humane gDNA sowie humane und Zebrafisch cDNA. Durch Gelelektrophorese wurde der Erfolg der PCR überprüft.

a) Standard PCR für Klonierungen

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten oder von vollständig kodierenden Gensequenzen, die in ein Plasmid inkloniert wurden, wurde die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) verwendet.

25 µl Ansatz	Komponenten
5 µl	5x Q5 Reaktions-Puffer
4,5 µl	dNTPs [je 2,5 mM]
1,25 µl	Primer fwd [10 µM]
1,25 µl	Primer rev [10 µM]
0,5 µl	Q5 Polymerase
auf 25 µl	ddH ₂ O
+ 1-3 µl Template DNA (1 µl gDNA [50 ng/µl], 2-3 µl cDNA)	

Für das Thermocycler Programm wurde die Primerhybridisierungstemperatur wie vom Hersteller empfohlen über NEB T_m Calculator berechnet.

Thermocycler Bedingungen:

Temp.	Zeit	Zyklen
98°C	30 s	
98°C	10 s	
50-72°C	10 s	30x
72°C	20 s pro kb	
72°C	2 min	
10°C	∞	

b) Standard PCR vor Sequenzierungen

10x Ammoniumpuffer 75 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,8); 2,64 g Ammoniumsulfat; 500 µl 20% Tween-20; auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen

5x Puffer B 4 ml 10x Ammoniumpuffer, je 80 µl von 100 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 1,76 ml 50 mM Magnesiumsulfat; 8 ml Enhancer (Invitrogen); 19,2 ml ddH₂O

Für die Bestätigung von NGS detektierten Varianten, die Sequenzierung der *SMAD6* Kohorte oder die Analyse von cDNA durch Sanger Sequenzierung wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte zuvor durch PCR amplifiziert, um ein optimales Sequenziererergebnis zu erhalten. Hierfür wurde die Platinum Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet.

14,8 µl Ansatz	Komponenten
12,5 µl	5x Puffer B
0,5 µl	Primer fwd [10 µM]
0,5 µl	Primer rev [10 µM]
0,3 µl	Platinum Taq Polymerase
+ 1-3 µl Template DNA (1 µl gDNA [50 ng/µl], 2-3 µl cDNA)	

Thermocycler Bedingungen:

Temp.	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	
95°C	30 s	
62°C	30 s	3x
72°C	30 s	
95°C	30 s	
59°C	30 s	3x
72°C	30 s	
95°C	30 s	
56°C	30 s	30x
72°C	30 s	
72°C	5 min	
10°C	∞	

2.2.2 Sanger Sequenzierung

Die von Frederik Sanger in den 1970er Jahren etablierte Methode zur Bestimmung der Basenabfolge der DNA basiert auf dem Kettenabbruch-Prinzip (SANGER AND COULSON 1975). Der Reaktionsansatz gleicht einem PCR Ansatz, mit dem Unterschied, dass nur ein Primer eingesetzt wird und der Reaktion zusätzlich Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) hinzugefügt werden. Diesen ddNTPs fehlt die 3'Hydroxygruppe, wodurch nach ihrem Einbau keine weitere Synthese durch die DNA-Polymerase mehr möglich ist. Hier erfolgt der namensgebende Abbruch der Synthese, der statistisch an jeder Basenposition stattfindet. Heutzutage sind die ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Die Ermittlung der Sequenz erfolgt durch

die kapillarische Auftrennung der Fragmente und Anregung der Fluoreszenz-Farbstoffe in einer Sequenzier-Plattform.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PCR Produkte als Sequenzier-Templates verwendet. Die PCR Ansätze wurden für ein optimales Sequenziererergebnis vor ihrer Verwendung enzymatisch aufgereinigt. Durch Exonuklease I (Exo, Affymetrix) wird einzelsträngige DNA verdaut und durch Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Affymetrix) werden nicht verwendete Nukleotide dephosphoryliert.

7,6 µl Ansatz	Komponenten
1,5 µl	PCR Produkt
0,3 µl	Exo [10 U/µl]
0,3 µl	SAP [1 U/µl]
5,5 µl	ddH ₂ O

Thermocycler Bedingungen:

Temp.	Zeit
37°C	30 min
85°C	15 min
98°C	3 min
10°C	∞

Anschließend wurden zu diesem Ansatz die weiteren Komponenten der Sequenzierreaktion hinzu pipettiert. Bei der Komponente BigDye® Terminator (Applied Biosystems) handelt es sich um einen vorgefertigten Mix aus DNA-Polymerase, dNTPs und Fluoreszenz markierten ddNTPs.

11,1 µl Ansatz	Komponenten
7,6 µl	ExoSAP Ansatz
0,5 µl	Primer fwd oder rev [10 µM]
2 µl	5x Sequenzierpuffer
1 µl	BigDye® Terminator Mix

Thermocycler Bedingungen:

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

Die bei der Kettenabbruch-Reaktion entstandenen DNA-Fragmente wurden durch Ethanolpräzipitation für die Sequenzierplattform vorbereitet. Alkohol und einfach geladene Salze bewirken ein Ausfallen der DNA aus einer wässrigen Lösung, die dann durch Zentrifugation pelletiert werden kann. Zu jedem Sequenzieransatz wurde folgender Ansatz hinzu pipettiert.

14 µl Ansatz	Komponenten
2 µl	3 M Natriumacetat pH 5,2
2 µl	100 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8,0
10 µl	ddH ₂ O

Danach wurde 60 µl eiskalter 100% Ethanol hinzugegeben, der Ansatz kurz gevortext und die Proben für 5 min bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das DNA-Pellet mit 180 µl 70% Ethanol gewaschen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 5-10 min luftgetrocknet. Nach der Resuspension der Pellets in 35 µl HiDi-Formamid (Applied Biosystems) wurden die Proben auf der Sequenzierplattform ABI 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) analysiert. Bei einer Probenanzahl >24 wurden die Proben mit Hilfe eines Janus Roboters (PerkinElmer) gefällt und anschließend sequenziert.

2.3 Spezielle Methoden

Im Folgenden werden die Methoden vergleichende Genomhybridisierung und Next Generation Sequencing, die verwendet wurden, um die Kranio Kohorte molekulargenetisch zu untersuchen, erläutert. Des Weiteren werden einige Methoden beschrieben, mit denen funktionelle Analysen durchgeführt wurden.

2.3.1 *In vitro* Spleißanalyse durch Minigen-Konstrukte

Für die Bewertung von NGS detektierten Varianten stehen eine Vielzahl von bioinformatischen Programmen zur Verfügung. Die Programme Fruitfly und HBond sowie die Spleißvorhersage Funktion der Software Alamut (Interactive Biosoftware) wurden beispielsweise verwendet, um den Einfluss einer Sequenz Variante auf das Spleißen der prä-mRNA vorherzusagen. Eine tatsächliche Aussage über einen Einfluss lässt sich jedoch nur durch die Überprüfung der Patienten mRNA treffen. Steht hierfür keine erneute periphere Blutprobe des Patienten zur Verfügung oder das Gen wird nicht im Blut exprimiert, so kann alternativ mit einem sogenannten Minigen-System eine *in vitro* Spleißanalyse durchgeführt werden. Für diese Arbeit wurde für solche Analysen der Vektor pSPL3b (erhalten von AG Gessler, Anhang G) verwendet. Dieser beinhaltet einen Spleißdonor und einen Spleißakzeptor, die durch eine intronische Sequenz getrennt sind. Diese beiden artifiziellen Exons werden in dieser Arbeit mit Exon A und B benannt. Im Intron Bereich befindet sich eine multiple Klonierungsstelle, in welche die zu analysierenden DNA-Abschnitte eingebracht werden können. Einkloniert wird das Exon mit der betroffenen Spleißstelle und umgebende intronische Sequenzen. Wenn möglich sollten die intronischen Abschnitte größer als 60 bp sein (DESVIAT *et al.* 2012). Sofern die Intron Größen es

zulassen, können auch mehrere Exons eines Gens eingebracht werden. Dies spiegelt eher die *in vivo* Situation wider. Gleichzeitig wird als Kontrolle ein Konstrukt mit der wildtypischen Sequenz erstellt. Es folgt die Transfektion in eine Zelllinie und die Analyse der entstandenen Spleißprodukte. Im Folgenden werden die Einzelschritte ausführlicher erläutert.

a) Erstellung der Minigen-Konstrukte

Für potentielle Spleißvarianten der Gene *MEGF8* und *TCF12* wurde das *in vitro* Spleißsystem durchgeführt. Die entsprechenden Exons mit umgebenden Intronsequenzen wurden nach dem Standardprotokoll der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, siehe 2.2.1 a) amplifiziert. Die Primer Sequenzen können dem Anhang A entnommen werden. Männliche Referenz-DNA (Agilent) und die entsprechenden Patienten gDNAs dienten als Template. In beiden Fällen konnten die PCR Produkte über die Restriktionsstellen der Restriktionsenzyme XhoI (NEB) und BamHI (NEB) in den Vektor pSPL3b inkloniert werden. Die Minigen-Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung mit den Vektor-spezifischen Primern SD6 und SA2 verifiziert. Die Vektorkarten der Konstrukte befinden sich im Anhang G.

b) Zellkultur und Transfektion

Die Zelllinien HEK293T (humane embryonale Nierenzellen) und U2OS (humane Osteosarcoma-Zellen) wurden für die *in vitro* Spleißanalyse verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Nährmedium wurde DMEM (Sigma-Aldrich) mit 10% FCS (fötales Kälberserum, Sigma-Aldrich) verwendet. Am Vortag der Transfektion wurde die Konzentration der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und in eine 6-Well-Platte 4x10⁵ Zellen in einem Volumen von 2 ml je Well ausgesät. Am darauffolgenden Tag fand vor der Transfektion, sofern eine Zelldichte von 50-80% je Well vorlag, ein Mediumwechsel statt. Als Transfektionsreagenz wurde FuGENE®6 (Roche) im Verhältnis von 3:1 (FuGENE µl : DNA µg) verwendet. In je 100 µl DMEM wurden 2 µg des pSPL3b Leervektors bzw. der Vektor-Konstrukte verdünnt. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 6 µl FuGENE zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise in jeweils ein Well der 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert.

c) RNA Isolation, cDNA Synthese und Analyse

Für die RNA Isolation wurden die adhärenierten Zellen abgelöst, in 2 ml Medium aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 1000 xg. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 ml 1x DPBS (PAN-Biotech) resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das entstandene Pellet mit 700 µl QIAzol Lysis Reagenz (Qiagen) versetzt und für 1 min gevortext. Anschließend erfolgte

die RNA Isolation mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die RNA wurde mit 35 µl Reinstwasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Im Anschluss erfolgte die Synthese der cDNA aus der RNA durch eine Reverse Transkriptase. Hierfür wurde das Kit *High-Capacity RNA-to-cDNA™* (Applied Biosystems) verwendet. Als Primer sind in diesem Kit sowohl zufällige Oktamer- als auch oligo d(T)-Primer enthalten.

<u>20 µl Ansatz</u>	<u>Komponenten</u>
10 µl	2x RT Puffer
bis zu 9 µl	RNA (bis zu 2 µg)
1 µl	20x RT Enzym Mix

Thermocycler Bedingungen:

<u>Temp.</u>	<u>Zeit</u>
37°C	90 min
95°C	5 min
10°C	∞

Zur Analyse der entstandenen Spleißprodukte wurde eine PCR mit den Vektorprimern SD6 und SA2 und der cDNA als Template durchgeführt. Die PCR Produkte wurden zum einen über Gelelektrophorese und zum anderen durch Sequenzierung analysiert. Hierbei fand ein Vergleich des wildtypischen Konstrukts mit dem Konstrukt, das die Sequenzvariante des Patienten enthielt, statt.

2.3.2 RNA Isolation aus Blutproben

10x Erythrozyten Lysis Puffer 155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA-Na₂;
mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen und bei 4°C lagern

Zur Überprüfung detektierter Varianten bzw. deren Effekte auf mRNA Ebene wurde RNA aus Blutproben der entsprechenden Patienten isoliert. Es ließ sich sowohl aus EDTA-Vollblut als auch aus Heparin-Vollblut erfolgreich RNA isolieren. Die Erythrozyten wurden hierfür im ersten Schritt durch einen hypotonischen Puffer lysiert. Es wurde 2,5 ml Vollblut mit 45 ml 1x Lysis Puffer versetzt und für 15 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Bei erfolgreicher Lyse wird die zuvor trübe Lösung klarer. Die Lösung wurde für 5 min bei 4°C und 500 xg zentrifugiert. Die intakten Leukozyten wurden als weißes Pellet sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml 1x DPBS resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Hierfür wurde der Überstand erneut abgenommen, das Pellet in 2 ml 1x DPBS resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4°C und 500 xg zentrifugiert. Zur Lyse und Homogenisierung der Leukozyten wurde das Pellet mit 700 µl QIAzol Lysis Reagenz (Qiagen) versetzt und für 1 min gevortext. Anschließend erfolgte die RNA Isolation mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die RNA wurde mit 35 µl Reinstwasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Im Anschluss erfolgte die

Synthese der cDNA wie unter 2.3.1 c) beschrieben. Die Analyse der cDNA erfolgte durch Sequenzierung (siehe 2.22).

2.3.3 Mikroarray basierte vergleichende Genomhybridisierung (Array-CGH)

Mit der vergleichenden Genomhybridisierung (CGH) lassen sich chromosomale Veränderungen, wie Verlust und Zugewinn von genetischem Material, genomweit nachweisen. Mit der konventionellen Methode fand hierbei eine gleichzeitige Hybridisierung von Patienten gDNA und Referenz-DNA, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzmolekülen markiert waren, auf Referenz Metaphase Chromosomen statt. Durch das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten entlang eines Chromosoms ließen sich chromosomale Veränderungen identifizieren (KALLIONIEMI *et al.* 1992). Die Auflösung dieser konventionellen CGH ist jedoch begrenzt auf 5-10 Mb. Eine höhere Auflösung wurde durch die Weiterentwicklung dieser Methode, die so genannte Array-CGH, erreicht (SOLINAS-TOLDO *et al.* 1997; PINKEL *et al.* 1998). Hierbei findet die Hybridisierung nicht mehr mit Metaphase Chromosomen statt, sondern mit auf einen Glasträger aufgebrachte 25-85-mer Oligonukleotiden, die das gesamte Genom abdecken. Der Glasträger wird als Mikroarray und die DNA-Fragmente der Hybridisierungsmatrix als Probes bezeichnet. Die Auflösung der Array-CGH ist abhängig von der Anzahl der Probes und ihrer Verteilung über das Gesamtgenom und liegt bei < 100 kb. Der Vorteil der Array-CGH liegt darin, dass innerhalb eines Experiments mikroskopische und submikroskopische Kopienzahlveränderungen des Gesamtgenoms detektiert werden können und als Ausgangsmaterial gDNA ausreichend ist. Balancierte Translokationen, Inversionen oder Polyploidien können mit dieser Methode jedoch nicht nachgewiesen werden.

Der Ablauf der Methode ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt. Es werden gleiche Mengen an Patienten gDNA und Referenz-DNA des passenden Geschlechts mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cyanin3 und Cyanin5 (Cy3/Cy5) markiert (Abb. 2.2 A) und auf dem Mikroarray kohybridisiert (Abb. 2.2 B). Hierbei erfolgt die Zugabe von Cot-1 DNA. Diese unmarkierte repetitive DNA dient dem Blocken von repetitiven Sequenzen der Zentromere und Telomere. Durch vorherige Denaturierung liegen die DNAs einzelsträngig vor und können sich an die Probes der Hybridisierungsmatrix anlagern. Sind bei der Patienten gDNA im Vergleich zur Referenz-DNA chromosomale Veränderungen vorhanden, so führt dies zu einer Änderung im Hybridisierungsverhältnis an den entsprechenden Oligonukleotiden. Folglich ändern sich auch die Fluoreszenzsignale. Die Fluoreszenzsignale werden von einem Laserscanner detektiert (Abb. 2.2 C) und durch eine Software zu einem genomischen Profil verrechnet, das ausgewertet und bewertet werden kann (Abb. 2.2 D + E).

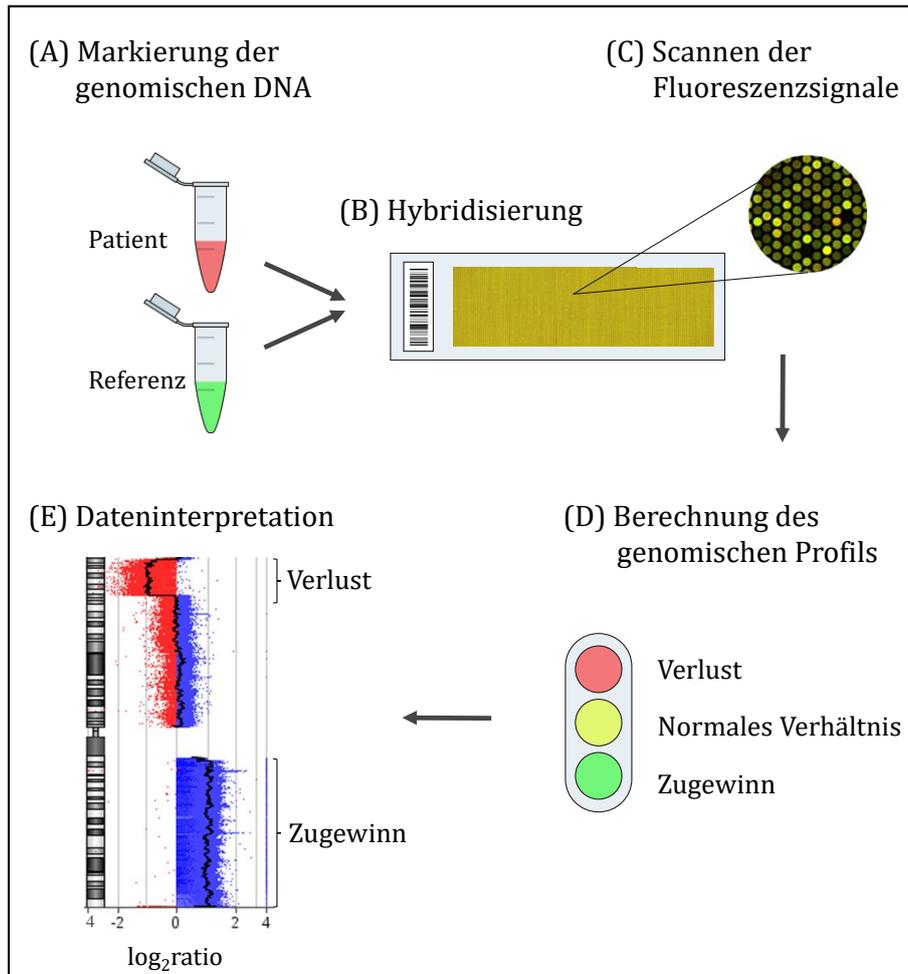


Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf einer Array-CGH. A Referenz- und Patienten gDNA werden Fluoreszenz-markiert. B Es folgt die Hybridisierung beider DNAs mit den Proben auf dem Mikroarray. C Die Fluoreszenzsignale werden anschließend gescannt. D+E Mit den Scans wird durch eine Software das genomische Profil berechnet. Grundlage hierfür ist das Mischverhältnis der Fluoreszenzsignale, das Rückschlüsse auf unterschiedliche Mengen in den beiden DNA-Proben gibt. Ist der berechnete $\log_2\text{ratio}$ Wert 0, so liegt kein Unterschied zwischen Referenz und Patient vor, negative Werte bedeuten ein Verlust und positive Werte ein Zugewinn in der Patienten gDNA. Die Interpretation der Daten erfolgt anschließend über einen Abgleich mit Datenbanken.

In dieser Arbeit wurden zur Analyse der gDNA von Kraniosynostose Patienten hochauflösende 1M Oligonukleotid Arrays (Agilent) verwendet. Ausgangsmaterial waren je 1,5 μg hochqualitativer gDNA und Referenz-DNA in 26 μl Reinstwasser. Diese wurden zusammen mit je 5 μl der randomisierten Primer für 10 min bei 98°C denaturiert. Der Ansatz wurde kurz auf Eis inkubiert und anschließend mit 19 μl des Markierungsansatzes gemischt. Patienten-DNAs wurden immer mit Cy5, Referenz-DNAs mit Cy3 fluoreszenzmarkiert. Die Reaktion wurde im Thermocycler inkubiert.

19 μl Ansatz	Komponenten
10 μl	5x Reaktionspuffer
5 μl	10x dNTPs
3 μl	Cyanin3 dUTP / Cyanin5 dUTP
1 μl	Exo(-)Klenow

Thermocycler Bedingungen:

Temp.	Zeit
37°C	2 h
65°C	10 min
4°C	∞

1x TE-Puffer pH 8,0 10 mM Tris-Cl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)

Für die Aufreinigung der markierten DNAs wurden die Ansätze mit 430 µl 1x TE-Puffer gemischt, auf eine Säule gegeben und für 10 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen, die Säule mit 480 µl 1x TE-Puffer gewaschen und die Zentrifugation wiederholt. Zur Elution der gereinigten Probe wurde die Säule umgedreht in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 1.000 xg zentrifugiert. Das Probenvolumen wurde mit 1x TE-Puffer auf 80,5 µl eingestellt. Der Erfolg der Markierungsreaktion wurde durch nanophotometrische Messung der DNA- und Fluorophor-Konzentration überprüft. Jeweils 79 µl der Patienten- und Referenz-DNA wurden anschließend miteinander gemischt. Zu dem DNA-Ansatz wurde der Hybridisierungsmix gegeben, der Cot-1 DNA enthält.

<u>362 µl Ansatz</u>	<u>Komponenten</u>
50 µl	Cot-1 DNA [1 mg/ml]
52 µl	10x aCGH Blocking Agent
260 µl	2x Hybridisierungspuffer

Die Hybridisierungsreaktion wurde für 3 min bei 98°C denaturiert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Von der Reaktion wurden 490 µl auf einen Glaträger in der Hybridisierungskammer pipettiert, der Glaträger mit der Hybridisierungsmatrix ohne Luftpfeinschlüsse aufgelegt und die Kammer verschlossen. Die Hybridisierungskammer wurde für 40 h bei 65°C und 20 rpm in einem Hybridisierungssofen (SHEL LAB) inkubiert. Anschließend wurden die Glaträger entnommen und im Waschpuffer 1 (Agilent) getrennt. Der erste Waschschrift des hybridisierten Glaträgers erfolgte im Waschpuffer 1 für 5 min bei RT, der zweite im auf 37°C erwärmten Waschpuffer 2 (Agilent) für 1 min. Durch langsames Herausziehen aus dem Puffer wurde der Objektträger getrocknet. Anschließend wurde der Glaträger in einem Laserscanner (NimbleGen MS200, Roche) mit 2 µm Auflösung gescannt. Die Berechnung des genomischen Profils erfolgte mit der Software CytoGenomics (Agilent) mit folgenden Filtereinstellungen: 5 Probes und $\log_2\text{ratio}=0.29$. Die detektierten Kopienzahlveränderungen wurden anschließend einzeln auf ihre klinische Relevanz bewertet. Die genomischen Bereiche wurden im UCSC Browser betrachtet und die Verknüpfungen zu den Datenbanken DGV und DECIPHER verwendet. In DGV sind Daten über häufige benigne CNVs hinterlegt. Ein CNV mit einer hohen Frequenz in der Population hat sehr wahrscheinlich keinen

kausalen Zusammenhang mit dem Phänotyp des Patienten. Die Datenbank DECIPHER hingegen ermöglicht einen Abgleich der Daten mit denen von anderen Patienten. Im Optimalfall sind auch klinische Informationen und das Ergebnis einer parentalen Analyse hinterlegt. CNVs in nicht kodierenden Bereichen wurden noch mit dem ECR Browser betrachtet. Hierbei werden die Genome von sequenzierten Genomen verschiedener Spezies auf konservierte Region hin analysiert und diese grafisch dargestellt. Evolutionär konservierte Bereiche sind häufig ein Indiz für Regulatorregionen. Zusätzlich wurden alle analysierten Patientenproben untereinander verglichen und so häufig auftretende Aberrationen als klinisch nicht relevant eingestuft.

2.3.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Validierung und die Analyse der Segregation von Array-CGH Ergebnissen erfolgte durch quantitative Echtzeit-PCR (qPCR). Hierbei kann durch DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe die Menge der entstehenden PCR-Produkte quantitativ bestimmt werden. Mit jedem Amplifikationszyklus nimmt die detektierbare Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Es wird ein Schwellenwert für das Fluoreszenzsignal festgelegt, dessen Erreichung abhängig ist von der eingesetzten DNA-Menge. Liegt eine Duplikation vor, so wird dieser Wert schneller, bei einer Deletion langsamer erreicht als bei der Referenz-DNA. Somit lassen sich Kopienzahlveränderungen durch qPCR nachweisen. Des Weiteren wurde qPCR auch zur Expressionsanalyse von *MEGF8* in peripherem Blut verwendet.

Für jede Kopienzahlveränderung wurden Primerpaare erstellt, die sowohl innerhalb als auch außerhalb der mit Array-CGH detektierten Aberration lagen. Für das Primerdesign wurde das Online Programm Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.* 2012) mit folgenden Einstellungen verwendet: Produktgröße: 80-90 bp, Primerlänge: 18-22 bp, Schmelztemperatur: 58-62°C, und maximale Mononukleotidwiederholung: 3. Die Überprüfung der Primer auf ihre Individualität innerhalb des humanen Genoms erfolgte durch die BLAST Funktion des Genombrowsers *Ensembl*. Zusätzlich wurde für die endogene Kontrolle ein Primerpaar für das autosomale Haushaltsgen *Albumin (ALB)* erstellt. Des Weiteren diente ein Amplikon in dem X-chromosomalen Gen *Faktor VIII (F8)* der Kontrolle des Geschlechts. Die Primersequenzen können dem Anhang A entnommen werden. Als Kalibrator wurde immer weibliche Referenz-DNA (Agilent) verwendet. Für die Expressionsanalyse wurde RNA aus peripheren Blutproben isoliert (2.3.2.). In die cDNA Synthese wurden 1,5 µg der RNA in ein 20 µl Reaktionsansatz eingesetzt (2.3.1.c). Von der cDNA wurden 0,25 µl mit 3,75 µl dH₂O versetzt und als Template für die qPCR Analyse verwendet. Es wurden Primerpaare für *MEGF8* und die Haushaltsgene *GAPDH* und *RPLPO* erstellt.

Jedes Primerpaar wurde als Triplikat des folgenden Ansatzes pipettiert:

10 μ l Ansatz	Komponenten
4 μ l	gDNA [2,5 ng/ μ l] /cDNA
3 μ l	ddH ₂ O
2 μ l	5x HOT FirePol Eva Green Plus
1 μ l	Primer-Mix [je 3,3 pmol/ μ l]

qPCR Bedingungen:

Temp.	Zeit	Zyklen
95°C	15 min	
95°C	15 s	
60°C	20 s	40x
72°C	20 s	

Die Messung und anschließende Schmelzkurvenbestimmung erfolgte in dem qPCR System ViiA™ 7 (Applied Biosystems). Mit Hilfe der Software QuantStudio™ v1.3 (Applied Biosystems) wurde die relative Quantifizierung (RQ-Werte) mit der $\Delta\Delta$ Ct Methode durchgeführt.

2.3.5 Next Generation Sequencing

Die Sequenz des menschlichen Genoms wurde 2003 veröffentlicht. Das *Human Genom Project* benötigte 13 Jahre und 3 Milliarden US-Dollar für die vollständige Sequenzierung mit der Sanger Methode. Die Sequenziertechnik der sogenannten ersten Generation erlaubte lediglich die Sequenzierung von Einzelfragmenten, sodass am Tag nur ca. 100 kb mit einem Gerät analysiert werden konnten. Darauf folgende Sequenziertechniken werden unter dem Begriff *Next Generation Sequencing* (NGS) zusammengefasst. Im Gegensatz zur Sanger Methodik ermöglichen NGS Techniken eine massive parallele Sequenzierung von Millionen verschiedener DNA Fragmenten, sodass eine Sequenzierung des humanen Genoms innerhalb weniger Tage möglich ist. Im hohen Durchsatz, der gesteigerten Geschwindigkeit und den sich dadurch ergebenden verringerten Kosten liegen die Vorteile im Vergleich zu Sanger Sequenzierung. Mit den neuen Techniken ergaben sich viele Anwendungsmöglichkeiten. Neben Exom- und Genomsequenzierung kann unter anderem auch die Analyse von DNA-Methylierung und RNA Sequenzierung erfolgen. In dieser Arbeit lag der Fokus jedoch auf dem sogenannten *Targeted Sequencing*. Hierbei werden nur bestimmte Zielsequenzen aus dem Genom angereichert und sequenziert. Es gibt sowohl vorgefertigte Gen Panels zu bestimmten Krankheiten wie beispielsweise Krebs oder Herzerkrankungen; als auch die Möglichkeit eine eigene Auswahl an Genen festzulegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein individuelles Gen Panel für Kraniosynostose und andere Skelettfehlbildungen erstellt. Die Anreicherungschemikalien für die Zielsequenzen wurden von den Firmen Illumina und Agilent bezogen. Die anschließende Sequenzierung erfolgte auf dem MiSeq Sequenziergerät von Illumina. Im Folgenden werden die Schritte a) Design des Panels, b) Probenanreicherung, c) Sequenzierung auf dem MiSeq und d) Auswertung der Sequenzierdaten einzeln beschrieben.

a) Design Kraniosynostose Panel

Die erste Version des Kraniosynostose Panels wurde mit der Software DesignStudio von Illumina erstellt. Es umfasst 65 Gene und drei nicht-kodierende Regulatorbereiche. Dabei handelt es sich sowohl um häufige und seltene Kraniosynostose Gene wie *FGFR1-3* oder *MEGF8*, als auch um Gene wie *SHH* und *TBX3*, die mit anderen Skelettfehlbildungen assoziiert sind. Zusätzlich wurden Gene aus assoziierten Signalwegen wie z.B. *ERK1* oder *RALDH1* mit analysiert. Eine Auflistung der Gene mit Transkriptnummern und OMIM Nummern befindet sich im Anhang C.1. Die drei Regulatorregionen sind: *BMP2* Enhancer (OMIM 112261) assoziiert mit Brachydaktylie Typ A2, *IHH* Regulator assoziiert mit Kraniosynostose Typ Philadelphia (OMIM 185900) und *ZPA* regulatorische Sequenz (ZRS, OMIM 605522) assoziiert mit Polydaktylie. Nachdem das Anreicherungs-kit *Nextera Rapid Capture* für diese Version aufgebraucht war, wurde das Design des Kranio Panels modifiziert und aktualisiert. Dies erfolgte mit der Software SureDesign von Agilent. Die zweite Version orientierte sich an der von Twigg und Wilkie veröffentlichten Kraniosynostose Genliste (TWIGG AND WILKIE 2015). Gene aus assoziierten Signalwegen wurden durch neue und seltene Kraniosynostose Gene ersetzt, sodass die zweite Version 67 Gene und die drei Regulatorregionen beinhaltet. Alle Gene sind im Anhang C.2 gelistet. Bei beiden Designs wurden die Sonden für die Zielgene so gewählt, dass UTR-Bereiche, Exon Sequenzen und ca. 100 bp der Intron Sequenzen angereichert und sequenziert werden. Zusätzlich sollten alle Sonden überlappen. Die Abdeckung der Zielsequenzen mit Sonden wurde im UCSC Browser überprüft.

b) Probenanreicherung

Die Anreicherung der Zielsequenzen in der Patienten DNA erfolgte entweder durch das *Nextera Rapid Capture* Kit (Illumina) oder durch das *SureSelect^{QXT}* Kit (Agilent) und wurde jeweils nach Herstellerangaben ausgeführt. Bei beiden Panel Kits handelt es sich um die gleiche Anreicherungsmethodik, lediglich die Abfolge der einzelnen Schritte variiert. Für die Erstellung der DNA-Bibliothek wurden pro Patient jeweils 50 ng gDNA eingesetzt und 12 Patientenproben parallel angereichert und in einem Lauf sequenziert. Abbildung 2.3 zeigt schematisch den Ablauf der Anreicherung mit dem *Nextera Rapid Capture* Kit. Im ersten Schritt wird die gDNA durch Transposasen zufällig in ca. 300 bp große Fragmente zerschnitten. Dabei erfolgt gleichzeitig eine Ligation von spezifischen Adapter Sequenzen an beiden Enden der Fragmente (Abb. 2.3 A). Um das parallele Sequenzieren von 12 Patienten zu ermöglichen, werden über PCR Amplifikation für jede Patientenprobe individuelle Barcode Sequenzen angefügt (Abb. 2.3 A). In der späteren Datenanalyse ist dadurch eine Zuordnung der Sequenzen möglich. Nach dem Poolen aller Proben werden diese in Einzelstränge denaturiert (Abb. 2.3 B) und mit Biotin markierten Sonden hybridisiert (Abb. 2.3 C). Die Sonden sind in diesem Fall komplementär zu den Zielsequenzen des Kranio Panels. Über magnetische Streptavidin Beads werden die

hybridisierten Regionen herausgefiltert, sodass nach einem Waschschriff und der Elution von den Beads nur die DNA Fragmente der Zielsequenzen noch vorhanden sind (Abb. 2.3 D). Um die Anreicherungsspezifität dieser Fragmente zu erhöhen, werden die Schritte C bis E wiederholt. Anschließend erfolgt eine PCR Amplifikation und Aufreinigung. Die erhaltene DNA-Bibliothek wird dann denaturiert, auf 8 pM verdünnt, mit 10% PhiX Bibliothek versetzt und anschließend sequenziert. PhiX dient als Qualitätskontrolle für die Sequenzierung.

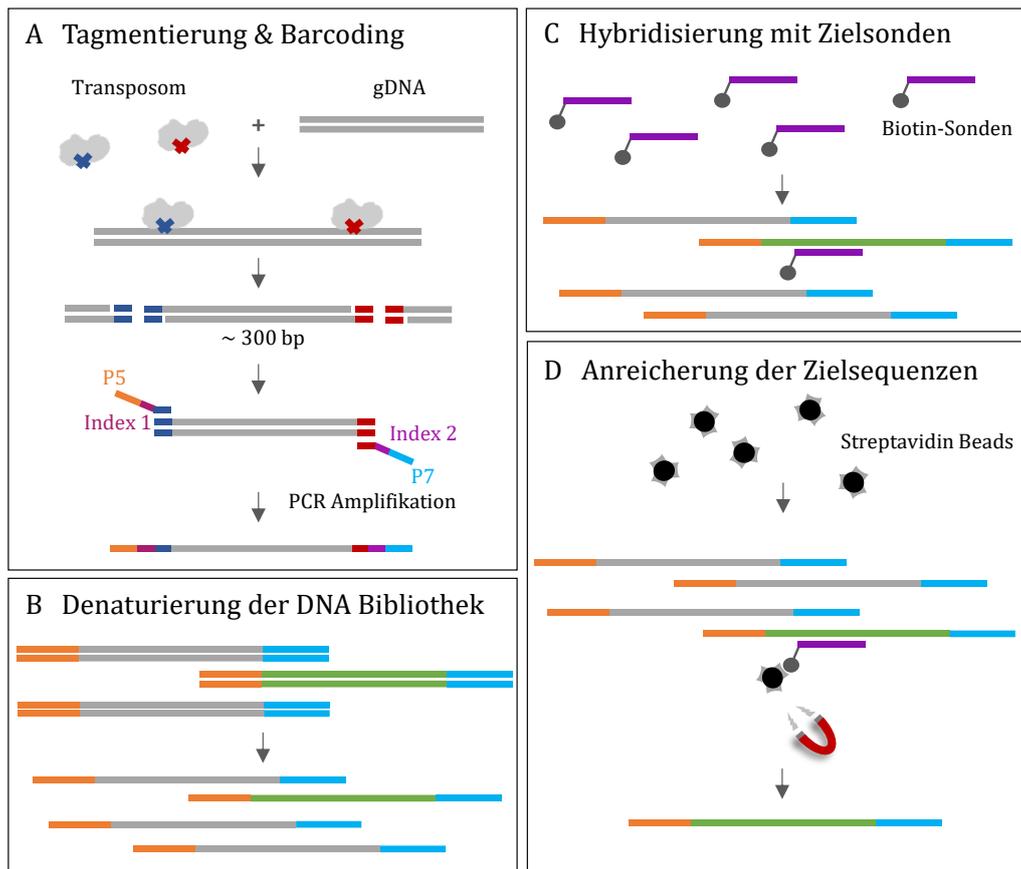


Abbildung 2.3: Übersicht über die Anreicherungsschritte des Nextera Rapid Capture Kits (Illumina). A Transposasen schneiden die gDNA zufällig in ca. 300 bp Fragmente und fügen Adaptersequenzen an. Jede Probe wird über PCR mit einem individuellen Barcode versehen. B Die 12 Patientenproben werden gemischt und denaturiert. C Komplementäre Biotin Sonden hybridisieren mit den Zielsequenzen. D Über magnetische Streptavidin Beads werden die Zielfragmente herausgefiltert und anschließend von den Sonden eluiert.

c) Sequenzierung auf dem MiSeq Sequenziergerät

Für die Sequenzierung auf dem MiSeq wurde das *MiSeq Reagent Kit v2* (Illumina) nach Angaben des Herstellers verwendet. Mit diesen Sequenzierchemikalien können auf dem MiSeq bei einer Sequenzlänge von 2x 150 bp bis zu 5,1 Gb Sequenzierdaten generiert werden. Innerhalb des Gerätes gelangt die denaturierte DNA-Bibliothek auf einen Glasobjektträger (engl. *Flow Cell*). Dort binden die Adaptersequenzen der DNA Fragmente an komplementäre *forward* und *reverse* Oligos auf der Oberfläche der *Flow Cell* (Abb. 2.4 A). Es folgt eine klonale Amplifikation der DNA Fragmente über PCR ähnliche Schritte. Dieses Prinzip der Generierung von Bereichen mit

identischen Molekülen (engl. *cluster*) auf der *Flow Cell* wird Brücken Amplifikation (engl. *bridge-amplification*) genannt (Abb. 2.4 B-E).

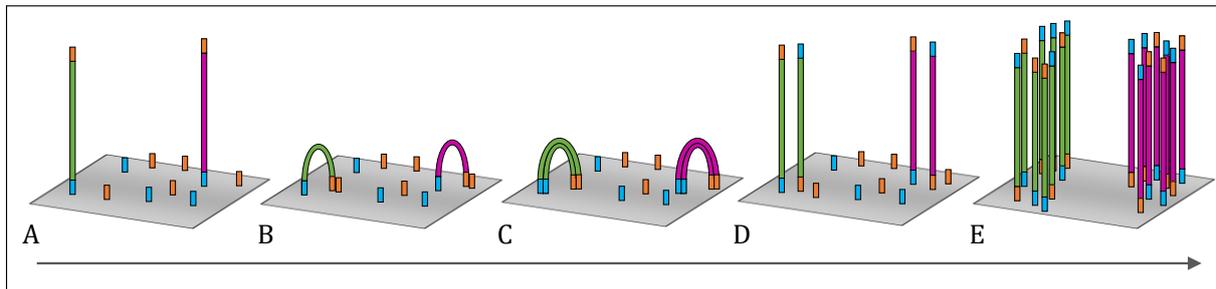


Abbildung 2.4: Prinzip der Cluster Generierung. **A** Die angereicherten Zielsequenzen binden über Adapter an komplementäre Oligos an die Oberfläche der *Flow Cell*. **B** Die freien Enden der DNA Fragmente können nun ebenfalls an benachbarte Oligos binden, sodass ein DNA-Bogen bzw. -Brücke entsteht. **C** Es folgt die Synthese des komplementären Strangs. Dieser Schritt wird Brücken Amplifikation genannt. **D** Durch ein Denaturierungsschritt liegen erneut Einzelsträngige Fragmente vor. **E** Schritte B-D werden so oft wiederholt bis Bereiche mit identischen Molekülen generiert wurden.

Die anschließende Sequenzierung erfolgt nach dem *Sequencing-by-Synthesis* Prinzip. Hier kommen reversible Terminator-dNTPs zum Einsatz. Jede der vier DNA Basen ist mit einem anderen Fluoreszenzmolekül markiert. Das Fluoreszenzsignal des eingebauten Nukleotids wird detektiert und anschließend das Fluoreszenzmolekül und die Terminatorgruppe abgespalten, sodass im darauffolgenden Zyklus das nächste Nukleotid eingebaut werden kann. Im Folgenden wird für die bei der Sequenzierreaktion entstehenden DNA Abschnitte die englische Bezeichnung *Reads* verwendet. Das DNA Fragment wird von beiden Seiten sequenziert (engl. *paired-end*). Diese Methode erzeugt zwar kürzere Reads (100-250 bp), allerdings werden dadurch Sequenzierfehler reduziert und sorgt damit für genauere Daten.

d) Datenanalyse und Varianten Klassifizierung

Das Alignment der Sequenzierdaten mit dem humanen Referenzgenom (GRCh37/hg19) erfolgte entweder mit der Software MiSeq Reporter (Illumina) auf dem Sequenziergerät oder der Software GensearchNGS (Phenosystems). Im MiSeq Reporter wurden die Voreinstellungen für das Alignment verwendet, in GensearchNGS wurde die erlaubte Fehlerrate auf 6 und die maximale indel-Länge auf 12 gesetzt. Die Variantenfilterung erfolgte in allen Fällen mit GensearchNGS. Folgende Einstellungen zur Variantenidentifikation werden als Standardfilter bezeichnet: Abdeckung der Variante > 5 Reads, Balance aus *forward* und *reverse* Reads für die Variante > 0, Allelhäufigkeit (engl. *minor allele frequency*; MAF) ≤ 1%, Exondistanz ≤ 25 bp und Ausschluss von Varianten in der 5' und 3'UTR. Die erhaltenen Varianten wurden mit der Populationsdatenbank Exome Aggregation Consortium (ExAC), der dbSNP Datenbank sowie den Mutationsdatenbanken Human Gene Mutation Database (HGMD®) und ClinVar abgeglichen. Eine Bewertung von nicht-synonymen Varianten (engl. *missense*) erfolgte mit den Vorhersageprogrammen SIFT, MutationTaster und PolyPhen-2. Varianten, die kanonische

Spleißstellen betreffen, wurden mit der Spleißvorhersage Funktion der Software Alamut und den Programmen Fruitfly und HBond analysiert. Aufgrund der aufgeführten Analysen wurden die Varianten nach den ACMG Richtlinien und IARC Empfehlungen klassifiziert (PLON *et al.* 2008; RICHARDS *et al.* 2015): Klasse I = benigne, Klasse II = wahrscheinlich benigne, Klasse III = Variante mit unklarer Relevanz, Klasse IV = wahrscheinlich pathogene Variante und Klasse V = pathogene Variante. In wenigen Fällen wurde die CNV Analysefunktion von GensearchNGS verwendet, um Hinweise auf Deletionen oder Duplikationen zu erhalten. Hierbei wird die durchschnittliche Abdeckung der Zielsequenzen des jeweiligen Patienten mit der von mehreren anderen Patienten innerhalb des gleichen Laufs verglichen.

2.3.6 *in-situ* Hybridisierung

Eine Methode zum Nachweis von spezifischen Nukleinsäuren (RNA oder DNA) in Geweben, Zellen oder auf Chromosomen ist die *in-situ* Hybridisierung (ISH). Hierbei hybridisiert eine komplementäre Sonde (RNA oder DNA), die beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder Digoxigenin (DIG) markiert ist, mit der spezifischen Nukleinsäure. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode angewandt um Genexpressionsmuster von möglichen Kraniosynostosegenen im Tiermodell *Danio rerio* zu untersuchen. Des Weiteren wurde Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) zur Bestätigung von Array-CGH Ergebnissen und zur strukturellen Analyse der chromosomalen Aberrationen genutzt.

a) ISH auf *Danio rerio* Embryonen

<u>Hybridisierungspuffer</u>	25 ml Formamid; 12,5 ml 20x SSC; 250 µl 20% Tween-20; 150 µl Heparin [50 mg/ml]; 250 mg Torula RNA; auf 50 ml mit ddH ₂ O auffüllen
<u>PBST</u>	5,8 g NaCl; 145 mg KCl; 1 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 150 mg KH ₂ PO ₄ ; 5 ml 20% Tween-20; auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen und steril filtrieren
<u>20x SSC</u>	175,3 g NaCl; 88,2 g Tris-Na-Citrat-Dihydrat; auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen
<u>2x SSCT</u>	10 ml 20x SSC; 500 µl 20% Tween-20; auf 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen
<u>Färbepuffer</u>	1 ml 5 M NaCl; 5 ml 1 M Tris-Cl (pH 9,5); 250 µl 20% Tween-20; auf 50 ml mit ddH ₂ O auffüllen

Zur Analyse der Genexpressionsmuster der Gene *fgf10a* und *huwe1* in Zebrafisch Embryonen wurden zunächst die spezifischen komplementären RNA Sonden, sogenannte *antisense* Riboproben, hergestellt. Als Negativkontrolle wurden auch *sense* Riboproben erstellt. Hierfür wurden ca. 300-500 bp große Abschnitte der jeweiligen kodierenden Sequenz nach dem Standardprotokoll der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, siehe 2.2.1 a) amplifiziert. Die

Primer Sequenzen können dem Anhang A entnommen werden. Als Template wurde Zebrafisch cDNA aus einem Stadienmix verwendet. Die erhaltenen PCR Produkte wurden aufgereinigt und anschließend eine Addition von Adenin Überhängen an beide Enden der PCR Produkte mit der Mango Taq Polymerase (Bioline) nach folgendem Ansatz durchgeführt.

<u>50 µl Ansatz</u>	<u>Komponenten</u>
20 µl	PCR Produkt
10 µl	5x Puffer Mango
1,5 µl	50 mM MgCl ₂
1 µl	10 mM ddATP
0,5 µl	Mango Taq Polymerase
17 µl	ddH ₂ O

Die Ansätze wurden für 20 min bei 72°C inkubiert. Mit dem TA-Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) wurden die PCR Produkte nach Herstellerangaben in das PCRII Plasmid eingebracht. Die Kontrolle der Sequenz und der Orientierung innerhalb des Plasmids erfolgte durch Sequenzierung mit den M13fwd und M13rev Primern (Anhang A). Die Vektorkarten der Konstrukte befinden sich im Anhang G. Die pCRII Plasmide wurden für die Herstellung der *antisense* bzw. *sense* Sonden jeweils mit den Restriktionsenzymen HindIII bzw. EcoRV (NEB) linearisiert. Die Plasmide wurden anschließend aufgereinigt und als Template für die *in vitro* Transkription der Riboproben durch die RNA Polymerasen Sp6 und T7 verwendet. Die *fgf10a* Sonden wurden mit DIG (Roche), die *huwe1* Sonden mit Fluorescein (FLU, Roche) markiert.

<u>20 µl Ansatz</u>	<u>Komponenten</u>
1 µg	linearisiertes Plasmid
2 µl	DIG/FLU RNA labeling Mix
0,5 µl	RNase Inhibitor
2 µl	10x Transkriptionspuffer
1 µl	RNA Polymerase (Sp6/T7)
auf 20 µl	ddH ₂ O

Die Ansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert bevor zu jedem Ansatz 1 µl RQ DNase zum Verdau des Templates hinzugegeben wurde. Die Reaktion wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und die RNA Sonden anschließend mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 50 µl Reinstwasser eluiert. Die Qualität der Sonden wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert. Danach wurden die Riboproben mit 100 µl Hybridisierungspuffer gemischt und bei -20°C gelagert.

Die *nac*^{-/-}*tra*^{-/-} Zebrafisch Embryonen wurden dechorionisiert, mit 4% Paraformaldehyd (PFA) über Nacht fixiert und bei -20°C in 100% Methanol gelagert. Vor der Verwendung für eine ISH müssen diese über eine Methanol/PBST-Reihe (75%; 50%; 25%) jeweils 5 min rehydriert und abschließend zweimal in steril filtriertem (s.f.) PBST gewaschen werden. Damit die RNA Sonden in das Gewebe eindringen können, erfolgte ein Verdau mit Proteinase K (Stocklösung [10 mg/ml]; verwendet 5 µl in 2 ml PBST) für 24 hpf Embryonen für 4 min und für 48 bzw.

52 hpf Embryonen für 8 min bei RT. Durch zweimaliges Waschen mit 1x Glycerin wurde der Verdau gestoppt. Die Embryonen wurden mit 4% PFA für 20 min fixiert und anschließend 5x für je 5 min mit s.f. PBST gewaschen. Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wurden diese danach in 1 ml Hybridisierungspuffer bei 65°C im Wasserbad für 1 h inkubiert. Währenddessen wurden die RNA Sonden 1:100 mit Hybridisierungspuffer verdünnt und für 10 min bei 80°C erhitzt. Nach der Vorinkubation der Embryonen wurde der Puffer durch 500 µl der Sonden Verdünnung ausgetauscht und über Nacht bei 65°C im Wasserbad hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgenommen und die Embryonen durch folgenden Schritte bei 65°C gewaschen: zweimal 30 min in 50% Formamid/2x SSCT, 30 min in 2x SSCT und zweimal 30 min in 0,2x SSCT. Abschließend wurden sie in PBST aufgenommen und für 1 min bei RT inkubiert. Mit 5% Schafserum in PBST erfolgte das Blocken für 1 h auf dem Schüttler bei RT. Zur Probendetektion wurde die Lösung durch 400 µl einer anti-DIG bzw. anti-FLU Fab-Fragment Verdünnung (1:3000) ersetzt. Die Antikörper Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Nach Abnahme des Antikörpers folgten sechs Waschschritte mit PBST für jeweils 20 min und zweimaliges Waschen mit dem Färbepuffer für je 5 min bei RT auf dem Schüttler. Die Embryonen wurden mit einer NBT/BCIP-Färbelösung (1 ml Färbepuffer + 20 µl NBT/BCIP) für bis zu 24 h unter Lichtausschluss bei RT gefärbt. Die Färbung wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBST gestoppt. Die Aufnahmen der gefärbten Embryonen erfolgten an einem Stereomikroskop. Anschließend wurden die Embryonen in 100% Methanol bei -20°C gelagert.

b) FISH auf humanen Metaphasechromosomen

<u>Pepsin-Lösung</u>	40 ml 0,01 N HCl; 40 µl 10%ige Stocklösung
<u>20x SSC</u>	175,3 g NaCl; 88,2 g Tris-Na-Citrat-Dihydrat; auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen und pH 7,0 einstellen
<u>4% Formaldehyd-Lösung</u>	4,32 ml 37% Formaldehyd; 190 mg MgCl ₂ ; auf 40 ml mit 1x DPBS auffüllen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde FISH auf humane Metaphasechromosomen angewandt, um die durch Array-CGH detektierten chromosomalen Aberrationen zu bestätigen und strukturell zu analysieren. Das Anlegen und die Aufarbeitung der Blutkulturen wurde von der zytogenetischen Diagnostik des humangenetischen Instituts durchgeführt. Die aufgearbeitete Lösung von in Methanol:Eisessig (3:1) fixierten Patienten-Zellen wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Diese Suspension wurde anschließend mit einer Glaspipette auf einen eiskalten und mit Propanol/Salzsäure vorbehandelten Objektträger aufgetropft und luftgetrocknet. Dann folgte ein zweiminütiger Waschschritt in 2x SSC bei 37°C. Um die Zugänglichkeit der Sonden an die Chromosomen zu verbessern, wurde ein Verdau der chromosomalen Proteine in einer Pepsinlösung für 10 min bei 37°C durchgeführt. Dieser wurde durch Inkubation des Objektträgers in 1x DPBS (PAN-Biotech) für 5 min bei RT gestoppt. Die Nachfixierung erfolgte 5

min in einer 4% Formaldehydlösung bei RT. Der Objektträger wurde dann 5 min in PBS gewaschen und in einer Ethanolreihe (70%; 85%; 100%; jeweils 1 min) dehydriert und anschließend luftgetrocknet. Die folgende Denaturierung der Hybridisierungs sonden und der Chromosomen unterschied sich je nach verwendeter Sonde. Für die 5q und 8q Subtelomer-Sonden (Kreatech) wurde je 1 µl Sonde mit 8 µl Hybridisierungspuffer gemischt und für 10 min bei 90°C denaturiert. Für die entsprechenden Objektträger erfolgte die Denaturierung für 2,5 min in 70% Formamid/PBS bei 72°C mit anschließender Ethanolreihe (70%; 85%; 100%; jeweils 1 min). Nach der Lufttrocknung wurde die Hybridisierungslösung auf den Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas und Fixogum (Marabu) luftdicht verschlossen. Für die Hybridisierung mit den Sonden des TeloMark Mix 02 (CytoCell) und 17q (Kreatech) wurden 3 µl des Sondenmix mit 1 µl der 17q Subtelomer-Sonde gemischt. Die Sondenmischung und der Objektträger wurden 5 min auf einer Heizplatte bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung auf den Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas und Fixogum luftdicht verschlossen und für 2 min bei 75°C auf einer Heizplatte denaturiert. Die Objektträger wurden über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer hybridisiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Deckglas entfernt und der Objektträger gewaschen: 2 min in 0,4x SSC 72°C und 30 sec in 2x SSC/0,05% Tween-20. Auf den Objektträger wurden 20 µl Vectashield® mit DAPI pipettiert, mit einem Deckglas eingedeckt und 10 min bei 4°C entwickelt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop.

2.3.7 Mikroinjektion von mRNA in *Danio rerio* Embryonen

Die durch Array-CGH detektierten Duplikationen können viele Gene betreffen und zu einer Überexpression dieser Gene führen. Dies wiederum kann dann zu dem Phänotyp des Patienten führen. Eine Möglichkeit um den potentiellen Effekt einer Überexpression eines Kandidatengens zu untersuchen ist die Injektion von *in vitro* erstellter mRNA in die erste Zelle des Zebrafisch Embryos. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies mit dem Gen *FGF10* durchgeführt.

a) Herstellung der *fgf10a* RNA

Für die Erstellung der mRNA wurde zunächst die kodierende Sequenz des Zebrafisch Orthologs *fgf10a* nach dem Standardprotokoll der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, siehe 2.2.1 a) amplifiziert. Die Primer Sequenzen können dem Anhang A entnommen werden. Als Template wurde Zebrafisch cDNA aus einem Stadienmix verwendet. Die erhaltenen PCR Produkte wurden aufgereinigt und anschließend Adenin Überhänge wie unter 2.3.5 a) beschrieben angefügt. Mit dem TA-Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) wurden die PCR Produkte nach Herstellerangaben in das pCRII Plasmid zwischenkloniert. Das erhaltene pCRII Konstrukt sowie der Zielvektor pCS2 (Addgene) wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI (NEB) verdaut. Das erhaltene *fgf10a*-Fragment wurde über Gelelektrophorese mit dem *GenElute™ Gel Extraction Kit*

(Sigma-Aldrich) aufgereinigt. Der geschnittene pCS2 Vektor wurde dephosphoryliert, aufgereinigt und anschließend mit dem *fgf10a*-Fragment ligiert. Die Orientierung und Sequenz der entstandenen Vektoren wurden durch Sequenzierung mit den Primern Sp6 und M13rev kontrolliert. Die Vektorkarten befinden sich im Anhang G. Das pCS2_*fgf10a* Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym NotI (NEB) linearisiert und als Template für die *in vitro* mRNA Synthese eingesetzt. Die *in vitro* Transkription wurde mit dem *mMESSAGE mMACHINE Sp6* Kit (Invitrogen) nach folgendem Ansatz durchgeführt:

<u>20 µl Ansatz</u>	<u>Komponenten</u>
1 µg	linearisiertes Plasmid
2 µl	10x Reaktionspuffer
10 µl	2x NTP-Mix
2 µl	RNA Polymerase Sp6
auf 20 µl	ddH ₂ O

Die Reaktion wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Zum Verdau der Template DNA wurde danach 1 µl DNase hinzugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die gepappte mRNA wurde mit dem *RNeasy Mini* Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 50 µl Reinstwasser eluiert. Die Qualität wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert und die Konzentration nanophotometrisch bestimmt.

b) Mikroinjektion der RNA

Die Injektionslösung bestand aus der erstellten mRNA, Phenol-Rot und Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran. Phenol-Rot (Roth) diente hierbei der optischen Kontrolle der injizierten Menge. FITC-Dextran (Sigma-Aldrich) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der es ermöglicht nach der Injektion zu kontrollieren, ob die Lösung von der Zelle aufgenommen wurde. Die Konzentration der mRNA in der Lösung betrug 100 ng/µl.

<u>10 µl Ansatz</u>	<u>Komponenten</u>
2,5 µl	mRNA [40 ng/µl]
0,5 µl	Phenol-Rot [3% in H ₂ O]
0,5 µl	FITC-Dextran [20 mg/ml]
6,5 µl	ddH ₂ O

Die Mikroinjektionen wurden nach den Beschreibungen von Stuart und Westerfield durchgeführt (STUART *et al.* 1988; WESTERFIELD 1995). Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurde die Lösung über eine dünne Injektionsnadel in *nac*^{-/-}/*tra*^{-/-} Zebrafisch Embryonen, die sich im 1-Zell-Stadium befanden, injiziert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Injektion in die erste Zelle oder direkt unter dieser erfolgte. Unter einem Fluoreszenzmikroskop konnte durch das injizierte FITC-Dextran nach ein paar Stunden der Erfolg der Injektion kontrolliert werden und Embryonen, die die Lösung nicht aufgenommen haben, aussortiert werden. Die Entwicklung der Embryonen sowie nicht-injizierter Kontrollen erfolgte bei 28°C. Morphologische Untersuchungen und Dokumentation dieser erfolgte durch ein Stereomikroskop zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

3. ERGEBNISSE

Durch Array-CGH und das Kranio NGS Genpanel wurden 83 gDNA Proben von Kraniosynostose Patienten analysiert. Sofern eine mögliche genetische Ursache identifiziert werden konnte, wurde in den meisten Fällen eine Validierung mit einer anderen Methode oder funktionelle Analysen durchgeführt. Für ein Teilprojekt wurde eine weitere Kohorte bestehend aus 96 Patienten erstellt, die eine vorzeitige Fusion der Frontal- und/oder Sagittalnaht zeigten. Bei diesen wurde eine Sanger Sequenzierung des *SMAD6* Gens sowie eines intergenischen Einzelnucleotid Polymorphismus (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) 345 kb von dem Gen *BMP2* entfernt (*BMP2* Risikoallele) durchgeführt.

3.1 Array-CGH Analysen

Von den 83 Kraniosynostose Patienten der Kohorte wurde die gDNA von 33 Patienten zunächst durch Array-CGH auf chromosomale Veränderungen untersucht. Hierbei handelt es sich um 13 Patienten mit isolierter Kraniosynostose und 20 Patienten mit syndromaler Kraniosynostose. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die gefundenen und als (potentiell) pathogen eingestuften Aberrationen. Im Folgenden werden die einzelnen Fälle genauer vorgestellt.

Tabelle 3.1: Übersicht der Patienten mit (potentiell) pathogenen chromosomalen Veränderungen

Patienten ID	Kraniosynostose	weitere klinische Auffälligkeiten	Array-CGH Ergebnis
CRA_1/_2	koronar	-	Del 15q21.3
CRA_10	sagittal	+	Dup 5p15.1-p12
CRA_32	koronar, lambda	+	Del 2q37.3-qter; Dup 5q35.2-5qter
CRA_35	koronar	+	Dup 2q34-qter; Del 17q25.3
CRA_58	multiple	+	Dup 5q34-qter; Del 8p23.3-pter
CRA_59	multiple	+	Del 7q21.13-q21.3

+:ja; -:nein; Del: Deletion; Dup: Duplikation

3.1.1 Verlust 15q21.3

Die Patienten CRA_1 und CRA_2 sind Zwillinge, die beide eine Kraniosynostose aufweisen. An klinischer Information lag vor, dass bei Patient CRA_2 ein beidseitiger Verschluss der Koronarnähte bestand und eine Operation durchgeführt wurde. Sein Zwillingsbruder CRA_1 hat eine unilaterale Koronarnahtsynostose, die nicht operativ korrigiert wurde. Die Eltern zeigen keine kraniofazialen Auffälligkeiten.

Exon 8 und 10 von *FGFR2*, Exon 7 von *FGFR3* und *TWIST1* wurden durch das humangenetische Diagnostiklabor untersucht. Die klassischen Kraniosynostose Syndrome Crouzon Syndrom, Saethre-Chotzen Syndrom sowie Muenke Syndrom wurden dadurch ausgeschlossen. Im Rahmen einer *TCF12* Sequenzierungsstudie, durchgeführt von I. Köblitz, wurde bei den Zwillingen eine homozygote Variante (c.5A>G, p.Y2C) mit unklarer Signifikanz detektiert. Die Veränderung betrifft das alternative, verkürzte Transkript NM_207040. Eine Segregationsanalyse zur weiteren Bewertung der Variante wurde durchgeführt (Abb. 3.1). Die Mutter zeigte an dieser Position die wildtypische Sequenz homozygot, der Vater war heterozygot c.5A>G. Die homozygote Variante der Zwillinge ließ sich durch die Segregationsanalyse nicht erklären. Ein Mutationsereignis an identischer Stelle als Keimbahnmosaik bei der Mutter oder eine Deletion auf dem maternalen Allel wären die möglichen Erklärungen.

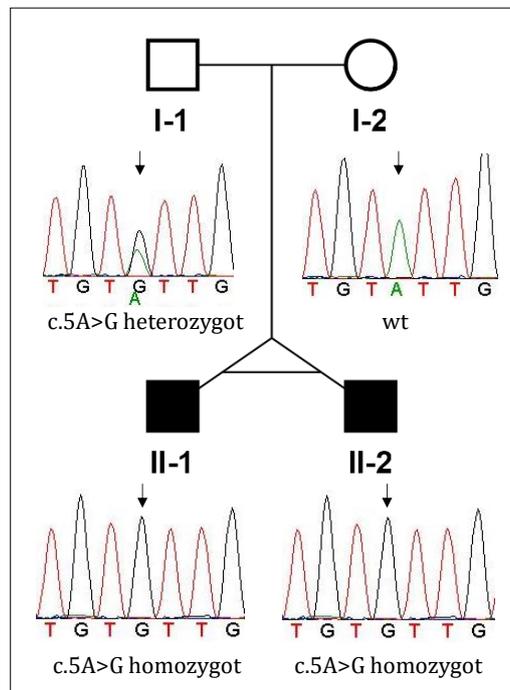


Abbildung 3.1: Stammbaum und Segregationsanalyse der Familie CRA_1/2. Unter jedem Familienmitglied ist das jeweilige Elektropherogramm aus der Sequenzierung des sogenannten alternativen Exon 9A des *TCF12* Transkripts NM_207040 dargestellt. Die Position c.5 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Zwillinge sind homozygot und der Vater heterozygot für die Variante c.5A>G. Die Mutter zeigt die wildtypische Sequenz.

Daraufhin wurden die Brüder in die Kraniosynostose Kohorte aufgenommen und mit der gDNA von Patient CRA_1 eine Array-CGH durchgeführt. Als klinisch relevante Aberration wurde eine ca. 183 kb Deletion auf Chromosom 15 eingestuft (Abb. 3.2 A, [arr[hg19] 15q21.3(57,414,955-57,601,502)x1]). Diese heterozygote Deletion betrifft die Exons 6-21 des *TCF12* Gens (Abb. 3.2 A rechts) und erklärt so die homozygot erscheinende Variante. Die Datenbank DECIPHER ergab 12 Patienten, die überlappende Deletionen für diesen DNA-Abschnitt besitzen. Alle Deletionen sind als potentiell pathogen eingestuft, heterozygot und deutlich größer (>500 kb) als die von Patient CRA_1 (Anhang E).

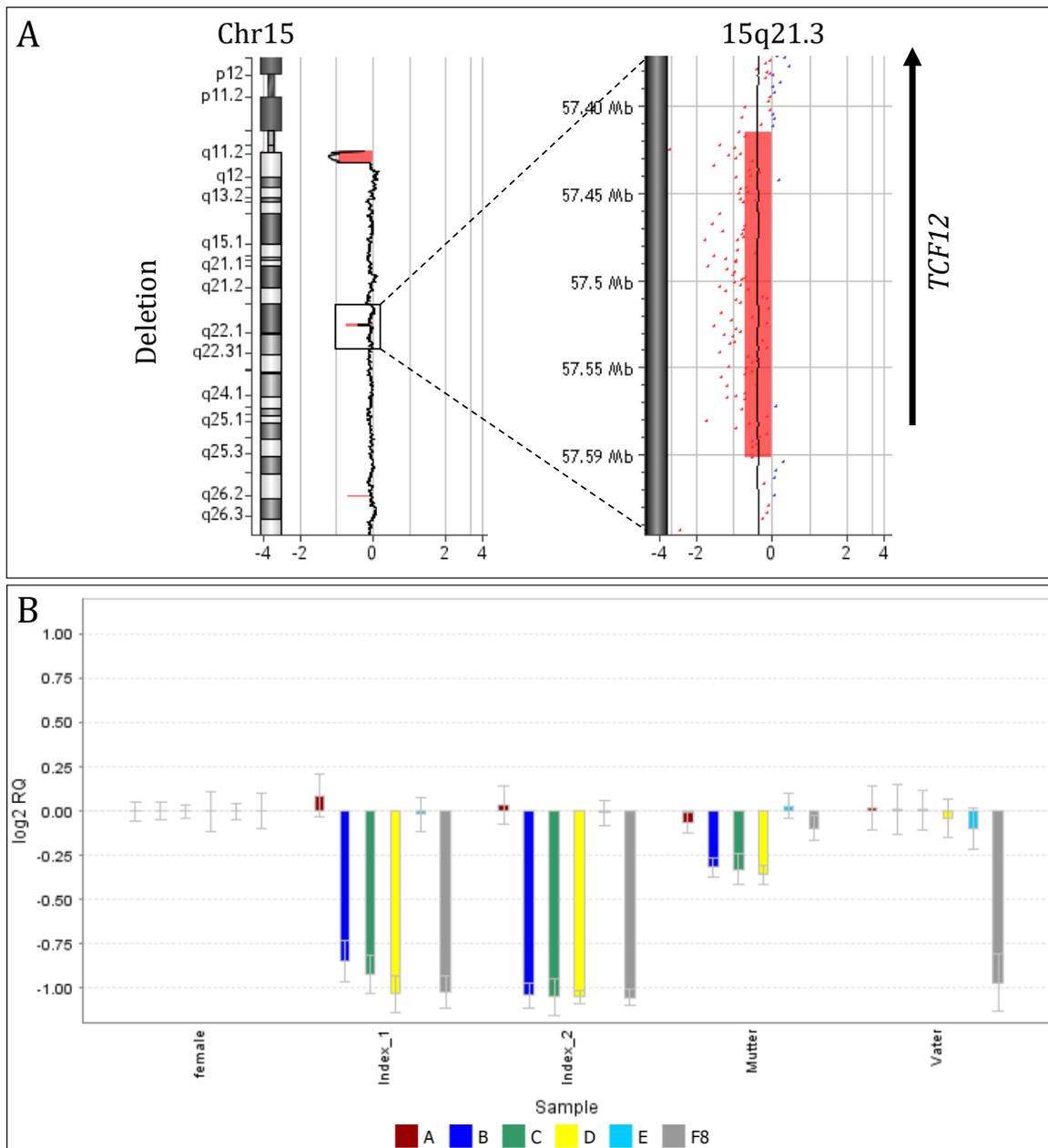


Abbildung 3.2: Array-CGH Profil und qPCR Ergebnis der Patienten CRA_1 und CRA_2. **A** Log₂ratio Profil von Chromosom 15. Eine ca. 183 kb große, heterozygote Verlust (roter Balken), der teilweise das Gen *TCF12* (schwarzer Pfeil) betrifft, wurde detektiert. **B** Auswertung der qPCR. Die Amplikons A und E liegen außerhalb der Aberration, Amplikons B, C und D innerhalb. Das Amplikon F8 dient der Kontrolle des Geschlechts. Die erhaltenen C_v-Werte wurden mit der endogenen Kontrolle *ALB* verrechnet und zur weiblichen Kontroll-DNA (*female*) ins Verhältnis gesetzt. Die erhaltenen RQ-Werte sind logarithmisch als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Eine Reduktion der Kopienzahl für die Amplikons B, C und D liegt bei den Patienten CRA_1 und CRA_2 (Index_1 und Index_2) sowie der Mutter vor. Der Vater zeigt für diesen Bereich eine normale Kopienzahl.

Validierung

Um die exakte Größe der Deletion bei Patient CRA_1 zu bestimmen, wurde von I. Köblitz eine Bruchpunktbestimmung mittels PCR und Sequenzierung durchgeführt. Die Deletion ist 193 kb groß (GRCh37/hg19; chr15:57.413.085-57.606.267) und betrifft Exon 6 bis 21 von *TCF12* (NM_207037.1). Zur Bestätigung der detektierten Deletion in den Zwillingen wurde eine qPCR durchgeführt. Gleichzeitig wurden auch die gDNAs der Eltern analysiert, um zu untersuchen, ob

die Deletion *de novo* entstanden ist oder vererbt wurde. Hierfür wurden die Primerpaare A und E als Kontrollprimer außerhalb der Deletion gewählt. Die Amplikons B, C und D liegen innerhalb des deletierten Abschnitts (Primer Sequ. Anhang A). Für die endogene Kontrolle wurde ein Amplikon für das Haushaltsgen *ALB* und für die Kontrolle des Geschlechts das Primerpaar F8 für das X-chromosomale Gen *Faktor VIII (F8)* verwendet. Die Auswertung zeigt bei den Zwillingen (Index_1 und Index_2) für die Amplikons B, C und D eindeutig eine Reduktion in der Kopienzahl im Verhältnis zur weiblichen Kontroll-DNA (*female*) und bestätigt die durch Array-CGH detektierte heterozygote Deletion (Abb. 3.2 B). Bei der Mutter zeigt sich für diese Amplikons ebenfalls eine Reduktion, beim Vater jedoch eine normale Kopienzahl (Abb. 3.2 B). Dies lässt den Schluss zu, dass die Deletion über die Mutter an die Zwillinge vererbt wurde.

3.1.2 Zugewinn 5p15.1-p12

Eine vorzeitige Fusion der sagittalen Schädelnaht wurde bei Patient CRA_10 im Alter von drei Monaten festgestellt und anschließend chirurgisch behandelt. Eine hohe Stirn, Hypertelorismus, ein breiter Nasenrücken, Strabismus sowie ein dysplastisches, tief-sitzendes und rotiertes rechtes Ohr sind weitere kraniofaziale Auffälligkeiten. In seiner sprachlichen und psychomotorischen Entwicklung zeigte er sich leicht verzögert. Im Alter von 17 Jahren wurden zusätzlich noch Astigmatismus, überstreckbare Finger, muskuläre Hypotonie, leichtes Pectus carinatum, leichte Skoliose, Hyperlordose, Spondylarthrose sowie Osteoporose festgestellt. Bei ihm liegt eine Lernschwäche vor. Seine Eltern und seine Schwester haben keine bekannten klinischen Auffälligkeiten (Abb. 3.2).

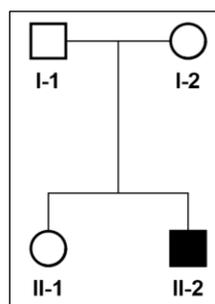


Abbildung 3.3: Stammbaum der Familie von Patient CRA_10 (II-2).

Vor der Aufnahme in die Kraniosynostose-Kohorte wurden Exon 5 von *FGFR1*, Exon 8 und 10 von *FGFR2* sowie Exon 7 von *FGFR3* der Patienten gDNA durch das humangenetische Diagnostiklabor analysiert und ein klassisches *FGFR* assoziiertes Kraniosynostose Syndrom ausgeschlossen. Innerhalb des Forschungsprojekts wurde dann eine Array-CGH Analyse durchgeführt. Nach Bewertung aller detektierter Kopienzahlveränderungen wurde ein Zugewinn auf Chromosom 5 als klinisch relevant eingestuft. Die 13,1 Mb große Duplikation von 5p15.1-p13.3 betrifft 7 Gene (Abb. 3.4 A). Bei genauer Betrachtung des Arrayprofils von 5p fällt

auf, dass das Profil in der proximal gelegenen Region bis zum Zentromer erhöht bleibt (Abb. 3.4 A links). Dies lässt vermuten, dass der Zugewinn größer sein könnte, als mit der Analyseeinstellung $\log_2\text{ratio} = 0,29$ detektierbar ist. Für eine erneute Analyse wurden die Kriterien auf $\log_2\text{ratio} = 0,15$ und Proben = 100 gesetzt. Durch Erhöhung der Probenanzahl auf 100 wurde verhindert, dass zu viele, klinisch irrelevante Aberrationen gelistet wurden. Die erneute Auswertung führte zu der Detektion einer proximal vergrößerten Duplikation auf dem p-Arm von Chromosom 5 (Abb. 3.4 B, [arr[hg19] 5p15.1p13.3(17,686,734-30,849,372)x3, 5p13.3p12(31,414,788-46,100,000)x~2-3]). Die insgesamt 28,4 Mb große Duplikation umfasst über 130 Gene, unter anderem *FGF10*.

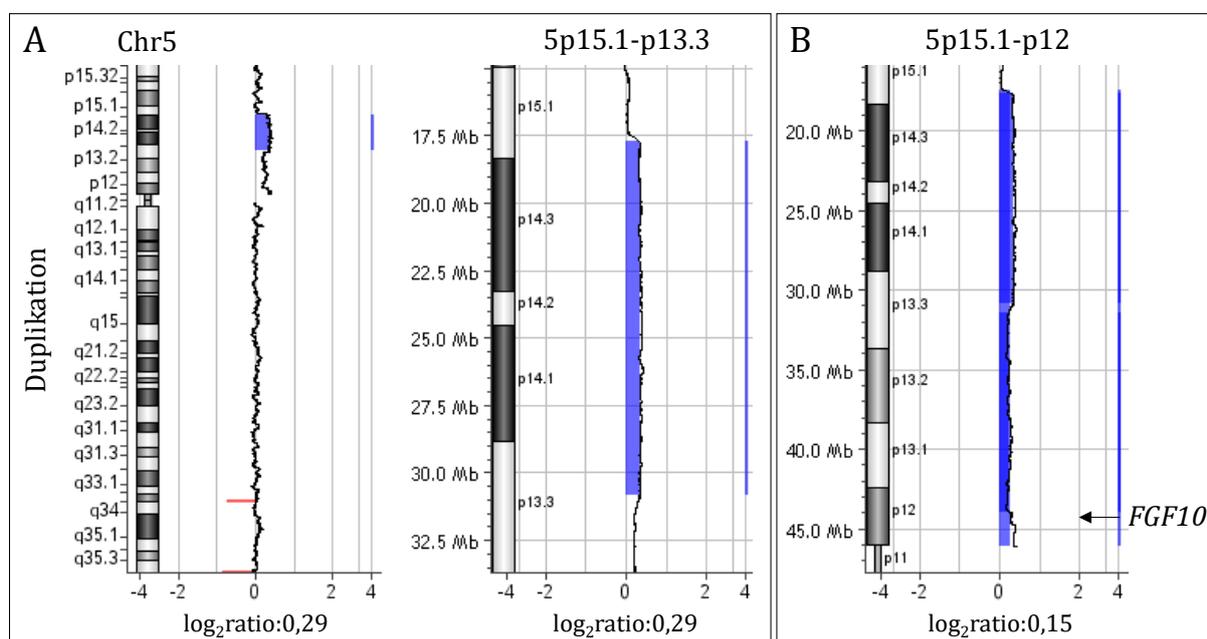


Abbildung 3.4: Array-CGH Profil von Chromosom 5 des Patienten CRA_10. A Profil mit Standardeinstellungen $\log_2\text{ratio} = 0,29$ und Proben = 5. Ein 13,1 Mb großer Zugewinn von 5p15.1-p13.3 (blauer Balken) wurde als klinisch relevant eingestuft. Bei genauer Betrachtung des Profils des 5p-Arms (linkes Panel) ist auffällig, dass das $\log_2\text{ratio}$ Profil proximal der detektierten Duplikation nicht auf einen Nullwert zurückfällt. **B** Profil mit Analyseeinstellungen $\log_2\text{ratio} = 0,15$ und Proben = 100. Durch die geänderten Analyse-Kriterien wurde ein deutlich größerer Zugewinn (28,4 Mb), der bis zum Zentromer reicht, detektiert. Die Position des *FGF10* Gens auf Chromosom 5 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

In der Datenbank DECIPHER sind 15 Patienten mit teilweise überlappenden 5p Trisomien ohne weitere klinisch relevante Aberration gelistet (Anhang E). Eine Analyse durch FISH zur Validierung und zur Untersuchung der strukturellen Anordnung der Duplikation, sowie die Analyse der Eltern war, aus Mangel an entsprechenden Blutproben nicht möglich. Aufgrund dessen wurden zu *FGF10* weitere Analysen im Modellorganismus Zebrafisch durchgeführt (siehe 3.4.2).

3.1.3 Verlust 2q37.3-qter und Zugewinn 5q35.2-qter

Patientin CRA_32 hat eine Kraniosynostose der Koronarnaht unilateral und der Lambdanaht, die im ersten Lebensjahr chirurgisch korrigiert wurde. Zusätzliche Auffälligkeiten sind Mikrozephalie, Plagiozephalie, Strabismus, breite Daumen, muskuläre Hypotonie und überstreckbare Gelenke. Kraniofazial zeigt sie milde Ptosis, nach außen abfallende Lidachsen, eine spitze Nase, ein flaches Philtrum, einen kleinen Mund mit einer dünnen Oberlippe sowie kleine, weit auseinander stehende Zähne. Ihre mentale und sprachliche Entwicklung ist verzögert. Ihre nicht miteinander verwandten Eltern und ihre Zwillingschwester sind gesund (Abb. 3.5).

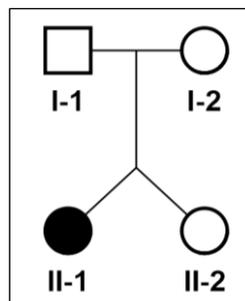


Abbildung 3.5: Stammbaum der Familie von Patientin CRA_32 (II-1).

Vor der Aufnahme in die Kraniosynostose-Kohorte wurden Sequenzierungen von *FGFR3* (nur Exon 7), *TWIST1* und *TCF12* durch das Diagnostiklabor des Instituts durchgeführt und zeigten wildtypische Sequenzen. Aufgrund der vielen zusätzlichen klinischen Merkmale wurde die gDNA mittels Array-CGH analysiert. Die Auswertung des Array Profils ergab zwei klinisch relevante Aberrationen. Ein 1,55 Mb großer, heterozygoter Verlust an genetischem Material von 2q37.3-qter, der 32 Gene umfasst und ein 7,85 Mb großer Zugewinn von 5q35.2-5qter (Abb. 3.6; [arr[hg19] 2q37.3(241,476,655-243,038,331)x1, 5q35.2q35.3(172,856,313-180,712,263)x3]). Mehr als 100 Gene sind von dem Zugewinn betroffen, darunter auch das mit Kraniosynostose assoziierte Gen *MSX2*. Ein Abgleich mit der Patienten-Datenbank DECIPHER ergab 56 Patienten, die überlappende 2q Monosomien besitzen. Diese sind jedoch meist deutlich größer (>3 Mb) und bei 22 Patienten liegt der Verlust gemeinsam mit einer weiteren chromosomalen Veränderung vor (Anhang E). Bei keinem Patienten jedoch ist zusätzlich ein Zugewinn auf Chromosom 5 vorhanden. Ein Vergleich partiellen Trisomie von Patientin CRA_32 mit der DECIPHER Datenbank ergab 50 Patienten mit überlappenden Trisomien, die jedoch größtenteils deutlich kleiner (<1 Mb) als der hier detektierte Zugewinn sind (Anhang E). Bei 7 dieser Patienten liegt ein Zugewinn des *MSX2* Gens vor (DECIPHER IDs: 282073, 273674, 285499, 280719, 282379, 278114, 284051). Aufgrund der bei Patientin CRA_32 vorliegenden Kombination von zwei terminalen Aberrationen (Zugewinn und Verlust) kann man von einer unbalancierten Translokation ausgehen. Für eine Bestätigung durch FISH stand keine entsprechende Blutprobe der Patientin zur Verfügung.

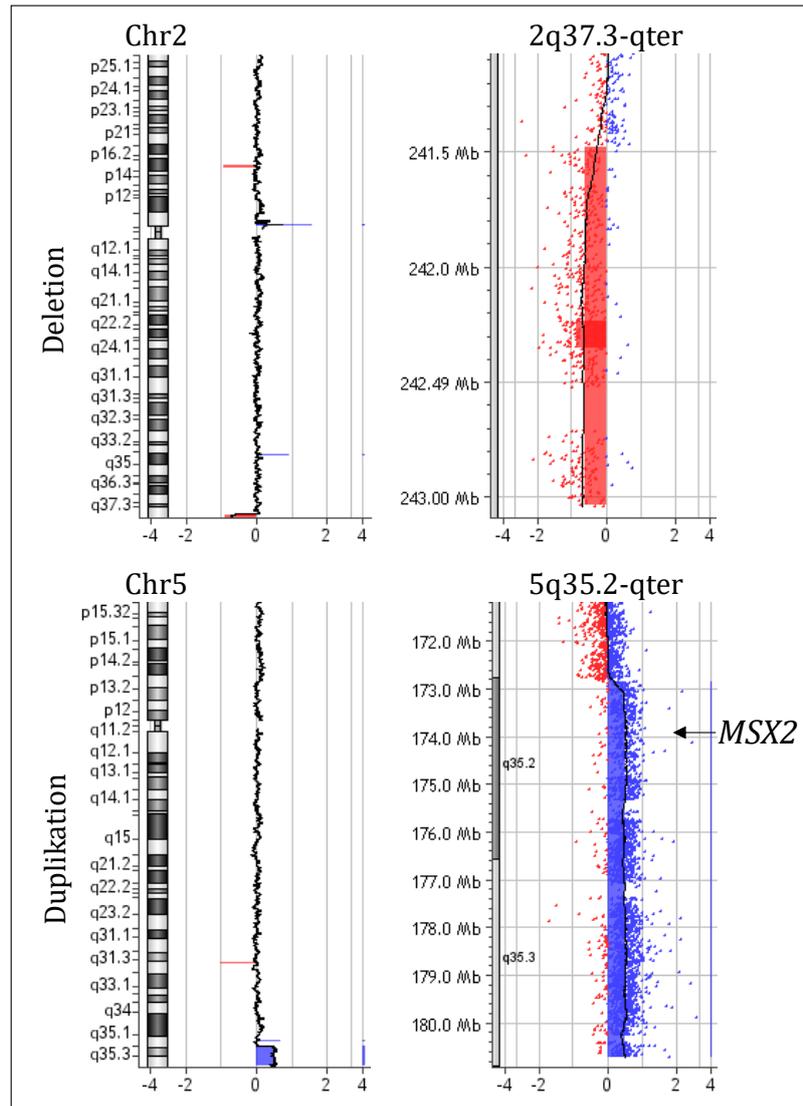


Abbildung 3.6: Array-CGH Profil der Chromosomen 2 und 5 der Patientin CRA_32. Das log₂ratio Profil zeigt einen 1,55 Mb große, heterozygote Verlust von 2q37.3-qter (roter Balken) sowie eine 7,85 Mb Duplikation von 5q35.2-qter (blauer Balken). Die Position des *MSX2* Gens auf Chromosom 5 ist gekennzeichnet.

3.1.4 Zugewinn 2q34-qter und Verlust 17q25.3

Die Geburtsmaße von Patientin CRA_35 nach 40 Schwangerschaftswochen (SSW) lagen bei 3050 g (<25. P.), 53 cm Körpergröße (>50. P.) sowie 33 cm Kopfumfang (>5. P.). Bei ihr liegt der Verdacht auf einen vorzeitigen Verschluss der linken und teilweise auch der rechten Koronarbahn vor. Weitere kraniofaziale Auffälligkeiten sind eine prominente Stirn, kleine Ohren mit ausgeprägtem Relief und einer Vorverlagerung des linken Ohrs, eine dünne Oberlippe, Retrognathie sowie eine Orbitostenose ohne Mittelgesichtshypoplasie, die zu Exophthalmus führte. Zusätzlich wurde ein Antitrypsinmangel sowie beidseitig ein Glaukom festgestellt. Eine Magnetresonanztomographie (MRT) zeigte einen normalen Befund. Der Neugeborenen Hörtest war auffällig, nach einer Durchführung einer Parazentese im Alter von 2 Jahren ließ sich das

Hörvermögen jedoch als gut einstufen. Ihre Eltern sowie ihre beiden Geschwister zeigen keine kraniofazialen Auffälligkeiten (Abb. 3.7 A).

Vom humangenetischen Diagnostiklabor wurden Exon 7 von *FGFR3* sowie das Gen *TCF12* analysiert und waren ohne Befund. Aufgrund des syndromalen Phänotyps wurde im Rahmen des Forschungsprojekts eine Array-CGH Analyse der gDNA von Patientin CRA_35 durchgeführt. Die Auswertung des Array Profils ergab zwei klinisch relevante Aberrationen: ein 29,5 Mb großer Zugewinn an genetischem Material von 2q34-qter und ein 111 kb großer, heterozygoter Verlust von 17q25.3-qter (Abb. 3.7 B; [arr[hg19] 2q34q37.2(213,479,146-243,041,364)x3, 17q25.3(80,998,255-81,109,817)x1]). Die Duplikation auf Chromosom 2 betrifft über 200 Gene und die Deletion auf Chromosom 17 zwei Gene. In der Datenbank DECIPHER sind für den Bereich der 2q Duplikation Einträge mit überlappenden Duplikationen gelistet, allerdings sind die meisten deutlich kleiner (<10 Mb) und haben andere zusätzlich, potentiell pathogene chromosomale Aberrationen (Anhang E). Ein Abgleich der Datenbank mit der 17q25.3 Monosomie ergab überlappende Monosomien, die jedoch deutlich größer als 111 kb und hauptsächlich mit Intelligenzminderung assoziiert sind (Anhang E). Innerhalb der Datenbank wies nur die Patientin 265082 ähnliche Aberrationen wie Patientin CRA_35 auf. Bei Patientin 265082 liegt ein 11,2 Mb Zugewinn von 2q37.1-q37.3 (GRCh37/hg19; chr2:231.783.632-243.007.359, 165 Gene) und ein 334 kb Verlust von 17q25.3 (GRCh37/hg19; chr17:80.695.764-81.029.941, vier Gene) vor. Diese Bereiche überschneiden sich teilweise mit den bei Patientin CRA_35 detektierten Aberrationen (Abb. 3.7 B). Des Weiteren wurde ein 442,7 kb Verlust von 7q31.32-q31.33 (GRCh37/hg19; chr7:123.627.320-124.070.096) vermerkt.

Validierung

Die Kombination der terminalen, chromosomalen Veränderungen lässt eine unbalancierte Translokation vermuten. Daher wurde zur Validierung der detektierten Aberrationen eine FISH auf Metaphase Chromosomen der Patientin CRA_35 durchgeführt. Für das Chromosom 2 wurde der Sondenmix TeloMark 2 (Aquarius CytoCell, 2p grünes Signal, 2q rotes Signal, Xq/Yq orange und grünes Signal, *DXZ1* weißes Signal) und für Chromosom 17 eine 17pter Subtelomer Sonde (Kreatech, grünes und rotes Signal) verwendet. Durch diese Sonden Kombination konnte gezeigt werden, dass das duplizierte genetische Material von 2q auf 17q lokalisiert ist (Abb. 3.7 C). Dies bestätigt die Annahme, dass bei Patientin CRA_35 eine unbalancierte Translokation zwischen 2q und 17q [t[2;17]] vorliegt. Eine Analyse der parental Chromosomen war mangels der dafür benötigten Blutproben nicht möglich.

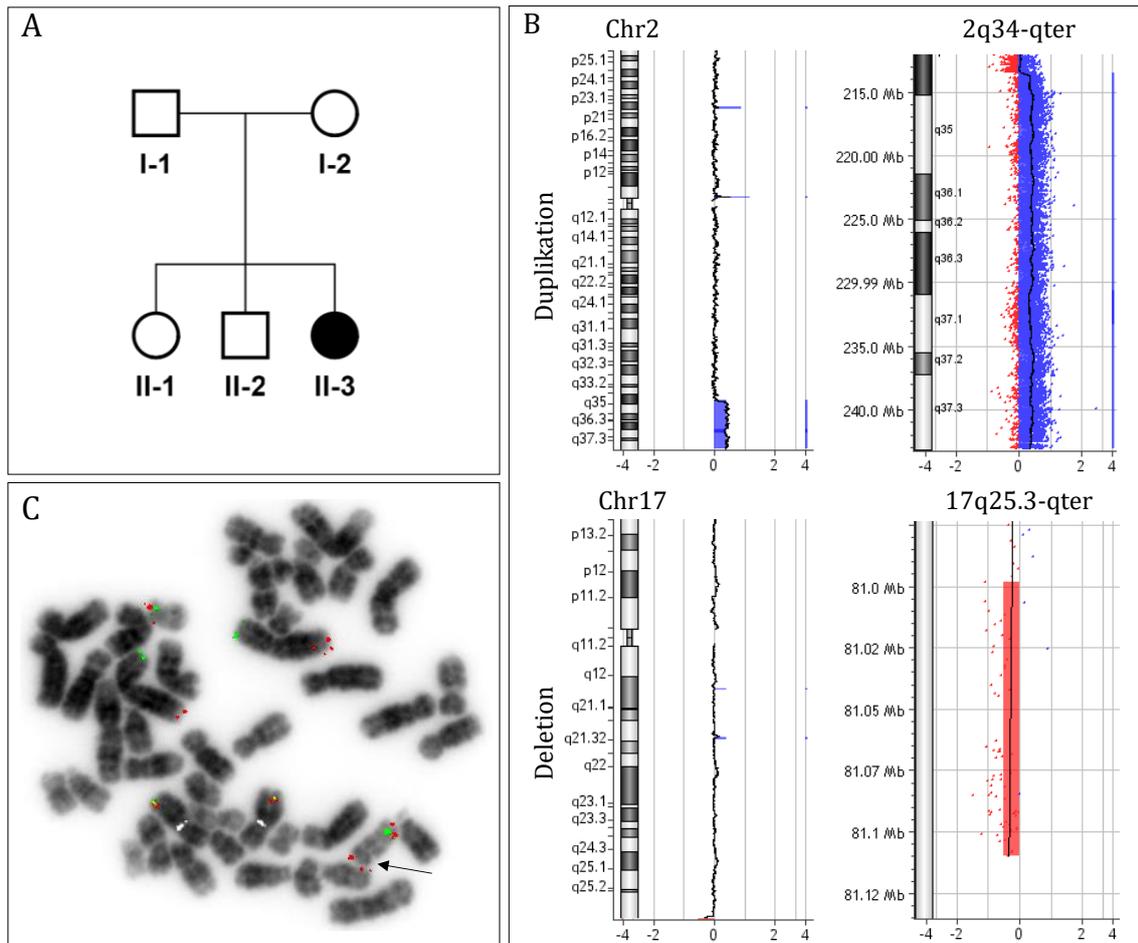


Abbildung 3.7: Stammbaum und Ergebnisse von Patientin CRA_35. **A** Stammbaum der Familie. Patientin CRA_35 (II-3) ist die einzige Betroffene in der Familie. **B** Array-CGH Profile der Chromosomen 2 und 17. Das \log_2 ratio Profil zeigt eine 29,5 Mb Duplikation von 2q34-qter (blauer Balken) sowie eine 111 kb heterozygote Deletion von 17q25.3-qter (roter Balken). Vergrößerungen der Aberrationen sind jeweils rechts dargestellt. **C** FISH Analyse an Metaphase Chromosomen von Patientin CRA_35. Die Hybridisierung mit dem Sondenmix für Chromosom 2 (2p grünes Signal, 2q rotes Signal) und das X Chromosom (weißes und orange-grünes Signal) sowie mit der Subtelomer Sonde 17p (grünes und rotes Signal) ergab, dass der Zugewinn von 2q auf Chromosom 17q lokalisiert ist (siehe Pfeil).

3.1.5 Zugewinn 5q34-qter und Verlust 8p23.3-pter

Bereits pränatale Ultraschalluntersuchungen zeigten einen Kleeblattschädel bei Patientin CRA_58. Nach der Geburt wurden neben einer Pansynostose noch ein Hydrozephalus, Mittelgesichtshypoplasie, Exophthalmus, Antepositio ani sowie Klitoromegalie beschrieben. Ein MRT ergab zusätzlich eine Chiari Malformation Typ II mit Syringomyelie sowie Corpus callosum Agenesie. In ihren ersten beiden Lebensjahren waren mehrere Operationen wie osteoclastische Trepanationen, das Platzieren eines ventriculo-pleuralen Shunts, Laminectomie und occipitale Kraniotomie notwendig. Im Alter von 2 Jahren liegen ihr Gewicht, Körpergröße und Kopfumfang bei 8.270 g (<3. P.), 72 cm (<3. P.) und 42 cm (<3. P.). Kraniofaziale Auffälligkeiten sind Epikanthus, Lagophthalmus, ein hoher Gaumen und tief-sitzende Augen. Ihre allgemeine Entwicklung ist verzögert. Ihre nicht miteinander verwandten Eltern und ihre beiden Schwestern zeigen keine Auffälligkeiten (Abb. 3.8 A).

Aufgrund des syndromalen Phänotyps wurde eine Array-CGH Analyse der gDNA von Patientin CRA_58 durchgeführt. Zuvor fanden keine molekulargenetischen Analysen durch das humangenetische Diagnostiklabor statt. Es wurden zwei Aberrationen mit klinischer Relevanz detektiert (Abb. 3.8 B, [arr[hg19] 5q34q35.3(166,722,274-180,712,263)x3, 8p23.3p23.2(161,472-4,239,792)x1]).

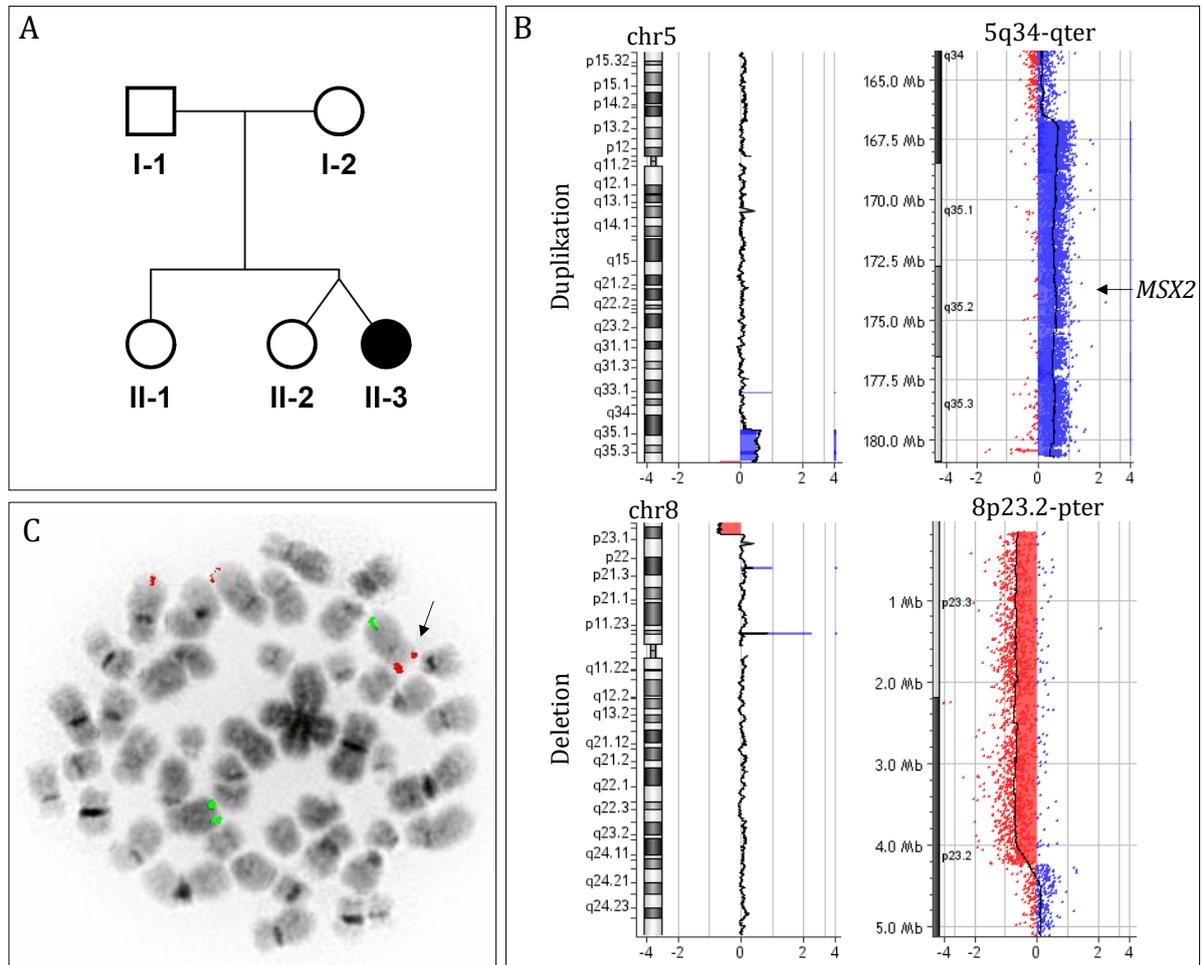


Abbildung 3.8: Stammbaum, Array-CGH Analyse und FISH von Patientin CRA_58. A Stammbaum der Familie. Patientin CRA_58 (II-3) ist die einzige Betroffene in der Familie. B Array-CGH logratio Profile der Chromosomen 5 und 8. Das Profil von Chromosom 5 zeigt eine 14 Mb Duplikation von 5q34-qter (blauer Balken). Eine Vergrößerung dieses Bereichs sowie die Position des Gens *MSX2* ist auf der rechten Seite dargestellt. Eine 4 Mb große, heterozygote Deletion (roter Balken) wurde auf Chromosom 8 detektiert. C FISH Analyse an Metaphase Chromosomen. Die Aufnahme zeigt beispielhaft eine Metaphase, die mit den Subtelomer Sonden 5q (rotes Fluoreszenzsignal) und 8q (grünes Fluoreszenzsignal) hybridisiert wurde. Der Pfeil kennzeichnet das zusätzliche rote Fluoreszenzsignal auf Chromosom 8.

Der 14 Mb große, terminale Zugewinn auf dem q-Arm des Chromosoms 5 betrifft über 100 Gene, unter anderem das Kraniosynostose Gen *MSX2* (Abb. 3.8 B oben). Bei der zweiten Aberration handelt es sich um ein 4 Mb großen, heterozygoten Verlust auf dem p-Arm des Chromosoms 8 (Abb. 3.8 B unten). Von der terminalen Deletion sind 16 Gene betroffen. Ein Abgleich mit der Datenbank DECIPHER ergab keinen Patienten, der die gleiche Kombination an chromosomalen Veränderungen aufweist. Für die 5q34-qter Trisomie waren 35 Patienten gelistet, die partiell überlappende Trisomien aufweisen, die als pathogen oder mit unklarer Signifikanz eingestuft

wurden. Hierbei sind es, wie bei Patientin CRA_32, 7 Patienten, bei denen *MSX2* innerhalb des Zugewinns liegt (DECIPER IDs: 282073, 273674, 285499, 280719, 282379, 278114, 284051). Die 8p23.3-pter Monosomie überlappt mit meist größeren Deletionen von 70 Patienten, von denen 48 noch zusätzliche chromosomale Aberrationen aufweisen (Anhang E).

Validierung

Die detektierten terminalen Aberrationen deuten auf eine unbalancierte Translokation hin. Da die Array-CGH keine Information über die strukturelle Veränderung gibt, wurde eine FISH an Metaphase Chromosomen der Patientin durchgeführt. Es wurden Kreatech Subtelomer Sonden für 5q (rotes Fluoreszenzsignal) und 8q (grünes Fluoreszenzsignal) verwendet. Mit dieser Sonden Kombination kann zwar nicht der Verlust auf 8p nachgewiesen werden, allerdings ist es so möglich zu zeigen, dass das duplizierte Material dort lokalisiert ist. Abbildung 3.8 C zeigt, dass drei Signale der 5q Sonde vorliegen sowie, dass das zusätzliche Signal auf Chromosom 8 vorhanden ist. Dies bestätigt das Array-CGH Ergebnis und die Annahme, dass bei der Patientin CRA_58 eine unbalancierte Translokation vorliegt. Eine Untersuchung der Eltern auf eine balancierte Translokation war nicht möglich, da hierfür keine entsprechenden Blutproben zur Verfügung standen.

3.1.6 Verlust 7q21.13-q21.3

Bei Patient CRA_59 sind die Sagittal-, Frontal- sowie die Koronarnähte vorzeitig fusioniert, was klinisch zu einem Oxyzephalus mit lateral vorgezogener Orbita und verminderter Stirnüberdachung führt. Im Alter von 10 Monaten waren seine Körpermaße: Gewicht 7650 g (3.-10. P.), Körpergröße 68 cm (<3. P.) und Kopfumfang 43,5 cm (<3. P.). In diesem Alter erfolgte eine Kraniektomie sowie ein frontoorbitales Advancement mit frontaler Remodellierung. Er zeigt eine leichte Sprach- und Entwicklungsverzögerung. Seine Eltern zeigen keine kraniofazialen Auffälligkeiten (Abb. 3.9). Die Mutter war zum Zeitpunkt der Analyse des Index Patienten schwanger. Informationen zu diesem Kind liegen nicht vor.

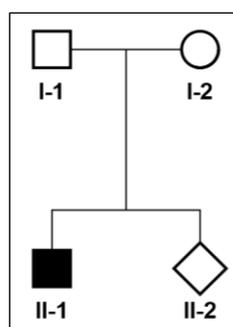


Abbildung 3.9: Stammbaum der Familie von Patient CRA_59 (II-1).

Es fanden keine molekulargenetischen Voruntersuchungen durch das Diagnostiklabor statt. Die gDNA des Patienten wurde im Rahmen des Forschungsprojekts durch Array-CGH analysiert. Das Array-CGH Profil ergab eine heterozygote, möglicherweise pathogene Kopienzahlveränderung auf Chromosom 7. Die 3,7 Mb große interstitielle Deletion von 7q21.13-q21.3 umfasst ca. 30 Gene (Abb. 3.10 A; [arr[hg19] 7q21.13-q21.3(90,673,226-94,370,074)x1]). Ein Abgleich mit der DECIPHER Datenbank ergab einen Fall (DECIPHER ID: 251554) mit einer ähnlich großen Deletion (3,4 Mb) an dieser Position. Darüber hinaus sind 9 weitere Patienten gelistet, die teilweise überlappende Deletionen aufweisen, die *FZD1* betreffen, (DECIPHER IDs: 321, 806, 811, 854, 855, 4100, 285920, 306535 und 315074; Anhang E). Die meisten dieser Deletionen sind größer als 10 Mb.

Validierung

Zur Bestätigung der heterozygoten Deletion erfolgte eine Analyse der gDNA von Patient CRA_59 durch qPCR. Parallel wurde die gDNA der Eltern analysiert, um zu überprüfen, ob die Aberration *de novo* entstanden ist oder von einem Elternteil vererbt wurde. Hierfür wurden Primer für Amplikons in drei Genen (7q_B: *FZD1*, 7q_C: *PEX1*, 7q_D: *COL1A2*), die innerhalb der Deletion liegen, sowie für zwei Kontrollamplikons außerhalb des Deletionsbereichs (7q_A, 7q_E: *DLX5*) erstellt (Anhang A). Für die endogene Kontrolle wurde ein Primerpaar für das autosomale Haushaltsgen *ALB* und für die Kontrolle des Geschlechts ein Primerpaar für das X-chromosomale Gen *F8* verwendet. Die Auswertung der qPCR von Patient CRA_59 (Index) zeigt bei den untersuchten Amplikons 7q_B, 7q_C und 7q_D eine reduzierte Kopienzahl im Verhältnis zur weiblichen Kontroll-DNA (female), wodurch die durch Array-CGH detektierte Deletion validiert ist (Abb. 3.10 B). Beide Elternteile zeigen für die untersuchten Amplikons eine normale Kopienzahl (Abb.3.10 B), d.h. die Deletion ist bei Patient CRA_59 *de novo* entstanden.

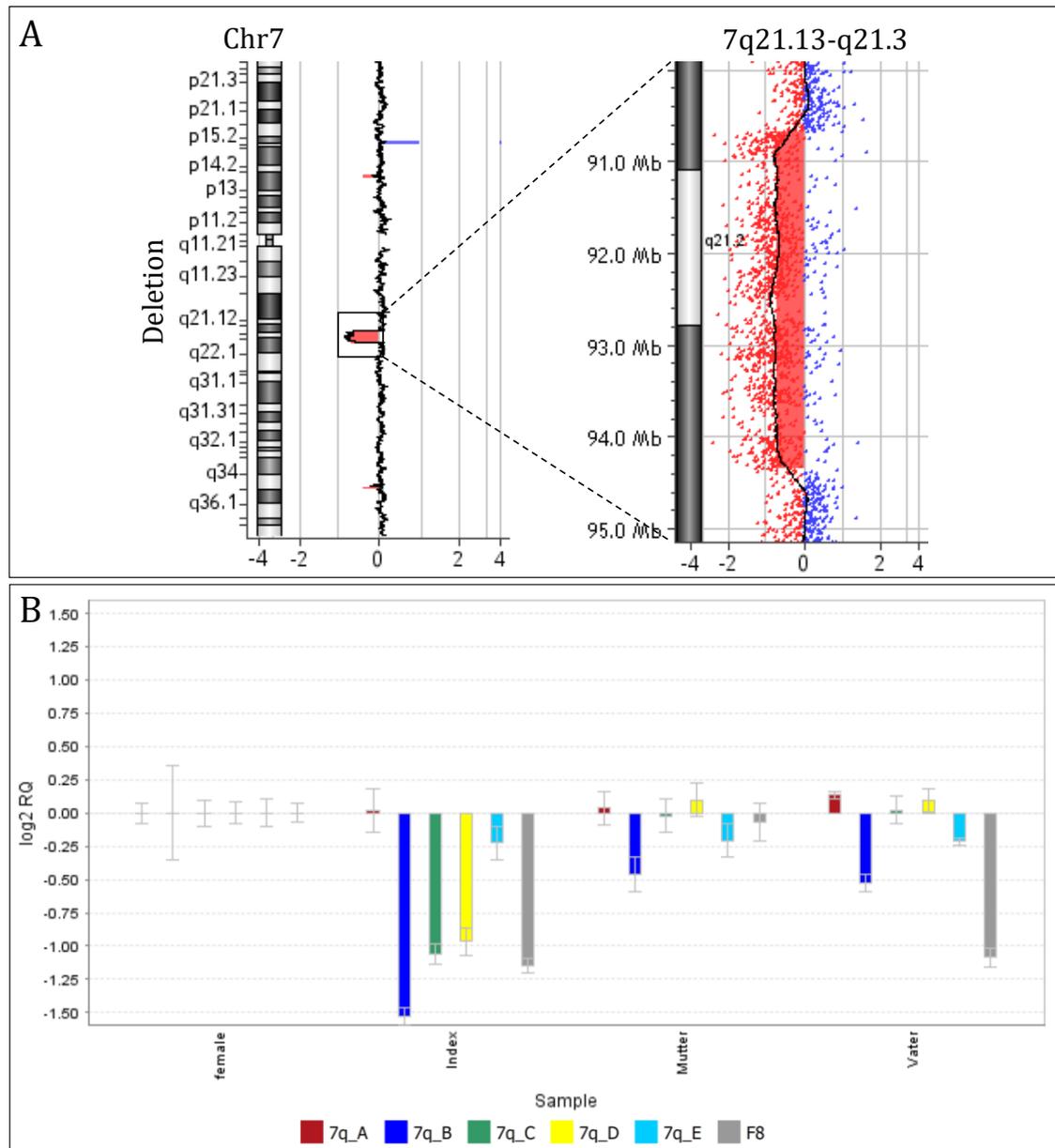


Abbildung 3.10: Array-CGH Profil und qPCR Ergebnis von Patient CRA_59 und Eltern. **A** Log₂ratio Profil von Chromosom 7. Eine 3,7 Mb große, heterozygote Deletion von 7q21.13-q21.3 wurde detektiert (roter Balken). Das rechte Panel zeigt den deletierten Bereich in Vergrößerung. **B** Auswertung der qPCR. Die Amplikons 7q_A und 7q_E liegen außerhalb der mit Array-CGH detektierten Aberration, Amplikons 7q_B, 7q_C und 7q_D innerhalb. Das Amplikon F8 dient der Kontrolle des Geschlechts. Die erhaltenen C_T-Werte wurden mit der endogenen Kontrolle *Albumin* verrechnet und zur weiblichen Kontroll-DNA (female) ins Verhältnis gesetzt. Die erhaltenen RQ-Werte sind logarithmisch als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Eine Reduktion der Kopienzahl für die Amplikons 7q_B, 7q_C und 7q_D liegt bei Patient CRA_59 (Index) vor. Die Eltern zeigen für diesen Bereich eine normale Kopienzahl.

3.2 Kraniosynostose NGS Genpanel

Wie in der Einleitung beschrieben, können die Phänotypen von Kraniosynostose Syndromen überlappen, sodass mitunter ein direkter Rückschluss auf die genetische Ursache über den Phänotyp nicht möglich ist. Des Weiteren kommen z.B. für Koronarnaht Synostosen mehrere Gene in Frage. Dies hat meist zur Folge, dass in der humangenetischen Diagnostik mehrere Gene separat analysiert werden müssen, was sehr zeitintensiv sein kann. Ein hilfreiches diagnostisches Tool ist hierbei NGS, das die parallele Sequenzierung von vielen Genen ermöglicht. Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Kranio Panel designt, das 65 bzw. 67 Gene umfasst (siehe 2.3.5 a und Anhang C). Ziel war es mit einem diagnostischen Tool auch große und seltene Kraniosynostose Gene analysieren zu können und gleichzeitig das Mutationsspektrum in bekannteren Genen zu erweitern. Im Rahmen dieses Projekts wurde die erste Version, nach Verbrauch der Reagenzien, modifiziert und aktualisiert. Beide erstellten Kranio Panel Versionen wurden durch die Sequenzierung von Patientenproben mit bekannten Mutationen validiert (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Verwendete NGS Kontrollproben

Panel Version 1			
Kontroll ID	Gen	Mutation	detektiert
K1	<i>TCF12</i>	c.5A>G ¹ , p.Y2C + Deletion	✓
K2	<i>EFNB1</i>	c.339G>C, p.K113N	✓
K3	<i>FGFR1</i>	c.848C>G, p.P283R	✓
K4	<i>FGFR2</i>	c.940-2A>G	✓
K5	<i>FGFR3</i>	c.749C>G, p.P250R	✓
Panel Version 2			
Kontroll ID	Gen	Mutation	detektiert
K1	<i>TCF12</i>	c.5A>G ¹ , p.Y2C + Deletion	✓
K6	<i>FGFR3</i>	c.749C>G, p.P250R	✓
K7	<i>MEGF8</i>	c.828G>A, p.P276P	✓
K8	<i>TWIST1</i>	c.524_537del, p.C175Sfs*58	✓

¹ *TCF12* Transkript NM_207040

Alle Mutationen der Kontrollproben konnten mit den Standardfiltereinstellungen identifiziert werden. Bei Probe K1 handelt es sich um die gDNA von Patient CRA_1. Wie unter 3.1.1 beschrieben weist dieser Patient zum einen eine Variante im alternativen Transkript von *TCF12* (NM_207040) auf und zum anderen eine Deletion, die unter anderem Exon 6 bis Exon 21 von *TCF12* (NM_207037.1) betrifft. Diese Patientenprobe wurde verwendet, um zu analysieren, ob

und wie sich Kopienzahlveränderungen durch die generierten NGS Daten darstellen lassen. Die Analyse erfolgte über die CNV Analyse Funktion von GensearchNGS. Hierbei wurde die durchschnittliche Abdeckung der Probe K1 mit der durchschnittlichen Abdeckung von 11 anderen Proben des gleichen Sequenzierlaufs verglichen. Die Analyseeinstellungen wurden folgendermaßen gesetzt: minimale Differenz: 20%, minimale Abdeckung: 0, minimale Regionenlänge: 50 bp, und Berechnung aus dem Durchschnitt. Das Ergebnis der Analyse wird zum einen in Tabellenform (Tabelle 3.3) und zum anderen für jedes Exon der Unterschied der Abdeckung in einem Boxplot Diagramm dargestellt (Abb. 3.11). Tabelle 3.3 zeigt, dass mit der CNV Analyse die Deletion, die die kodierenden Exons 6-20 von *TCF12* betrifft, nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 3.3: Ergebnis der CNV Analyse für *TCF12* mit GensearchNGS

Gen	Exon	Ø Abdeck. Ref.	Ø Abdeck. K1	x-fache Änderung	Differenz (%)	p-Wert	Kategorie
<i>TCF12</i>	6	1467,5	717,2	0,49	-51,13%	3,99E-08	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	7	852,3	454,4	0,53	-46,68%	1,16E-07	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	8	1956,0	985,0	0,50	-49,64%	2,75E-11	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	9A	838,2	469,1	0,56	-44,03%	1,07E-07	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	9	1413,5	815,8	0,58	-42,29%	3,19E-07	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	10	1376,6	685,0	0,50	-50,24%	9,82E-10	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	11	940,9	543,8	0,58	-42,21%	4,24E-08	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	12	1316,0	698,9	0,53	-46,89%	3,18E-09	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	13	1323,4	661,2	0,50	-50,03%	7,44E-11	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	14	1918,9	928,4	0,48	-51,62%	1,18E-11	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	15	1674,2	868,0	0,52	-48,15%	2,54E-08	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	16	1432,1	749,9	0,52	-47,64%	8,21E-10	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	17	638,2	354,6	0,56	-44,44%	2,92E-08	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	18	637,7	333,9	0,52	-47,64%	3,05E-10	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	19	1643,9	996,1	0,61	-39,41%	2,24E-07	Deletion (het.)
<i>TCF12</i>	20	1260,9	694,8	0,55	-44,90%	8,99E-09	Deletion (het.)

Ø Abdeck. = durchschnittliche Abdeckung; het. = heterozygot; Ref. = 11 verrechnete Proben aus dem gleichen Lauf

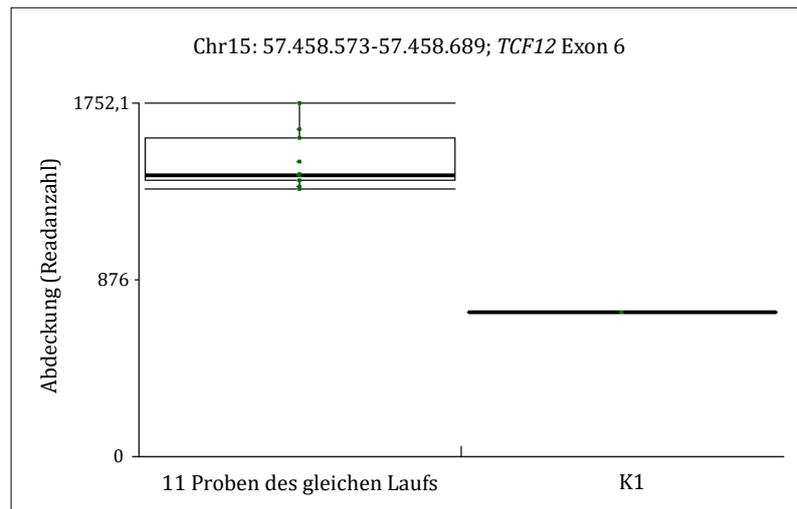


Abbildung 3.11: Ergebnis des CNV Tools von GensearchNGS für Exon 6 von *TCF12*. Der Vergleich der durchschnittlichen, normalisierten Abdeckungen von K1 mit 11 anderen Proben des gleichen Laufs für das Exon 6 von *TCF12* ist als Boxplot dargestellt. Die Exon 6 Abdeckung von K1 ist um die Hälfte geringer als die von den anderen Proben.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 66 Kraniosynostose Patientenproben mit dem selbst designten Kranio Panel analysiert. Hierbei wurden Proben sowohl von Patienten mit isolierter Kraniosynostose als auch mit zusätzlichen klinischen Auffälligkeiten untersucht. Bei 9 Patienten wurden bekannte Kraniosynostose Mutationen identifiziert (Tabelle 3.4). Am häufigsten wurde die *FGFR3* Mutation detektiert, die mit dem Muenke Syndrom assoziiert ist.

Tabelle 3.4: Patienten mit bekannten Kraniosynostose Mutationen

Patienten ID	Kranio-synostose	zusätzliche Auffälligkeiten	Gen	Mutation	Syndrom
CRA_26	+	N/A	<i>FGFR3</i>	c.749C>G, p.P250R	Muenke Syndrom
CRA_44	+	N/A	<i>FGFR3</i>	c.749C>G, p.P250R	Muenke Syndrom
CRA_54	+	N/A	<i>FGFR3</i>	c.1172C>A, p.A391E	Crouzonodermoskeletales Syndrom
CRA_55	+	N/A	<i>FGFR3</i>	c.749C>G, p.P250R	Muenke Syndrom
CRA_62	koronar, lambda	+	<i>FGFR1</i>	c.755C>G, p.P252R	Pfeiffer Syndrom Jackson-Weiss Syndrom
CRA_65	+	N/A	<i>FGFR2</i>	c.1052C>G, p.S351C	Pfeiffer Syndrom Antley-Bixler Syndrom
CRA_69	+	N/A	<i>FGFR3</i>	c.749C>G, p.P250R	Muenke Syndrom
CRA_75	koronar bilateral	+	<i>TWIST1</i>	c.392T>C, p.L131P	Saethre-Chotzen Syndrom
CRA_82	koronar	+	<i>FGFR3</i>	c.749C>G, p.P250R	Muenke Syndrom

+: ja; N/A: nicht bekannt

Bei 12 Patienten wurden neue bzw. sehr seltene Varianten identifiziert, die möglicherweise pathogen sind (Tabelle 3.5). Im Folgenden wird der Phänotyp dieser Patienten und die Auswertung der NGS Daten ausführlicher beschrieben.

Tabelle 3.5: Patienten mit potentiell pathogenen Varianten

Patienten ID	Kraniosynostose	weitere Auffälligkeiten	Gen	Variante
CRA_6	lambda	+	<i>POR</i>	hom. c.902G>A, p.R301H
CRA_14	metopisch, lambda	+	<i>HUWE1</i>	hem. c.329G>A, p.R110Q ¹
CRA_18/_19	sagittal	+	<i>MEGF8</i>	hom. c.828G>A, p.P276P
CRA_29	koronar bilateral	+	<i>FGFR2</i>	het. c.1150G>A, p.G384R ²
CRA_34	sagittal	+	<i>ERF</i>	het. c.151delG, p.D51Tfs*26
CRA_43	metopisch	+	<i>PTCH1</i>	het. c.3436G>A, p.D1146N
CRA_48	lambda	+	<i>MSX2</i>	het. c.442C>G, p.P148A
CRA_49	metopisch	+	<i>MEGF8</i>	het. c.5210C>A, p.S1737*
CRA_56	koronar bilateral	-	<i>TCF12</i>	het. c.1885C>T, p.Q629*
CRA_64	multiple	+	<i>TCF12</i>	het. c.825delG, p.S276Vfs*12
CRA_80	koronar	+	<i>TCF12</i>	het. c.1036-1G>C

+: ja; -: nein; del: Deletion; fs: *frameshift*, Leserasterverschiebung; hem.: hemizygot; het.: heterozygot; hom.: homozygot; *: vorzeitiges Stopcodon, ¹: (TAYLOR *et al.* 2015), ²: (PULLEYN *et al.* 1996)

3.2.1 Homozygote Missense-Variante in *POR* - c.902G>A

Bei Patient CRA_6 lag eine vorzeitige Fusion der Lambdanaht vor, was zu einem Turrizephalus führte. Seine Maße bei Geburt in der 41. SSW lagen bei 3050 g Gewicht (25.-50. P.), 48 cm Körperlänge (10. P.) und 35 cm Kopfumfang (50. P.). Des Weiteren wurde Hypertelorismus, Strabismus, eine rechtsseitige Hornhautnarbe, tiefsitzende nach hinten rotierte Ohren sowie eine muskuläre Hypotonie festgestellt. Ein MRT ergab eine vollständige Agenesie des Corpus callosum und eine Verbreiterung des dritten Hirnventrikels. Kraniofaziales Advancement erfolgte im Alter von 6 Monaten und hatte eine teilweise rechtsseitige Hemiparese zur Folge. Eine Untersuchung im Alter von 15 Jahren ergab folgende Körpermaße: 48 kg Gewicht (10.-25. P.), 161 cm Körpergröße (3.-10. P.) und 54 cm Kopfumfang (10. P.). Zusätzlich zu den bereits bekannten Merkmalen wurden als kraniofaziale Auffälligkeiten eine flache Stirn, bogenförmige Augenbrauen, lateral abfallende Lidachsen und eine angehobene Nasenbodenebene beschrieben. Hinzu kommt noch ein kurzes Philtrum, eine offene zeltförmige Mundstellung, ein hoher Gaumen sowie Zahnfehlstellungen. Eine Schwerhörigkeit des linken Ohrs wurde festgestellt. Der Patient weist zudem eine milde Streckkontraktur der Ellenbogengelenke und eine Zerebralparese mit ataktischen Bewegungskomponenten auf. Es liegt eine komplexe

Entwicklungsverzögerung vor: laufen konnte er mit 7 Jahren, mit 15 Jahren bestand sein Wortschatz aus drei Wörtern und er hatte Schwierigkeiten selbstständig zu essen. Seine drei Geschwister und seine Eltern sind gesund. Die Eltern sind konsanguin (3. Grades, Abb. 3.12 A).

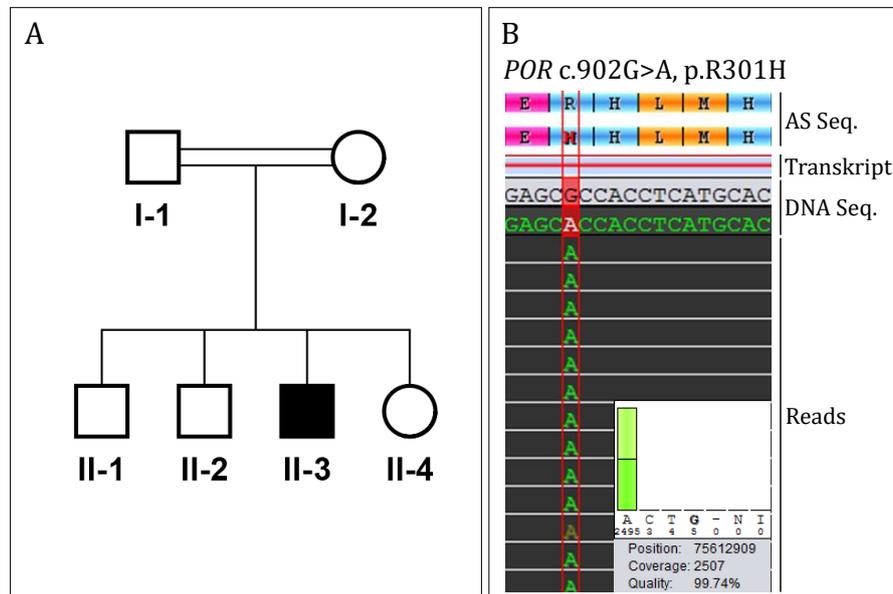


Abbildung 3.12: Stammbaum und NGS Ergebnis des Patienten CRA_6. **A** Stammbaum der Familie. Die Eltern sind konsanguin und Patient CRA_6 (II-3) ist das einzig betroffene Kind. **B** *POR* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Dargestellt ist sowohl die Referenzsequenz als auch die *POR* Variante auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.). Einzelne Reads sind als schwarze Balken abgebildet und innerhalb dieser sind Abweichungen von der Referenzsequenz grün markiert. Das untere Diagramm gibt Auskunft über die genomische Position auf Chromosom 7, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante.

Vor der Aufnahme in die Kraniosynostose-Kohorte wurden Exon 5 von *FGFR1*, Exon 7 und 8 von *FGFR2*, Exon 7 von *FGFR3* sowie *TWIST1* der Patienten gDNA durch das humangenetische Diagnostiklabor analysiert und klassische Kraniosynostose Syndrome ausgeschlossen. Eine Array-CGH Analyse durch ein externes Diagnostiklabor ergab einen normalen Befund. Daraufhin erfolgte die Anreicherung der Zielsequenzen für das Kranio Panel mit dem *Nextera Rapid Capture* Kit. Nach der Sequenzierung wurde das Alignment mit der humanen Referenzsequenz (GRCh37/hg19) durch den MiSeq Reporter durchgeführt. 97,7% der Zielsequenzen waren mindestens 20x abgedeckt. Exons, die nicht vollständig abgedeckt waren, sind im Anhang D gelistet. Die lückenhaften Stellen wurden nicht mit Sanger Sequenzierung kontrolliert. Nach Filterung mit den Standardeinstellungen durch die Software GensearchNGS blieben 8 Varianten zur weiteren Bewertung übrig. Davon wurden 4 als Sequenzierartefakte und 3 als Klasse I Varianten eingeordnet. Übrig blieb eine homozygote Variante c.902G>A in Exon 9 des Gens *POR* (NM_000941.2, Abb. 3.12 B). Diese verursacht auf Proteinebene einen Aminosäureaustausch von Arginin 301 nach Histidin (p.R301H). Dieser Variante ist eine rs-Nummer (rs78215318) zugeordnet, allerdings ist sie in der Populationsdatenbank ExAC nur mit einer geringen Frequenz (0,002437%) gelistet. Die Vorhersageprogramme MutationTaster, SIFT (*score*: 0) und

PolyPhen-2 (*score*: 0,956) stufen diese Variante einheitlich als möglicherweise pathogen ein. Die Variante wurde durch Sanger Sequenzierung bestätigt. Eine Analyse der Eltern oder Geschwister konnte nicht durchgeführt werden, da keine DNA Proben zur Verfügung standen.

3.2.2 Hemizygoter Missense-Variante in *HUWE1* – c.329G>A

Eine vorzeitige Fusion der Frontal-, Lambda- und Koronarnähte liegt bei Patient CRA_14 vor. Dies führte zur Ausbildung eines Turrizephalus. Seine Geburt erfolgte in der 36. SSW. Seine Geburtsmaße waren folgendermaßen: Gewicht 2840 g (50. P.), 48 cm Körperlänge (>30. P.) und 30 cm Kopfumfang (<3. P.). Fazial auffällig waren ein flaches Mittelgesicht, Exophthalmus, nach unten abfallende Lidachsen, eine breite Nasenwurzel sowie antevertierte Nares. Zudem wurden ein tiefer Ansatz des rechten Ohres, ein langes Philtrum und ein kleiner Mund mit schmalen Oberkiefer und hohem Gaumen beschrieben. Des Weiteren wurde eine Hörstörung festgestellt. Der MRT Scan zeigte keine intrakraniellen Auffälligkeiten. Im Alter von 3 Monaten erfolgte eine frontoorbitale Remodellierung. Die Eltern des Patienten zeigen keine kraniofaziale Auffälligkeiten (Abb. 3.13 B).

Durch das humangenetische Diagnostiklabor wurden zuvor Exon 7 von *FGFR2*, Exon 7 und 8 von *FGFR3* sowie *TWIST1* analysiert und waren unauffällig. Eine Array-CGH Analyse durch ein externes Diagnostiklabor ergab keine klinisch relevanten CNVs. Im Rahmen dieses Projekts wurde die gDNA des Patienten CRA_14 mit dem Cranio NGS Panel untersucht. Die Anreicherung erfolgte mit dem *SureSelect^{QXT}* Kit, die Sequenzierung mit dem MiSeq und der Abgleich mit dem Referenzgenom (GRCh37/hg19) mit GensearchNGS. Mindestens 20x abgedeckt waren 99,8% der Zielsequenzen. Eine Auflistung der Lücken befindet sich im Anhang D. Es erfolgte keine Nachsequenzierung der nicht abgedeckten Stellen.

Die Standardfiltereinstellungen für die anschließende Variantendetektion wurden so verändert, dass Varianten Balance >5 festgelegt wurde. Dies ergab 26 Varianten, von denen 14 als Artefakte und 11 als Klasse I Varianten eingestuft wurden. Die hemizygoter Variante in Exon 6 des *HUWE1* Gens (NM_031407.5) wurde als sehr wahrscheinlich pathogen (Klasse IV) bewertet. Der Basenaustausch c.329G>A führt zu der Substitution der konservierten Aminosäure Arginin 110 durch Glutamin (p.R110Q) und wird sowohl von MutationTaster, SIFT (*score*: 0) als auch PolyPhen-2 (*score*: 0,998) als krankheitsverursachend eingeordnet. Für diese Variante ist kein Eintrag in der ExAC Datenbank und keine rs-Nummer vorhanden. Jedoch ist sie bereits als pathogen in den Datenbanken HGMD (CM155939) und ClinVar (RCV000497788.1) gelistet und von Taylor et al. im Zusammenhang mit Kraniosynostose beschrieben (TAYLOR *et al.* 2015). In ClinVar ist die Variante in Assoziation mit mentaler Retardierung vermerkt, in HGMD mit Kraniosynostose. Da es sich um ein X chromosomales Gen handelt und der Patient männlich ist, wurde nur die gDNA der Mutter analysiert. Sie besitzt die wildtypische Sequenz (Abb. 3.13 B). Die *HUWE1* Variante ist folglich *de novo* bei Patient CRA_14 entstanden.

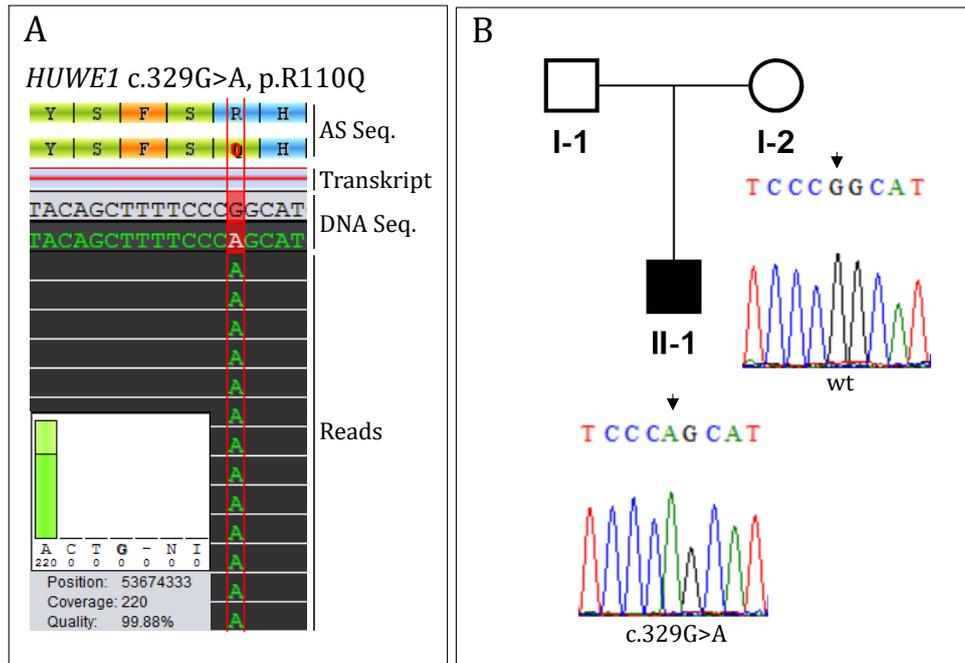


Abbildung 3.13: NGS Ergebnis des Patienten CRA_14 und Sanger Sequenzierung. **A** *HUWE1* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.) ist sowohl die Referenzsequenz als auch die Sequenzänderung dargestellt. Einzelne Reads sind als schwarze Balken abgebildet. Der Basenaustausch ist grün hervorgehoben. Das untere Diagramm gibt Auskunft über die genomische Position auf Chromosom X, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante. **B** Stammbaum und Sangeranalyse. Die Variante konnte validiert werden. Die Mutter ist wildtypisch an dieser Position, d.h. die Variante ist bei dem Patienten *de novo* entstanden.

3.2.3 Homozygote Spleißvariante in *MEGF8* – c.828G>A

Bei den Patienten CRA_18 und CRA_19 handelt es sich um Brüder und bei beiden liegt eine syndromale Form der Kraniosynostose vor. Bei dem älteren Bruder CRA_18 resultiert die Kraniosynostose in einer deutlichen Gesichtasymmetrie. Hypertelorismus, Epikanthus, eine breite Nasenwurzel und große, tief-sitzende und revertierte Ohren sind weitere faziale Auffälligkeiten. An den Händen wurden beidseitig verbreiterte Daumenendglieder, linksseitig ein bifides Endglied, beidseitige partielle Syndaktylie der Finger II/III und III/IV sowie Klinodaktylie der kleinen Finger mit vorliegender Brachymesophalangie festgestellt. Beide Großzehen waren verdoppelt und alle Zehen miteinander verwachsen. Darüber hinaus wurde ein beidseitiger Hodenhochstand beschrieben. Die Syndaktylien und der Hodenhochstand wurden operativ korrigiert. Im Alter von 7 Jahren lagen seine Körpermaße bei 128,8 cm Körpergröße (>90. P.), Gewicht 29,5 kg (>90. P.) und 51,8 cm Kopfumfang (25.-50. P.). Fehlstellungen des Kniegelenks und der Fußgelenke wurden chirurgisch korrigiert. Es zeigte sich eine psychomotorische und feinmotorische Störung bei muskulärer Hypotonie sowie eine sprachliche Entwicklungsstörung. Des Weiteren besteht der Verdacht auf Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Mangel bei erhöhter Konzentration von Thymin und Uracil im Urin. Allerdings

wurde eine Mutation im ursächlichen *DPD* Gen ausgeschlossen. Ein MRT Scan zeigte eine Auffälligkeit im Bereich von Corpus pinealis und bedarf noch weiterer Abklärung.

Der jüngere Bruder CRA_19 wurde in der 36. SSW geboren und hatte bei Geburt folgende Körpermaße: 51 cm Körperlänge (>70. P.), Gewicht 4300 g (>97. P.), 36 cm Kopfumfang (>90. P.). Es lag eine muskuläre Hypotonie vor. Die Operation der Sagittalnahtsynostose erfolgte im Alter von 5 Monaten. Faziale Auffälligkeiten wurden nicht im Detail beschrieben, einzig tief-sitzende und revertierte Ohren wurden vermerkt. Wie auch sein Bruder hatte Patient CRA_19 Auffälligkeiten der Extremitäten. Beide Hände hatten verbreiterte Daumenendglieder, Syndaktylie der Finger I/II und Kamptodaktylie der Zeigefinger. Die Füße hatten die gleiche Synpolydaktylie, wie sein Bruder. Diese Auffälligkeiten wurden ebenfalls chirurgisch korrigiert. Auch bei ihm liegt ein beidseitiger Hodenhochstand vor. Im Alter von 2,5 Jahren zeigte er eine altersentsprechende Entwicklung. Die Eltern der Geschwister sind konsanguin (Abb. 3.14 C).

Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit zum Carpenter Syndrom wurde vom humangenetischen Diagnostiklabor das Gen *RAB23* sequenziert. Dies zeigte nur die wildtypische Sequenz. Daraufhin erfolgte die Aufnahme in die Kraniosynostose Kohorte. Aufgrund des syndromalen Phänotyps wurde zunächst eine Array-CGH Analyse mit der gDNA von Patient CRA_18 durchgeführt. Diese ergab keine klinisch relevanten CNVs, sodass mit der gDNA der Geschwister eine Anreicherung mit dem *Nextera Rapid Capture* Kit für das Cranio Panel erfolgte. Die Sequenzierung und das anschließende Alignment wurde auf dem MiSeq durchgeführt. Von den Zielsequenzen waren bei beiden 98% mindestens 20x abgedeckt. Im Anhang D sind die nicht vollständig abgedeckten Exons aufgeführt. Eine Nachsequenzierung der lückenhaften Stellen erfolgte nicht. Aufgrund des konsanguinen Stammbaums der Familie wurde zusätzlich zu den Standardvariantenfiltern nach homozygoten Varianten gefiltert, die in beiden Datensets enthalten sind. Übrig blieben zwei Varianten im Gen *MEGF8*, die die Geschwister gemeinsam haben. Sowohl Variante 1 in Exon 5 (c.828G>A, NM_001410) als auch Variante 2 in Exon 42 (c.7713G>A, NM_001271938) bewirken keine Änderung auf Proteinebene (p.P276P; p.P2571P). Variante 2 betrifft allerdings nur das seltenere Transkript NM_001271938. Beide Varianten wurden mit der Populationsdatenbank ExAC abgeglichen und mit der Spleißvorhersage Funktion der Software Alamut analysiert. Variante 2 besitzt eine rs-Nummer (rs200748447) und eine MAF von 0,0136% (ExAC). Der Basenaustausch führt zu keiner Änderung von Spleißstellen, sodass diese als Klasse I eingestuft wurde. Variante 1 tritt noch seltener in der Bevölkerung auf (0,0008129% ExAC). Die Spleißvorhersage von Alamut zeigt einen möglichen Verlust des Spleißdonors von Exon 5 an (Abb. 3.14 B).

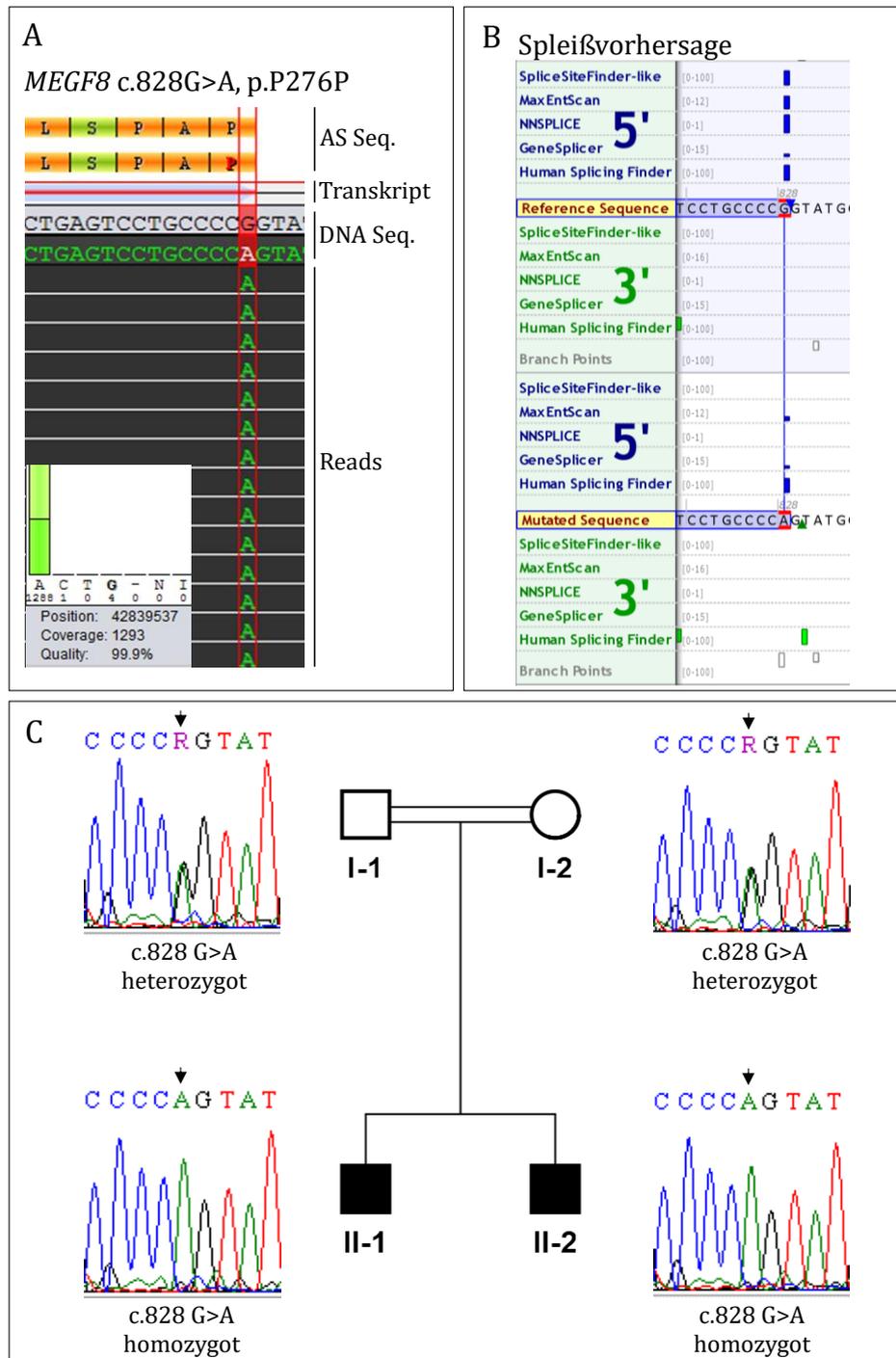


Abbildung 3.14: NGS Ergebnis der Patienten CRA_18 und CRA_19, Spleißvorhersage und Segregationsanalyse. **A** *MEGF8* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Dargestellt ist die Referenzsequenz und die *MEGF8* Variante 1 auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.). Schwarze Balken stellen die einzelnen Reads dar. Abweichungen von der Referenzsequenz sind grün markiert. Die genomische Position auf Chromosom 19, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante können dem Diagramm entnommen werden. **B** Ansicht der Spleißvorhersage in der Software Alamut. Der obere Bereich zeigt die Vorhersage für die Referenzsequenz, unten für die veränderte Sequenz. Variante 1 führt dazu, dass die Spleißdonorstelle von Exon 5 schwächer eingestuft oder nicht mehr erkannt wird (blaue Balken). **C** Segregationsanalyse in der Familie. Die Eltern (I-1, I-2) sind konsanguin. Die Sanger Sequenzierung bestätigt die homozygote Variante 1 in *MEGF8* bei den Brüdern (II-1, II-2), bei den Eltern liegt die Variante heterozygot vor.

Die wildtypische und die veränderte Spleißdonorsequenzen (wt: CCG/GUAUGGAC, var: CCA/GUAUGGAC) wurden zusätzlich noch mit den Spleißvorhersage Programmen Fruitfly und HBond untersucht. Es wird die Bindung der U1snRNA mit der potentiellen 5'Spleißstelle bewertet. Für die Konsensussequenz eines Spleißdonors (kon: CAG/GUAAGUAU) liegt der Wert von Fruitfly bei 1,0 und von HBond bei 23,8. Die wildtypische 5'Spleißstelle von Exon 5 wurde mit 0,98 bzw. 12,10 bewertet. Die veränderte Sequenz führte bei der Fruitfly Analyse dazu, dass kein Spleißdonor mehr erkannt wurde und HBond bewertete die veränderte Sequenz mit 8,90. Diese Ergebnisse unterstützen die Vorhersage der in Alamut verwendeten Programme, dass der Basenaustausch c.828G>A dazu führt, dass der Spleißdonor möglicherweise schlechter oder gar nicht vom Spleißosom erkannt wird. Es folgte eine Segregationsanalyse in der Familie für Variante 1, die zum einen den Basenaustausch bei den Brüdern bestätigte und zum anderen zeigte, dass die gesunden Eltern heterozygot für diese Variante sind (Abb. 3.14 C). Die NGS Daten der Brüder wurden auch auf gemeinsame heterozygote Varianten der Klasse III-V hin analysiert, und ergaben kein Ergebnis. Aufgrund aller Daten wurde die Variante 1 in *MEGF8* als Klasse IV Variante eingestuft. Um zu untersuchen welche Auswirkung die Sequenzänderung auf das Spleißen hat, wurde ein *in vitro* Spleißtest mit einem Minigen-Konstrukt durchgeführt (siehe 3.4.1 a).

3.2.4 Heterozygote *Missense*-Variante in *FGFR2* – c.1150G>A

Beide Koronarnähte waren bei Patient CRA_29 von einer vorzeitigen Fusion betroffen. Dies führte zu einer Brachyturrizephalie. Pränatal wurde bereits ein Hydrozephalus festgestellt. Ein MRT ergab folgende Befunde: Hydrozephalus internus mit Balkenhypoplasie, abnorme Gyrierung im Bereich des Corpus callosum, Erweiterung der externen Liquorräume sowie ein Tiefstand der Kleinhirntonsillen. Mit 5 ½ Jahren besaß er folgende Körpermaße: 105 cm Körpergröße (<3. P.), Gewicht 13 kg (<3. P.) und 47 cm Kopfumfang (<3. P.). Nach einer kraniofazialen Operation in seinem ersten Lebensjahr lag noch eine mäßige Brachyturrizephalie vor. Zudem war eine hohe Stirn, eine eingezogene Nasenwurzel, ein flaches Mittelgesicht, milder Exophthalmus sowie eine vorstehende Unterlippe klinisch auffällig. Hände und Füße des Patienten CRA_29 zeigen keine Auffälligkeiten. Seine motorische und sprachliche Entwicklung ist verzögert, zudem zeigt er Verhaltensauffälligkeiten. Bei ihm liegt eine muskuläre Hypotonie vor. Innerhalb der Familie gibt es weitere Betroffene mit kraniofazialen Auffälligkeiten. Bei Mutter sowie Großmutter des Patienten liegen Brachyzephalie, ein eingesunkenes Mittelgesicht und sehr kurze Daumen vor. Eine Kraniosynostose ist jedoch nicht beschrieben. Der Vater zeigt keine kraniofazialen Auffälligkeiten (Abb. 3.15 B).

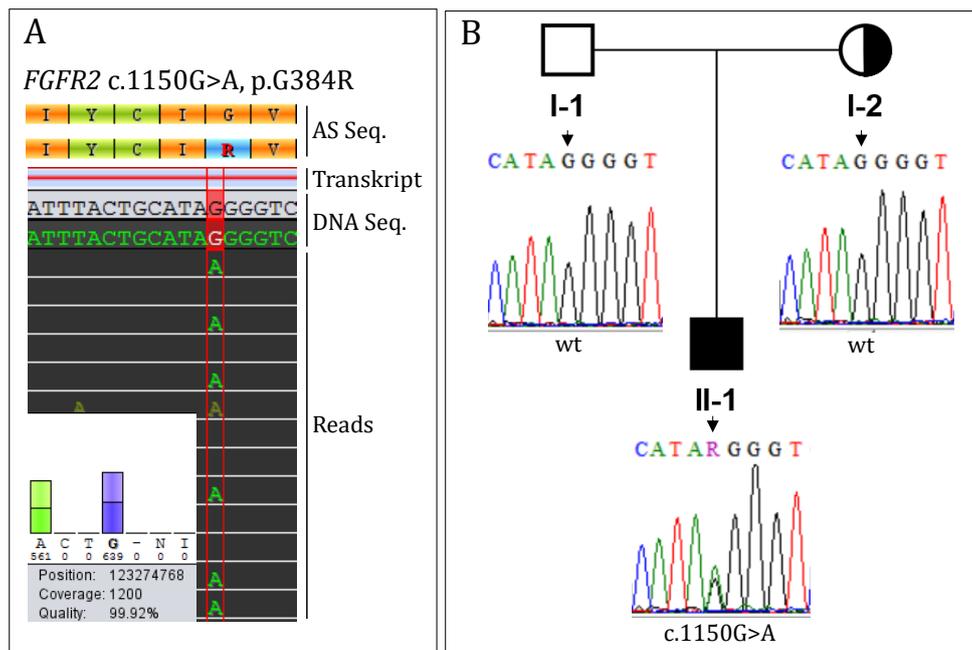


Abbildung 3.15: NGS Ergebnis des Patienten CRA_29 und Segregationsanalyse. **A** *FGFR2* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Dargestellt ist sowohl die Referenzsequenz als auch die veränderte Sequenz auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.). Einzelne Reads sind als schwarze Balken abgebildet, in denen das veränderte Nukleotid grün markiert ist. Die genomische Position auf Chromosom 10, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante sind im Diagramm dargestellt. **B** Segregationsanalyse für *FGFR2* c.1150G>A. Die Mutter zeigt kraniofaziale Auffälligkeiten, jedoch weisen die Eltern die wildtypische Sequenz auf. Die Variante ist bei Patient CRA_29 *de novo* entstanden.

Aufgrund des im Ultraschall festgestellten Hydrozephalus wurde pränatal ein Karyogramm erstellt, das unauffällig war. Nach seiner Geburt wurde vom humangenetischen Diagnostiklabor Exon 7 und 8 von *FGFR2*, Exon 7 und 10 von *FGFR3*, *TWIST1* sowie *TCF12* analysiert und waren ohne Befund. Damit wurden die häufigsten genetischen Ursachen für Kraniosynostose ausgeschlossen. Daraufhin wurde die Patienten gDNA mit dem *Nextera Rapid Capture* Kit angereichert, auf dem MiSeq sequenziert und die Sequenzierdaten mit dem Referenzgenom (GRCh37/hg19) durch den MiSeq Reporter aligniert. Mindestens 20x abgedeckt waren 97,2% der Zielsequenzen. Eine Auflistung der Exons, die nicht vollständig abgedeckt sind, befindet sich im Anhang D. Die lückenhaften Stellen wurden nicht durch Sanger Sequenzierung kontrolliert. Die Standardvariantenfilter in GensearchNGS ergaben 15 Varianten, von denen 6 als Sequenzierartefakte, 8 als Klasse I/II Varianten und eine als Klasse III Variante bewertet wurden. Die heterozygote Klasse III Variante liegt in dem Gen *FGFR2* (c.1150G>A, p.G384R; NM_000141.4, Abb. 3.15 A). In der Populationsdatenbank ExAC ist sie nicht gelistet. Der Effekt auf Proteinebene wird von den Programmen SIFT (toleriert, *score*: 0,08) und PolyPhen-2 (*probably damaging*, *score*: 0,937) widersprüchlich bewertet. Von MutationTaster wird sie als krankheitsverursachend eingestuft, allerdings bezieht sich diese Bewertung hauptsächlich auf einen HGMD Eintrag (CM960654). Jedoch sind auch in HGMD zwei widersprüchliche Bewertungen der Variante hinterlegt. So wird sie nach Pulley et al. als pathogen und assoziiert mit unbekannter Kraniosynostose beschrieben (PULLEYN *et al.* 1996). Aufgrund von

bioinformatischen Vorhersagen wurde sie dagegen 2013 von Doss et al. als SNP eingestuft (Doss et al. 2013). In der ClinVar Datenbank wurde sie 2017 in Assoziation mit Kraniosynostose als pathogen vermerkt (RCV000525216.1). Diese gegensätzlichen Bewertungen des Basenaustauschs führten bei Patient CRA_29 zur Einstufung als Klasse III Variante. Die gDNAs der Eltern wurden durch Sanger Sequenzierung analysiert und zeigen die wildtypische Sequenz für diese Position (Abb. 3.15 B). Folglich ist der Basenaustausch bei Patient CRA_29 *de novo* entstanden.

3.2.5 Heterozygote *Frameshift*-Variante in *ERF* – c.151delG

Eine Kraniosynostose der Sagittalnaht führte bei Patientin CRA_34 zu einem Dolichocephalus. Weitere phänotypische Merkmale sind Hypertelorismus, beidseitiger Exophthalmus, revertierte Ohren und volle Lippen. Ihre Körpermaße im Alter von 10 Jahren und 7 Monaten waren: 130 cm Körpergröße (<3. P.), Gewicht 22,9 kg (<3. P.) und 52,2 cm Kopfumfang (25.-50. P.). Mit ihrer Körpergröße unter der 3. Perzentile ist sie als kleinwüchsig zu bezeichnen. Bei ihr wurde außerdem eine Lernstörung mit mangelnder Konzentrationsfähigkeit festgestellt. Die jüngere Schwester der Index Patientin zeigt einen sehr ähnlichen Phänotyp mit Dolichocephalus, Hypertelorismus, linkseitigem Exophthalmus, Fehlsichtigkeit und etwas breite Großzehen. Im Alter von 7 Jahren und 5 Monaten ist sie 114,5 cm (<3. P.) groß, 16,8 kg (<3. P.) schwer und hat einen Kopfumfang von 50,5 cm (10.-25. P.). Die motorische und sprachliche Entwicklung ist bei ihr leicht verzögert. Wie ihre Schwester hat sie eine Lernstörung mit Konzentrationsproblemen. Beide Eltern sind als phänotypisch unauffällig beschrieben (Abb. 3.16 B). Innerhalb der mütterlichen Familie gibt es jedoch noch weitere Personen, die von Exophthalmus betroffen sind.

Vor der Aufnahme in die Kraniosynostose Kohorte wurden bereits die kodierende Sequenz von *FGFR2* und Exon 7 von *FGFR3* durch das Diagnostiklabor ohne Befund sequenziert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Anreicherung mit dem *Nextera Rapid Capture* Kit mit anschließender Sequenzierung und Alignment mit dem Referenzgenom (GRCh37/hg19) auf dem MiSeq. Von den Zielsequenzen des Cranio Panels waren 97,2% mindestens 20x abgedeckt. Im Anhang D sind die Exons der Gene gelistet, die nicht vollständig abgedeckt waren. Die Lücken wurden nicht nachsequenziert. 19 Varianten wurden mit den Standardeinstellungen gefiltert. Als Klasse I Varianten wurden 9 bewertet und 9 als Artefakte identifiziert. Bei der verbliebenen Variante handelt es sich um eine heterozygote Nukleotiddeletion in Exon 2 von *ERF* (c.151delG, NM_006494, Abb. 3.16 A). Die Deletion hat eine Verschiebung des Leserasters zur Folge, sodass ein vorzeitiges Stopcodon entsteht (p.D51Tfs*26). Das verkürzte Protein wäre nur 76 Aminosäuren lang anstatt 549. Die Variante wird von MutationTaster als krankheitsverursachend bewertet. Da bei der Schwester der Patientin ein ähnlicher Phänotyp vorliegt, wurde eine Segregationsanalyse für diese Variante in der Familie durchgeführt

(Abb. 3.16 B). Die Sanger Sequenzierung bestätigte bei Patientin CRA_34 die Deletion. Innerhalb der Familie weisen die betroffene Schwester sowie der phänotypisch unauffällige Vater die Variante ebenfalls auf.

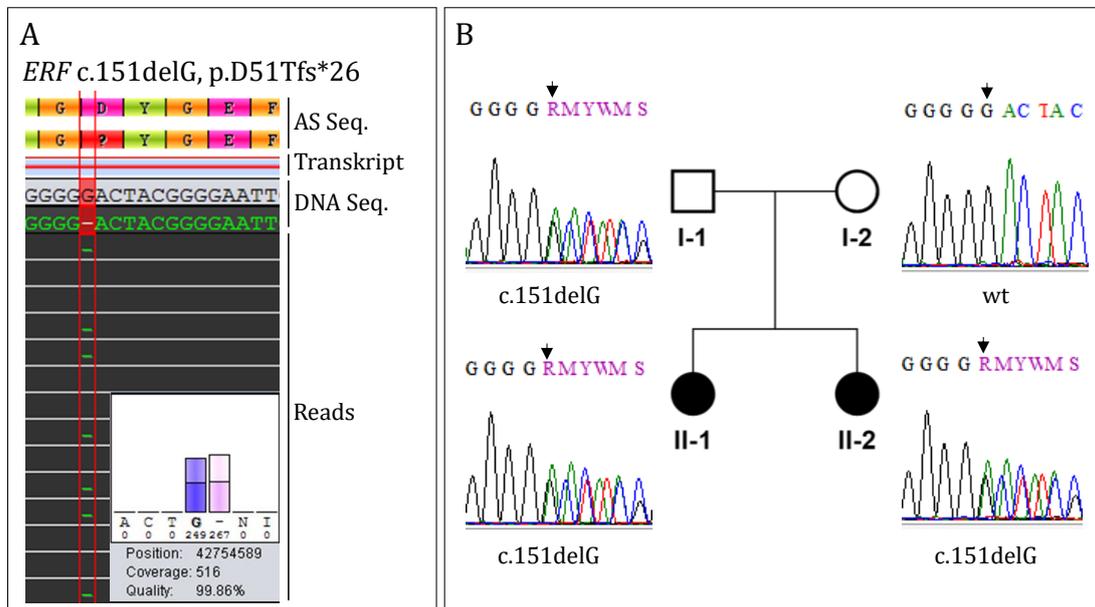


Abbildung 3.16: NGS Ergebnis der Patientin CRA_34 (II-1) und Segregationsanalyse. **A** *ERF* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.) ist sowohl die Referenzsequenz als auch die *ERF* Variante dargestellt. Einzelne Reads sind als schwarze Balken abgebildet. Grüne Striche in den Reads repräsentieren die Deletion des Nukleotids. Das Diagramm gibt Auskunft über die genomische Position auf Chromosom 19, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante. **B** Segregationsanalyse für *ERF* c.151delG. Die betroffenen Schwestern (II-1, II-2) sowie der phänotypisch unauffällige Vater haben die heterozygote Variante. Bei der Mutter liegt die wildtypische Sequenz vor.

3.2.6 Heterozygote *Missense*-Variante in *PTCH1* – c.3436G>A

Eine syndromale Form von Kraniosynostose lag bei Patient CRA_43 vor. Betroffen von der vorzeitigen Synostose war die Frontalnaht. An beiden Füßen waren die II. und III. Zehe miteinander verwachsen. Zusätzlich bestand eine Hexadaktylie des rechten Fußes. Weitere klinische Informationen lagen nicht vor. Soweit bekannt sind die Eltern gesund und nicht miteinander verwandt. Das Vorhandensein der Muenke Mutation in Exon 7 von *FGFR3* wurde durch das Diagnostiklabor ausgeschlossen. Die Zielsequenzen des Cranio Panels wurden mit dem *Nextera Rapid Capture* Kit angereichert. Die Sequenzierung und das Alignment mit der Referenzsequenz erfolgte mit dem MiSeq. Von den Zielsequenzen waren 96,6% mindestens 20x abgedeckt. Gene, in denen Lücken vorlagen, sind im Anhang D aufgeführt. Die lückenhaften Stellen wurden nicht nachsequenziert.

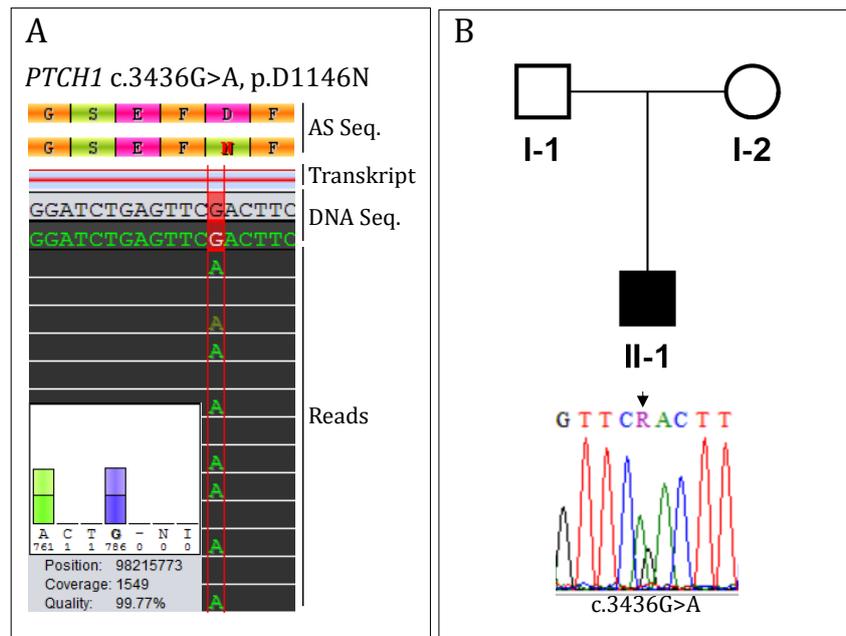


Abbildung 3.17: NGS Ergebnis und Stammbaum des Patienten CRA_43. **A** *PTCH1* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Dargestellt sind sowohl die Referenzsequenz als auch die veränderte Sequenz auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.) von *PTCH1*. Einzelne Reads sind als schwarze Balken abgebildet, in denen das veränderte Nukleotid grün markiert ist. Die genomische Position auf Chromosom 9, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante können dem Diagramm entnommen werden. **B** Stammbaum des Patienten. Der Basenaustausch wurde mit Sanger Sequenzierung bei Patient CRA_43 (II-1) bestätigt.

Die Variantenfilterung ergab 6 Varianten. Von diesen wurde eine Variante als Klasse III eingestuft, die restlichen in Klasse I/II. Der heterozygote Basenaustausch c.3436G>A liegt in Exon 20 des Gens *PTCH1* (NM_000264.4) und bewirkt eine Substitution der Aminosäure Asparaginsäure 1146 zu Asparagin (Abb. 3.17 A). Der Veränderung ist eine rs-Nummer zugeordnet (rs749542089), allerdings ist ihre Frequenz in der Bevölkerung sehr gering (0,001444% ExAC). Zu der Variante findet sich auch ein Eintrag in der ClinVar Datenbank (RCV000459818.1). Hier wird sie im Zusammenhang mit Gorlin Syndrom als Klasse III eingestuft. Die Vorhersageprogramme MutationTaster, SIFT (*score*: 0,04) und PolyPhen-2 (*score*: 0,861) bewerten die Substitution als krankheitsverursachend. Eine Analyse der elterlichen gDNAs war nicht möglich, sodass nicht geklärt werden konnte, ob die Variante vererbt wurde oder *de novo* entstanden ist. Die Variante konnte mit Sanger Sequenzierung bei Patient CRA_43 bestätigt werden (Abb. 3.17 B).

3.2.7 Heterozygote *Missense*-Variante in *MSX2* – c.442C>G

In der Familie von Index Patient CRA_48 (II-3) gibt es insgesamt drei Betroffene, die einen sehr ähnlichen Phänotyp, bestehend aus Kraniosynostose, Sehschwäche und verkürzten distalen Phalangen der Daumen, zeigen (Abb. 3.18 B). Patient CRA_48 hat eine Kraniosynostose der Lambdanaht, die nicht operativ korrigiert wurde und zu einem Turrizephalus mit fazialer

Asymmetrie führte. Sein Mittelgesicht ist flach. Die distalen Phalangen seiner Daumen wirken verkürzt. Röntgenbilder zur Bestätigung lagen jedoch nicht vor. Seine Sehschwäche äußert sich in Weitsichtigkeit, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung bei beiden Augen. Sein Hörvermögen ist normal. Im Alter von 7 Jahren lagen seine Körpermaße bei: 117,7 cm Körpergröße (10. P.), Gewicht 21 kg (25. P.) und 48,2 cm Kopfumfang (<3. P.). Ein MRT Scan des Kopfes zeigte eine Pachygyrie des rechten hemisphären Cortex. Seine sprachliche und motorische Entwicklung war verzögert. Zudem zeigt er Lernschwierigkeiten.

Bei seiner betroffenen Schwester (II-1) waren die Koronarnähte von der vorzeitigen Fusion betroffen. Eine Operation erfolgte im Alter von 2 Jahren. Ein Kopf MRT war unauffällig. Ihre Körpermaße im Alter von 14 Jahren waren: 157,1 cm Körpergröße (<25. P.), Gewicht 62 kg (>75. P.) und 52 cm Kopfumfang (<3. P.). Kraniofazial auffällig waren bei ihr eine milde Mikrozephalie, eine hohe Stirn, lateral abfallende Lidachsen sowie tief-sitzende Augen. Bei der augenärztlichen Untersuchung wurde bei ihr Weitsichtigkeit, Strabismus und Nystagmus festgestellt. Die distalen Phalangen von Daumen und Großzehen scheinen bei ihr ebenfalls verkürzt. Ihre Sprachentwicklung war verzögert und es liegt eine Lernschwäche vor.

Eine vorzeitige Fusion der Koronarnähte lag ebenfalls beim Vater (I-1) der beiden Geschwister vor. Auffällig waren bei ihm eine verknöcherte Foramina frontale, eine hohe Stirn, faziale Asymmetrie und lateral abfallende Lidachsen. Wie seine Kinder hat er eine Sehschwäche und verkürzte distale Phalangen der Daumen.

Das dritte Kind (II-2) und die Mutter (I-2) haben weder Kraniosynostose oder andere kraniofaziale Auffälligkeiten, noch verkürzte distale Phalangen der Daumen. Der Bruder hat jedoch wie seine betroffenen Geschwister eine Lernschwäche. Die Eltern sind nicht miteinander verwandt. Der Stammbaum der Familie (Abb. 3.18 B) lässt einen autosomal dominanten Erbgang vermuten.

Häufige Kraniosynostose Syndrome wurden bei Patient CRA_48 durch das Diagnostiklabor durch die Sequenzierung der Gene *TWIST1*, *FGFR2* und Exon 7 von *FGFR3* ausgeschlossen. Daraufhin erfolgte die Analyse seiner gDNA durch das NGS Kranio Panel. Angereichert wurden die Zielsequenzen mit *Nextera Rapid Capture*, die anschließend auf dem MiSeq sequenziert und die Sequenzierdaten mit Referenzsequenzen durch den MiSeq Reporter aligniert wurden. Von den Zielsequenzen waren 96,1% mindestens 20x abgedeckt. Die Lücken sind im Anhang D gelistet und wurden nicht durch Sanger Sequenzierung überprüft. 16 Varianten ergab die Variantenfilterung mit GensearchNGS, von denen 8 als Sequenzierartefakte identifiziert wurden. Weitere 7 Varianten wurden als Klasse I bewertet. Der Nukleotidaustausch c.442C>G in Exon 2 von *MSX2* (NM_002449.4) hingegen wurde von MutationTaster, SIFT (*score*: 0,04) sowie PolyPhen-2 (*score*: 0,998) als möglicherweise pathogen bewertet. Die konservierte Aminosäure Prolin 148 wird durch den Basenaustausch zu Alanin (Abb. 3.18 A). Es gibt keinen Eintrag in der Populationsdatenbank ExAC oder in ClinVar zu dieser Variante. Da der Vater und die Schwester

des Patienten CRA_48 einen ähnlichen Phänotyp haben, wurde bei der Familie eine Segregationsanalyse für die *MSX2* Variante durchgeführt (Abb. 3.18 B). Alle betroffenen Familienmitglieder haben ebenfalls heterozygot die Basensubstitution, der gesunde Bruder (II-2) hat jedoch die wildtypische Sequenz. Die Variante segregiert innerhalb der Familie mit dem Phänotyp und wurde von dem Vater an seine beiden betroffenen Kinder vererbt.

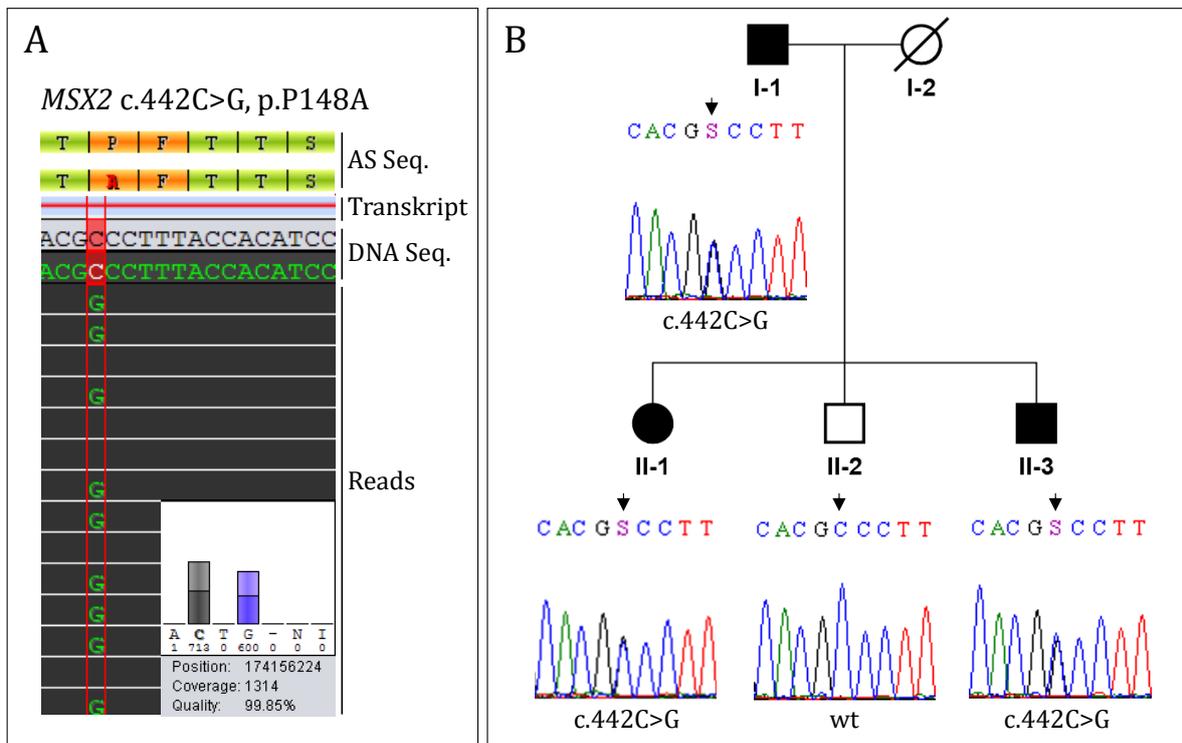


Abbildung 3.18: NGS Ergebnis des Patienten CRA_48 (II-3) und Segregationsanalyse. **A** *MSX2* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.) ist sowohl die Referenzsequenz als auch die Änderung in *MSX2* (c.442C>G, p.P148A) dargestellt. Einzelne Reads sind als schwarze Balken abgebildet. Der Basenaustausch nach Guanin ist grün hervorgehoben. Das untere Diagramm enthält Informationen über die genomische Position auf Chromosom 5, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante. **B** Stammbaum und Segregationsanalyse. Die beiden Geschwister II-1 und II-3 und der Vater I-1 sind klinisch betroffen und haben alle die heterozygote Veränderung. Der gesunde Bruder II-2 zeigt die wildtypische Sequenz.

3.2.8 Heterozygote *Missense*-Variante in *MEGF8* – c.5210C>G

Eine syndromale Form von Kraniosynostose besteht bei Patient CRA_49. Neben einer Trigonozephalie, abfallenden Lidachsen und stark gebogenen Augenbrauen waren besonders seine Hände und Füße auffällig. Die Finger II-V beider Hände waren von komplexen Syndaktylien betroffen. Die verdoppelten Daumen waren vollständig mit dem Zeigefinger verwachsen. Ebenfalls beidseitig lag eine rudimentäre ulnare Kleinfingerdopplung vor. An den Füßen waren die Großzehen verdoppelt und alle Zehen miteinander verwachsen. Zusätzlich fiel ein weiter Mamillenabstand, ein Hochstand beider Hoden sowie ein kleiner Penis auf. Seine beiden älteren Schwestern und die Eltern sind phänotypisch unauffällig.

Vor der Aufnahme in die Kraniosynostose Kohorte wurden verschiedene molekulargenetische Analysen durchgeführt. Die Syndaktylien an Händen und Füßen ließen eine Typ IV Syndaktylie

oder das Laurin-Sandrow Syndrom vermuten. Ursächlich hierfür sind Kopienzahlveränderungen in der *SHH* regulierenden Region ZRS in Intron 5 von *LMBR1*. Diese Region wurde durch qPCR und Sanger Sequenzierung analysiert und ergab einen unauffälligen Befund. In Folge wurde das Gen *GLI3* sequenziert. Mutationen in *GLI3* sind assoziiert mit Greig Zephalopolysyndaktylie Syndrom. Patienten mit diesem Syndrom haben Kraniosynostose und Polysyndaktylien. Die Sequenzierung bei Patient CRA_49 zeigte die wildtypische *GLI3* Sequenz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anschließend eine Array-CGH Analyse durchgeführt, deren Auswertung einen unauffälligen männlichen Befund ergab. Im nächsten Schritt wurden die Zielsequenzen des Cranio Panels in der Patienten gDNA durch das *SureSelect^{QXT}* Kit angereichert, mit dem MiSeq sequenziert und die Sequenzierdaten mit GensearchNGS mit dem Referenzgenom (GRCh37/hg19) aligniert und ausgewertet. Mindestens 20x abgedeckt waren 99,6% der Zielsequenzen. Lückenhafte Stellen sind im Anhang D aufgeführt und wurden mit Ausnahme von Exon 39 in *MEGF8*, nicht nachsequenziert. Die Filtereinstellungen für die Variantendetektion wurden so verändert, dass Varianten Balance > 5 festgelegt wurde. Von den 18 Varianten wurden 8 als Sequenzierartefakte und 9 als Klasse I-II Varianten eingestuft. Der heterozygote Basenaustausch c.5210C>A in dem Gen *MEGF8* (NM_001410) führt zu einem vorzeitigen Stopcodon in Exon 30, sodass das entstehende Protein nur 1737 AS statt 2779 AS lang wäre (p.S1737*, Abb. 3.19 A). Diese Variante hat keinen Eintrag in der Populationsdatenbank ExAC oder dbSNP und wird von MutationTaster als krankheitsverursachend bewertet. In der Literatur sind bisher keine Fälle mit heterozygoten Mutationen in *MEGF8* beschrieben, die mit Kraniosynostose assoziiert sind (TWIGG *et al.* 2012). Eine weitere, potentiell pathogene Variante im kodierenden Bereich von *MEGF8* liegt bei Patient CRA_49 allerdings nicht vor. Die CNV Analysefunktion von GensearchNGS wurde verwendet um einen Hinweis auf eine partielle Deletion von *MEGF8* zu erhalten. Hierbei wurde die durchschnittliche Abdeckung der Zielsequenzen bei Patient CRA_49 mit der von anderen Patienten verglichen. Es zeigten sich für *MEGF8* jedoch keine Unterschiede, die auf eine Deletion hindeuten könnten. Eine größere Deletion wurde bereits durch die Array-CGH Analyse ausgeschlossen.

Für die Variante c.5210C>A wurde eine Segregationsanalyse in der Familie durchgeführt. Die Schwestern des Patienten wurden jedoch nicht getestet. Die Auswertung ergab, dass die phänotypisch unauffällige Mutter ebenfalls Träger der Variante ist (Abb. 3.19 B). In Folge wurde untersucht, ob aufgrund des vorzeitigen Stopcodons ein Abbau der mRNA stattfindet und somit bei Patient und Mutter weniger *MEGF8* mRNA vorliegt oder ob trotz gleicher Variante ein Unterschied in der RNA Menge zwischen beiden besteht. Dies wurde durch qPCR untersucht. Hierfür wurde mRNA aus frischen peripheren Blutproben der Eltern und des Patienten isoliert und durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die qPCR wurden Exon übergreifende Amplikons für Exon 8, Exon 12a und Exon 30 erstellt. Exon 12a ist nur in Transkript NM_001271938 vorhanden. Für die endogenen Kontrollen wurden Amplikons in den

Haushaltsgenen *GAPDH* und *RPLPO* verwendet. Die cDNA des Vaters diente als Referenz. Nach der Auswertung zeigte sich, dass bei Patient CRA_49 und seiner Mutter eine reduzierte Menge an *MEGF8* mRNA im Blut vorhanden ist, es aber zwischen den beiden keinen Unterschied gibt (Abb. 3.19 C). Aufgrund der vorliegenden Daten wird der Basenaustausch als Variante mit unklarer klinischer Relevanz eingestuft (Klasse III).

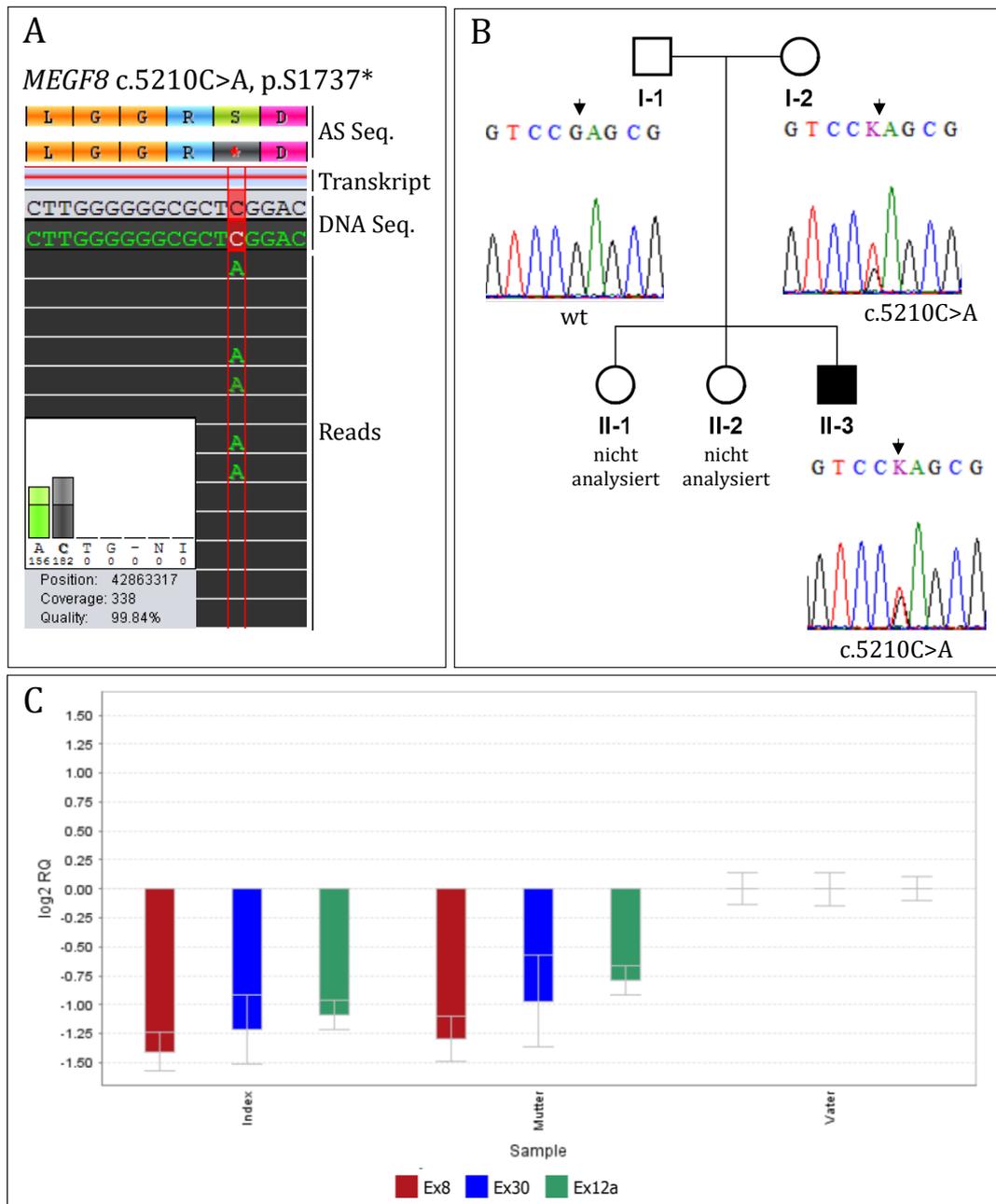


Abbildung 3.19: NGS Ergebnis von Patient CRA_49, Segregationsanalyse und *MEGF8* Expressionsanalyse. **A** *MEGF8* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Dargestellt sind sowohl die Referenzsequenz als auch die *MEGF8* Variante c.5219C>A auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.). Das veränderte Nukleotid ist grün in den einzelnen Reads markiert. Die genomische Position auf Chromosom 19, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante sind im Diagramm dargestellt. **B** Segregationsanalyse. Die Eltern und beide Schwestern sind gesund. Sequenziert wurden nur die Eltern und Patient CRA_49 (II-3). Die Mutter besitzt den gleichen heterozygoten Basenaustausch wie ihr Sohn. **C** Expressionsanalyse von *MEGF8* in peripherem Blut. Zur Detektion der *MEGF8* Transkripte (NM_001410/NM_001271938) wurden drei Amplikons erstellt (Ex8/9, Ex12a, Ex30). Die erhaltenen C-Werte wurden mit den endogenen Kontrollen *GAPDH* und *RPLPO* verrechnet und zu den Werten des Vaters ins Verhältnis gesetzt. Die erhaltenen RQ Werte sind logarithmisch als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt.

3.2.9 Heterozygote Nonsense-Variante in *TCF12* – c.1885C>T

Der Schädel von Patient CRA_56 hatte die Form eines Turribrachycephalus durch den vorzeitigen Verschluss beider Koronarnähte. Die Kraniosynostose wurde im Alter von 10 Monaten operiert. Neben einer eingesunkenen Nasenwurzel hat er keine weiteren klinischen Auffälligkeiten. Seine Eltern sind beide gesund und nicht miteinander verwandt. Durch das Diagnostiklabor wurden die häufigsten genetischen Ursachen, die mit Koronarnäht Kraniosynostose assoziiert sind, durch die Sequenzierung der Gene *FGFR2*, *TWIST1* und Exon 7 von *FGFR1* und *FGFR3* ausgeschlossen. Daraufhin wurde die gDNA des Patienten durch das Cranio Panel analysiert. Die Anreicherung wurde mit dem *Nextera Rapid Capture Kit* durchgeführt. Eine 20x Abdeckung hatten 95,9% der Zielsequenzen. Die Stellen, die Lücken aufwiesen, wurden nicht zusätzlich mit Sanger Sequenzierung kontrolliert (Anhang D). Die verwendeten Standardfilter in GensearchNGS ergaben 18 Varianten, von denen nur eine Variante als Klasse IV bewertet wurde. Eine heterozygote Nukleotidsubstitution (c.1885C>T) in Exon 19 des Gens *TCF12* (NM_207037.1) führt zu einem vorzeitigen Stopcodon (p.Q629*, Abb. 3.20 A). Die Variante ist nicht in ExAC gelistet und wird von MutationTaster als krankheitsverursachend eingestuft. Exon 19 wurde auch bei den Eltern des Patienten CRA_56 sequenziert. Die Variante ist bei dem Patienten *de novo* entstanden (Abb. 3.20 B).

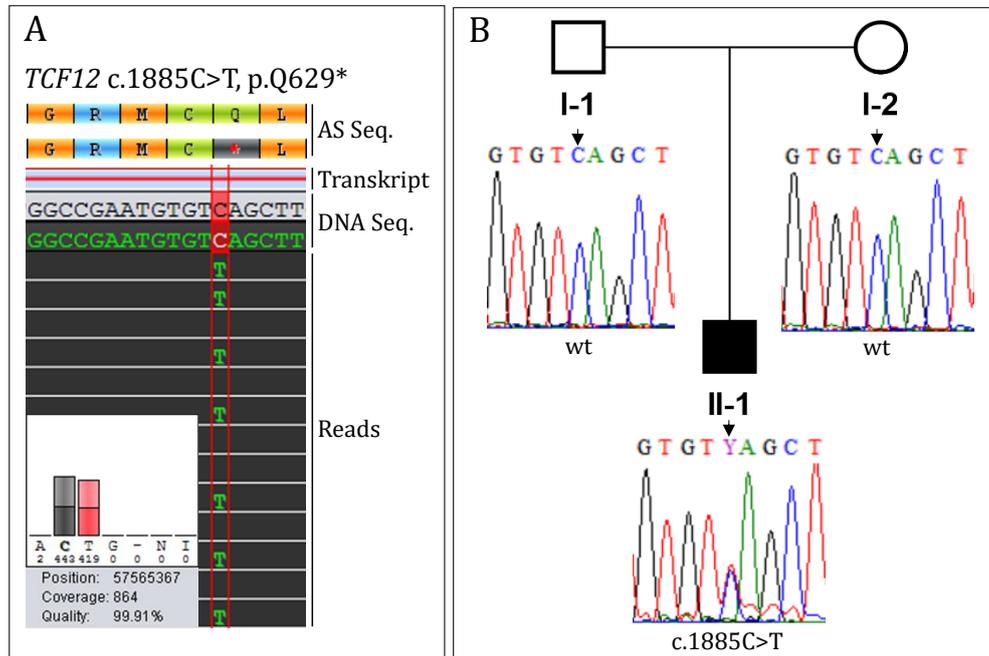


Abbildung 3.20: NGS Ergebnis des Patienten CRA_56 und Segregationsanalyse. **A** *TCF12* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Dargestellt sind sowohl die Referenzsequenz als auch die veränderte Sequenz auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.) von *TCF12*. Einzelne Reads sind als schwarze Balken abgebildet. Der Basenaustausch C>T ist grün markiert. Im Diagramm ist die genomische Position auf Chromosom 15, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante dargestellt. **B** Stammbaum und Segregationsanalyse. Der Basenaustausch ist bei Patient CRA_56 (II-1) *de novo* entstanden.

3.2.10 Heterozygote *Frameshift*-Variante in *TCF12* – c.825delG

Phänotypisch besonders auffällig war bei Patientin CRA_64 ihr Kleeblattschädel, der durch den Verschluss mehrerer Schädelnähte entstand. Zusätzlich lag bei ihr eine milde Mittelgesichtshypoplasie und beidseitiger Exophthalmus vor. Im Alter von 2 Monaten hatte sie ein Gewicht von 3.800 g (<3. P.), eine Körperlänge von 52 cm (<3. P.) und einen Kopfumfang von 37,7 cm (10.-50. P.). Eine Chiari Malformation mit Kleinhirntonsillen Tiefstand wurde durch eine MRT Untersuchung festgestellt. Sie ist das Kind phänotypisch unauffälliger und nicht miteinander verwandter Eltern. Molekulargenetisch wurden durch das Diagnostiklabor *FGFR2* und Exon 7 von *FGFR3* untersucht und waren unauffällig. Es folgte im Rahmen dieser Arbeit die Anreicherung der Kranio Panel Zielsequenzen mit dem *SureSelect^{QXT}* Kit (Agilent). Das Alignment der Sequenzierdaten mit dem Referenzgenom (GRCh37/hg19) und Auswertung der Abdeckung durch GensearchNGS ergab, dass 99,7% der Zielsequenzen mindestens 20x abgedeckt sind. Im Anhang D sind alle Exons aufgeführt, die nicht vollständig abgedeckt waren. Es erfolgte keine Nachsequenzierung von diesen Lücken. Von den 25 detektierten Varianten waren 11 Artefakte und 13 Klasse I-II Varianten.

Die verbliebene Variante ist eine heterozygote Basendeletion an cDNA Position 825 von *TCF12* (NM_207037.1). Die Deletion betrifft das letzte Nukleotid von Exon 10 (Abb. 3.21 A). Durch den Nukleotidverlust sind zwei *loss-of-function* Effekte möglich: aberrantes Spleißen durch Änderung der Spleißstelle oder eine Verschiebung des Leserasters. Die Spleißvorhersage der Software Alamut zeigt, dass ein Verlust des Spleißdonors möglich sein könnte. Auch das Programm HBond bewertet die wildtypische Spleißstelle (wt: UUG/GUAGGCUA) mit 11,90 höher als die veränderte Sequenz (var: UU_/GUAGGCUA) mit 8,90. Ein möglicher Effekt auf das Spleißen wurde durch Minigen Konstrukte untersucht (siehe 3.4.1 b). Bei einer Verschiebung des Leserasters käme es nach 13 Aminosäuren zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation (p.S276Vfs*12). Die Variante hat weder in ExAC noch dbSNP einen Eintrag. Von MutationTaster wird sie als krankheitsverursachend bewertet. Die Analyse der elterlichen gDNA ergab, dass die Variante bei der Tochter *de novo* entstanden ist (Abb. 3.21 B). Unter Berücksichtigung aller Daten wurde die Variante in Klasse IV eingestuft.

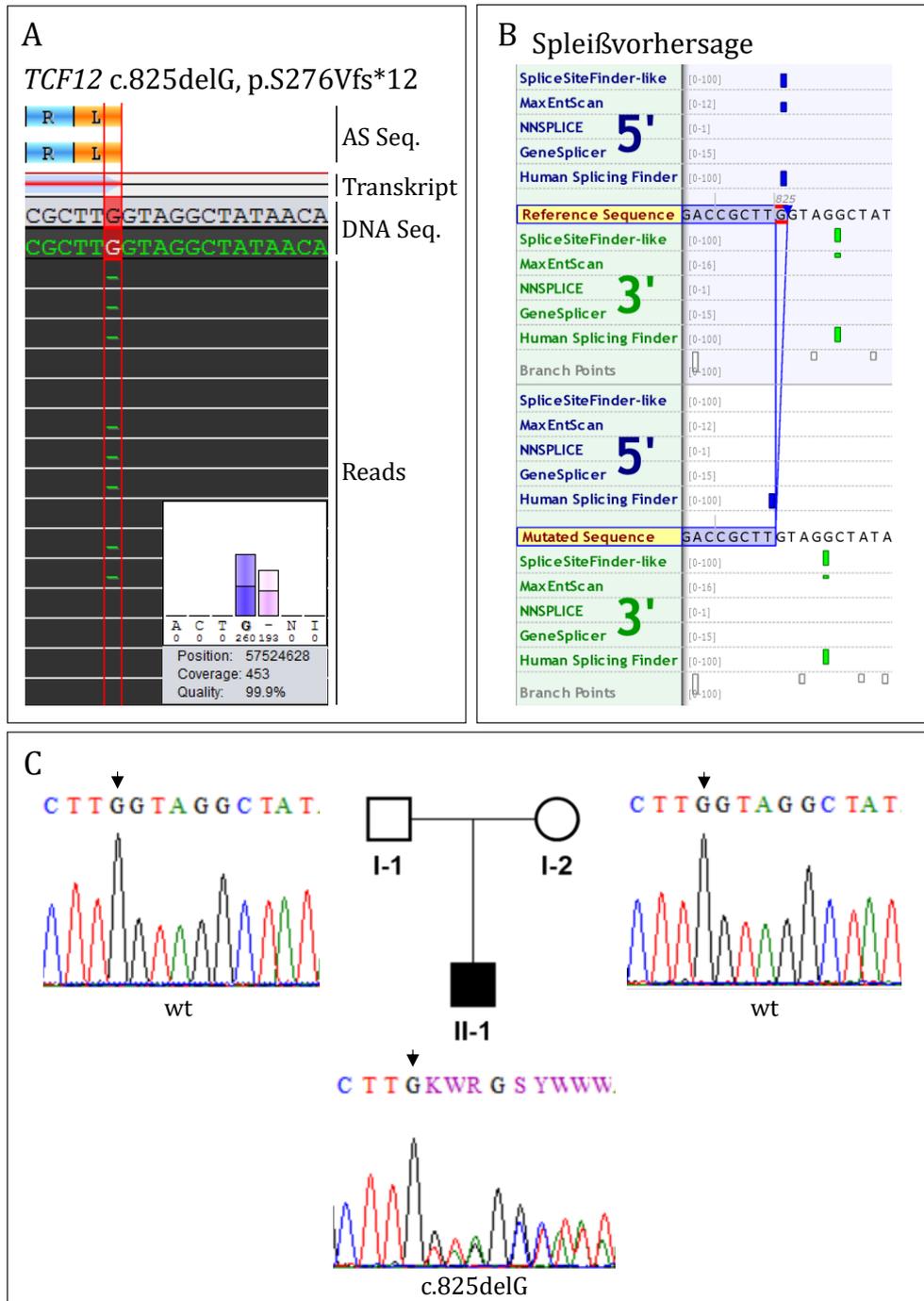


Abbildung 3.21: NGS Ergebnis von Patientin CRA_64, Spleißvorhersage und Segregationsanalyse. A *TCF12* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Dargestellt ist die Referenzsequenz und die *TCF12* Variante auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.). Schwarze Balken stellen die einzelnen Reads, auf denen die Deletion mit einem grünen Strich gekennzeichnet ist, dar. Das Diagramm gibt Auskunft über die genomische Position auf Chromosom 15, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante. B Ansicht der Spleißvorhersage der Software Alamut. Der obere Bereich zeigt die Vorhersage für die Referenzsequenz, unten für die veränderte Sequenz. Die Nukleotiddeletion führt dazu, dass die verwendeten Vorhersageprogramme die Spleißdonorstelle von Exon 10 schwächer einstufen oder nicht mehr erkennen (blaue Balken). C Segregationsanalyse in der Familie. Die Variante entstand bei Patientin CRA_64 (II-1) *de novo*.

3.2.11 Heterozygote Spleißvariante in *TCF12* – c.1036-1G>C

Ein Verdacht auf syndromale Kraniosynostose besteht bei Patientin CRA_80. Die Koronarnähte sind bei ihr vorzeitig fusioniert. Zusätzlich ist ihre sprachliche Entwicklung verzögert und sie hat Schwierigkeiten beim Lernen. Weitere klinische Informationen zu ihr oder ihren Eltern lagen nicht vor. Eine Karyotypisierung und *FGFR2* Sequenzierung ergaben normale Befunde. Die Anreicherung für das Cranio Panel erfolgte daraufhin mit *SureSelect^{QXT}* (Agilent).

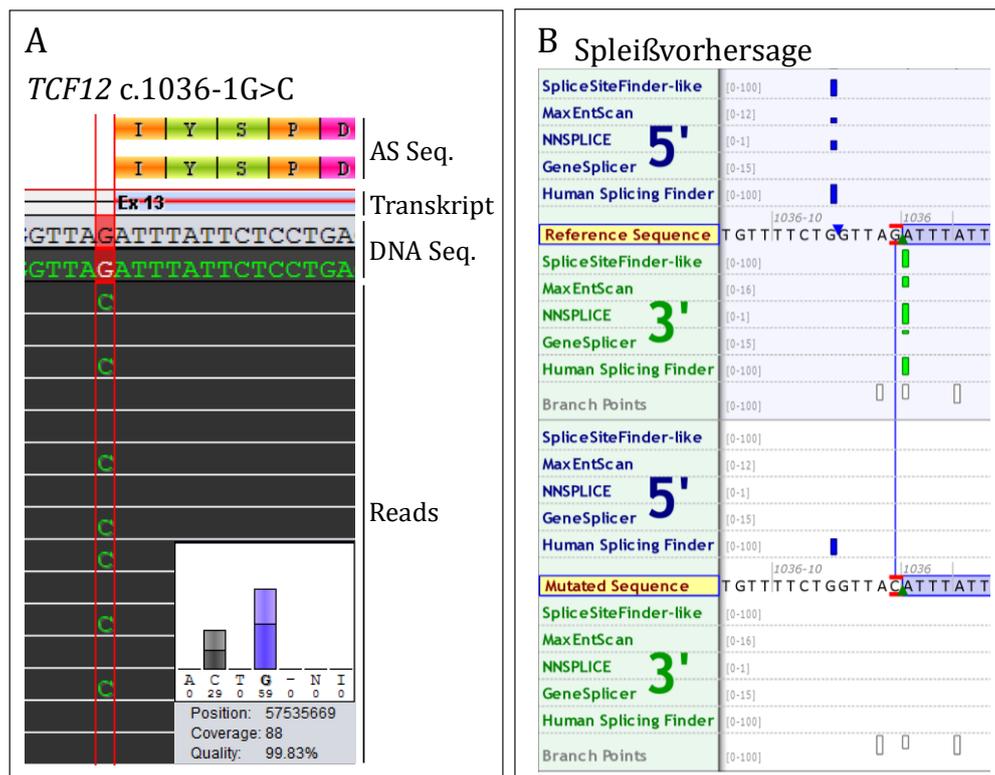


Abbildung 3.22: NGS Ergebnis von Patientin CRA_80, Spleißvorhersage und Segregationsanalyse. **A** *TCF12* Variantenansicht der Software GensearchNGS. Die Referenzsequenz und die *TCF12* Variante sind auf DNA- (DNA Seq.) und Proteinebene (AS Seq.) dargestellt. Der Basenaustausch G>C ist in den einzelnen Reads (schwarze Balken) grün markiert. Die genomische Position auf Chromosom 15, die Abdeckung, die Qualität und die Häufigkeit der Variante sind im Diagramm dargestellt. **B** Ansicht der Spleißvorhersage der Software Alamut. Der obere Bereich zeigt die Vorhersage für die Referenzsequenz, unten für die veränderte Sequenz. Die Basensubstitution führt dazu, dass die verwendeten Vorhersageprogramme den Spleißakzeptor von Exon 13 als nicht vorhanden einstufen (grüne Balken).

Nach der Sequenzierung wurden die Sequenzen mit GensearchNGS align und ausgewertet. Es zeigte sich, dass 99,4% der Zielsequenzen 20x abgedeckt sind. Eine Auflistung aller Lücken befindet sich im Anhang D. Sie wurden nicht nochmal mit Sanger Sequenzierung überprüft. Insgesamt wurden 31 Varianten herausgefiltert, von denen jedoch 17 Sequenzierartefakte und 13 Klasse I-II Varianten sind. Eine Variante in *TCF12* wurde in Klasse IV eingeordnet (Abb. 3.22 A). Der heterozygote Basenaustausch c.1036-1G>C liegt in Intron 12-13 (NM_207037.1) und bewirkt, dass der Spleißakzeptor so verändert wird, dass er möglicherweise von dem Spleißosom nicht mehr erkannt wird (Abb. 3.22 B). Zu der Variante sind keine Einträge in ExAC

und dbSNP vorhanden. Eine Segregationsanalyse war nicht möglich, da keine gDNA der Eltern zur Verfügung stand. Der mögliche Einfluss der Variante auf das Spleißen wurde in einem *in vitro* Spleißsystem untersucht (siehe 3.4.1 c).

3.3 Sequenzierung des *SMAD6* Gens und des *BMP2* Risikoallels

Nicht-syndromale Kraniosynostosen, die die Frontal- und Sagittalnaht betreffen, machen ca. 50% aller Kraniosynostose Fälle aus (WILKIE *et al.* 2017). Eine genetische Ursache ist jedoch in den seltensten Fällen bekannt. Timberlake *et al.* untersuchten eine Patientengruppe mit vorzeitiger Fusion der Frontal- oder Sagittalnaht mittels Exom Sequenzierung (TIMBERLAKE *et al.* 2016). Bei 7% der Patienten wurden mögliche pathogene Varianten in dem Gen *SMAD6* in Kombination mit einem Risikoallel in der Nähe des Gens *BMP2* (rs1884302 T>C) identifiziert, sodass eine digene Vererbung vermutet wurde. Da dies die erste Studie war, die diesen Zusammenhang zeigte, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kohorte aus 96 Patienten mit isolierter sagittal oder metopischer Kraniosynostose aus dem Kollektiv des humangenetischen Instituts erstellt. Von diesen Patienten hatten 51 eine Fusion der Sagittalnaht, 39 der Frontalnaht und 4 eine Fusion beider Nähte. Bei den Patienten P30 und P67 war unklar welche Suture neben der Sagittalnaht noch betroffen ist. Per Sanger Sequenzierung wurden die 4 Exons von *SMAD6* und der SNP rs1884302 der 96 Patientenproben analysiert. Beim Abgleich mit der *SMAD6* Referenzsequenz (NM_005585) wurden auch jeweils 25 bp der intronischen Sequenzen berücksichtigt, um eventuelle Spleißvarianten zu identifizieren. Im Anhang F sind von jedem Patienten die detektierten Varianten gelistet. Das *BMP2* Risikoallel „C“ tragen 68 der Patienten (70,8%). Die MAF des SNPs ist in der Populationsdatenbank 1000Genomes mit 42% angegeben. In der *SMAD6*-Kohorte trat das Allel deutlich häufiger auf. Insgesamt wurden 11 verschiedene *SMAD6* Varianten detektiert. Diese sind mit ihrer Häufigkeit, rs-Nummer und Bewertung durch die Vorhersageprogramme MutationTaster, PolyPhen-2 und SIFT in Tabelle 3.6 gelistet. Von diesen wurden 7 in Klasse I-II und 4 in Klasse IV eingestuft. Die Klasse IV Varianten sind in Tabelle 3.6 hervorgehoben und werden im Folgenden ausführlicher beschrieben.

Tabelle 3.6: *SMAD6* Varianten der *SMAD6*-Kohorte

Variante	Häufigkeit	MAF ¹	rs-Nummer	MntTaster	PolyPhen-2	SIFT	ClinVar/HGMD
c.1-24insA	1/96	-	-	-	-	-	-
c.120C>T, p.G40G	9/96	3,50%	rs149612008	-	-	-	RCV000231139.3
c.253C>T, p.R85C	3/96	-	rs1056072996	D	PD (0,483)	T (0,13)	RCV000549271.1
c.264C>G, p.G88G	1/96	0,03%	rs547033777	-	-	-	RCV000234214.1

c.465-471del, p.G156Vfs*23	1/96	-	-	-	-	-	CD17121333
c.587A>G, p.E196G	1/96	-	rs746122297	D	D (0,997)	D (0,03)	-
c.619C>T, p.L207L	1/96	-	-	-	-	-	-
c.711C>T, p.H237H	4/96	1%	rs144415105	-	-	-	RCV000470932.2
c.802C>G, p.R268G	1/96	-	rs780080560	D	D (1,000)	D (0,02)	-
c.875-22C>A	52/96	22,7%	rs2278604	-	-	-	-
c.1172T>C, p.I391T	1/96	-	-	D	D (0,872)	D (0,01)	-

¹ = ExAC; - = keine Daten/keine Bewertung möglich; D = *damaging*, PD = *possibly damaging*

a) Patient P06

Eine vorzeitige Fusion der Frontalnaht lag bei Patient P06 vor. Das humangenetische Diagnostiklabor hatte eine *FGFR3* Sequenzierung durchgeführt, die unauffällig war. Die Sequenzierung des *SMAD6* Gens ergab die drei Varianten c.120C>T, c.802C>G und c.875-22C>A. Die Varianten c.120 und c.875-22 sind als SNPs einzustufen. Der heterozygote Basenaustausch an cDNA Position 802 führt auf Proteinebene zu einem Austausch von Arginin 268 nach Glycin. Dies wird von MutationTaster, PolyPhen-2 (*score*: 1,0) und SIFT (*score*: 0,02) einheitlich als möglicherweise pathogen bewertet. Die Aminosäure ist sehr konserviert, unter anderem in Maus, Zebrafisch, Drosophila oder *C. elegans*. Zu der Variante sind keine MAF Daten in ExAC hinterlegt. Die Auswertung der *BMP2* Risikoallel Sequenzierung ergab, dass der Patient P06 an dieser Position das wildtypische Allel „T“ besitzt. Eine Analyse der Eltern war nicht möglich.

b) Patientin P16

Patientin P16 ist ebenfalls von einer Frontalnahtsynostose betroffen. Die Standardsequenzierung von *FGFR1*, *FGFR2* und *FGFR3* durch das Diagnostiklabor war ohne Befund. Neben dem SNP c.120C>T wurde bei ihr noch eine heterozygote Deletion von 7 bp in *SMAD6* detektiert. Die Deletion c.465-471 bewirkt eine Leserasterverschiebung, sodass bei der Translation 23 Aminosäure später ein Abbruch erfolgt (p.G156Vfs*23). In der Mutationsdatenbank HGMD ist diese Variante bereits aufgeführt (CD17121333) und wurde von Timberlake et al. publiziert (TIMBERLAKE *et al.* 2017). Die Patientin hat das *BMP2* Risikoallel. Eine Segregationsanalyse bezüglich der Varianten konnte nicht durchgeführt werden, da keine elterlichen Proben zur Verfügung standen.

c) Patient P75

Eine Kraniosynostose der Sagittalnaht wurde bei Patient P75 festgestellt. Die Sequenzierung der Gene *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* und *TWIST1* durch das Diagnostiklabor ergaben keine pathogenen Varianten. Die Auswertung der *SMAD6* Sequenzierung ergab neben den SNPs c.619C>T und c.875-22C>A zwei Varianten, die als Klasse IV eingestuft wurden (c.587A>G, c.1173T>C). Der Basenaustausch c.587A>G führt auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch p.E196G, der von MutationTaster, PolyPhen-2 (*score*: 0,997) und SIFT (*score*: 0,03) als möglicherweise pathogen eingestuft wird. Die Aminosäure Glutaminsäure an 196 ist konserviert in Maus und Zebrafisch. In ExAC ist zu dieser Variante noch kein Eintrag vorhanden. Die zweite Variante c.1172T>C wird ebenfalls von MutationTaster, PolyPhen-2 (*score*: 0,872) und SIFT (*score*: 0,01) als schädigend bewertet und resultiert in einem Austausch der Aminosäure Isoleucin 391 durch Threonin (p.I391T). Bei Maus, Huhn und *Xenopus* ist Isoleucin an dieser Position konserviert. Die Aminosäure ist in der MH2 Domäne des Proteins lokalisiert. Diese Domäne vermittelt die Heterodimerbildung von SMAD6 mit Rezeptor-SMADs und ist somit wichtig für die Inhibition der BMP vermittelten SMAD-Signalübertragung. Ein Aminosäureaustausch an Position 390 (p.G390C) wurde bereits bei einem anderen Patienten mit Frontalnahtsynostose detektiert (TIMBERLAKE *et al.* 2017). Patient 75 besitzt zusätzlich das *BMP2* Risikoallel. Elterliche gDNAs waren für eine Analyse nicht vorhanden.

3.4 Funktionelle Analysen

Um Sequenzvarianten oder Kopienzahlveränderungen besser beurteilen zu können, wurden für einige erste funktionelle Analysen durchgeführt. Potentielle Spleißvarianten wurden mit einem Minigensystem untersucht. Für die Gene *FGF10* und *HUWE1* wurden Analysen mit dem Tiermodell *Danio rerio* durchgeführt.

3.4.1 Analyse von Spleißsequenzvarianten durch ein *in vitro* Minigensystem

Von den 66 durch das Kranio Panel analysierten Fällen wurden bei drei Patienten Varianten detektiert, die Spleißstellen betreffen und als potentiell pathogen eingestuft wurden. Grundlage für die Klassifizierung waren bioinformatische Vorhersageprogramme, die in den meisten Fällen eine Abweichung von der Konsensussequenz der Spleißstelle beurteilen. Überprüfen lässt sich ein Effekt auf das Spleißmuster durch eine Analyse der Patienten mRNA. In vielen Fällen ist es jedoch nicht möglich eine weitere Blutprobe des Patienten zu erhalten oder das Gen wird nicht im Blut exprimiert, sodass eine solche Untersuchung nicht möglich ist. Mit Hilfe eines Minigensystems kann *in vitro* die Auswirkungen der Sequenzänderung auf das Spleißen analysiert werden. Der Vektor pSPL3b enthält zwei artifizielle Exons (A und B), zwischen die weitere Exon- und Intronsequenzen eingebracht werden können. Hierbei findet immer ein

Vergleich der wildtypischen Spleißstelle mit der veränderten Stelle statt, sodass es nötig ist für jede Variante zwei Konstrukte zu erstellen. Nach der Transfektion in humane Zellen und der Isolation der mRNA, können durch PCR und Sequenzierung Effekte durch die Sequenzänderung auf das Spleißen innerhalb dieses Systems analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Sequenzvarianten mit diesem Minigensystem untersucht.

a) Variante *MEGF8* c.828G>A

Die Brüder CRA_18 und CRA_19 haben eine homozygote Spleißvariante in *MEGF8* (c.828G>A; NM_001410; siehe 3.2.3). Die Nukleotidveränderung bewirkt, dass Vorhersageprogramme den Spleißdonor von Exon 5 als schwächer bewerten und dieser möglicherweise vom Spleißosom nicht mehr erkannt wird. Eine Blutprobe der Patienten für die Präparation von RNA stand nicht zur Verfügung, sodass für Exon 5 Minigen-Konstrukte erstellt wurden. Hierfür wurde sowohl ein wildtypisches (WT: c.828G) als auch ein verändertes (Var: c.828A) 386 bp Fragment amplifiziert, das aus 73 bp Intron 4-5, 89 bp Exon 5 und 224 bp Intron 5-6 bestand, und in den pSPL3b Vektor eingebracht (Abb. 3.23 A; Anhang G). Der Leervektor diente als Kontrolle. Nach Transfektion, RNA Isolation und cDNA Synthese wurde eine PCR mit den Vektor-spezifischen Primern SD6 und SA2 durchgeführt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte lässt erste Rückschlüsse auf das Spleißverhalten zu: RNA, die nur die beiden artifiziellen Exons A und B enthält, ergibt ein ca. 260 bp großes Fragment; ist zusätzlich noch das *MEGF8* Exon 5 enthalten, so liegt die Größe des PCR Produkts bei ca. 350 bp. Die Kontrolle zeigte in der Gelelektrophorese eine ungefähr 300 bp große Bande (Abb. 2.23 B). Ein größeres und kleineres Fragment lag bei WT vor, bei Var hingegen war nur die kleinere Bande sichtbar (Abb. 3.23 B). Dies zeigt, dass die Variante im Vergleich zur wildtypischen Sequenz eine Spleißänderung im *in vitro* System bewirkt. Die PCR Produkte wurden für eine genauere Analyse sequenziert. Hierfür wurden die beiden Banden von WT gelelektrophoretisch aufgereinigt. Die Sequenzierung zeigte, dass es sich bei den ca. 300 bp großen Produkten aller Konstrukte um die Exons A und B des Vektors handelt (Abb. 3.23 C Var). Die große Bande von WT hingegen enthielt die vollständige Sequenz von *MEGF8* Exon 5 flankiert von den Exons A und B (Abb. 3.23 C). Die Variante c.828G>A bewirkt somit im *in vitro* System, dass das Spleißmuster so geändert wird, dass Exon 5 herausgespleißt wird (engl. *exon skipping*). Allerdings findet dies auch zum Teil mit dem wildtypischen Spleißdonor statt, da WT auch das kleinere Spleißprodukt aufwies.

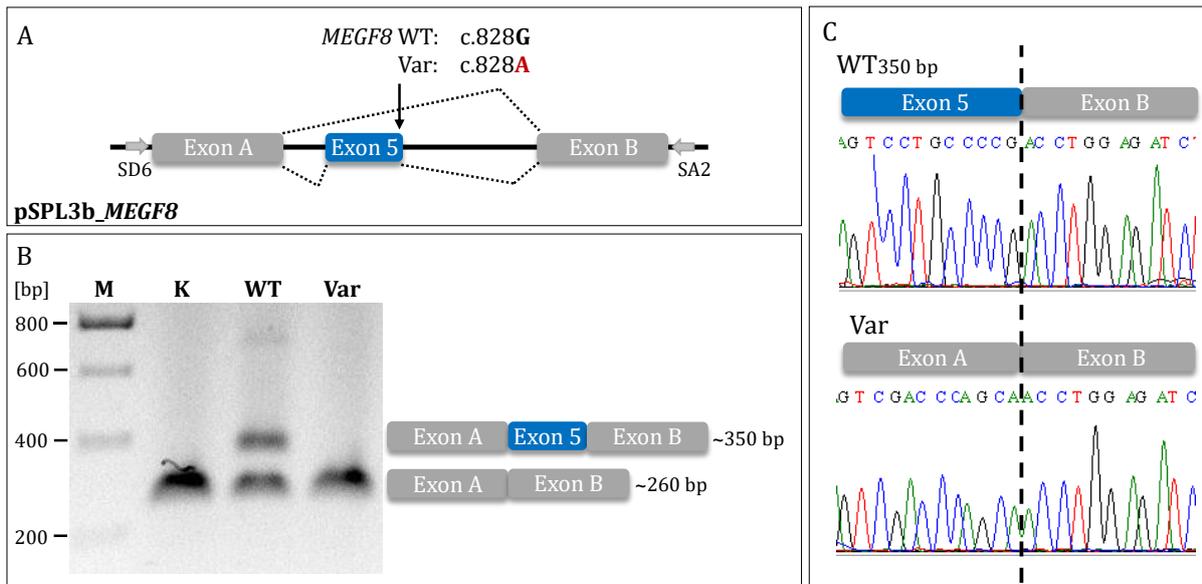


Abbildung 3.23: In vitro Spleißanalyse der Variante *MEGF8* c.828G>A. **A** Schematische Darstellung von *pSPL3b_MEGF8*. In das Minigenkonstrukt wurde Exon 5 von *MEGF8* und flankierende intronische Sequenzen einkloniert (NM_001410). Es wurde sowohl die wildtypische (WT) als auch die veränderte (Var) Sequenz eingebracht. Mögliche Spleißmuster sind durch gestrichelte Linien dargestellt. HEK293T Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert, anschließend die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. **B** Auswertung durch Gelelektrophorese. Die cDNA von Zellen des Kontroll-Plasmids (K), WT und Var diente als Template für eine PCR mit den Vektor-spezifischen Primern SD6 und SA2. WT zeigt zwei unterschiedlich große Banden. Var eine Bande der gleichen Größe wie K. **C** Auswertung durch Sequenzierung. Die PCR Produkte wurden aufgereinigt und sequenziert. Ein Vergleich der Variante und des WT zeigt, dass bei der Variante c.828G>A nur Vektorsequenzen vorliegen.

b) Variante *TCF12* c.825delG

In dem Gen *TCF12* wurde bei Patientin CRA_64 eine 1 bp Deletion identifiziert (c.825delG). Der Nukleotidverlust betrifft das letzte Nukleotid von Exon 10. Neben einer Leserasterverschiebung (p.S276Vfs*12) wäre auch eine Änderung des Spleißmusters möglich, da durch den Verlust die Spleißdonor Sequenz verändert wird (siehe 3.2.10). Das Spleißverhalten wurde daraufhin in dem Minigenesystem untersucht. Dafür wurde Exon 10 sowie 491 bp des Introns 9-10 und 213 bp des Introns 10-11 amplifiziert und in den Vektor *pSPL3b* eingebracht. Es wurde sowohl ein wildtypisches als auch ein verändertes Konstrukt erstellt (Abb. 3.24 A, Anhang G). Es folgte die Transfektion von HEK293T Zellen, RNA Isolation und cDNA Synthese. Der Leervektor wurde als Kontrolle verwendet. Die Produkte der PCR aus cDNA und Vektorprimern SD6 und SA2 wurden zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.24 B). Hierbei zeigte sich, dass sowohl bei WT als auch bei Var zwei Banden vorliegen: eine ca. 260 bp Bande, die der Bande der Kontrolle entsprechen könnte, und eine ca. 400 bp Bande, die Exon 10 enthalten könnte. Die gelelektrophoretische Analyse zeigte kein Unterschied zwischen WT und Var. Daraufhin erfolgte eine Gelaufreinigung der einzelnen Banden und anschließend die Sequenzierung dieser. Die Auswertung ergab, dass die ca. 260 bp Bande bei allen Konstrukten den Exons A und B des Vektors entspricht. Ein Unterschied zeigte sich jedoch bei den größeren Spleißprodukten. Die vollständige Exon 10 Sequenz flankiert von Exon A und B konnte bei WT nachgewiesen werden

(Abb. 3.24 C). Der Nukleotidverlust in dem Var Konstrukt hingegen führt dazu, dass ein alternativer Spleißdonor verwendet wird. Dieser bewirkt, dass 22 bp des Introns 10-11 im Spleißprodukt enthalten sind (Abb. 3.24 C). Innerhalb dieser Sequenz würde ein vorzeitiges Stopcodon (*) entstehen.

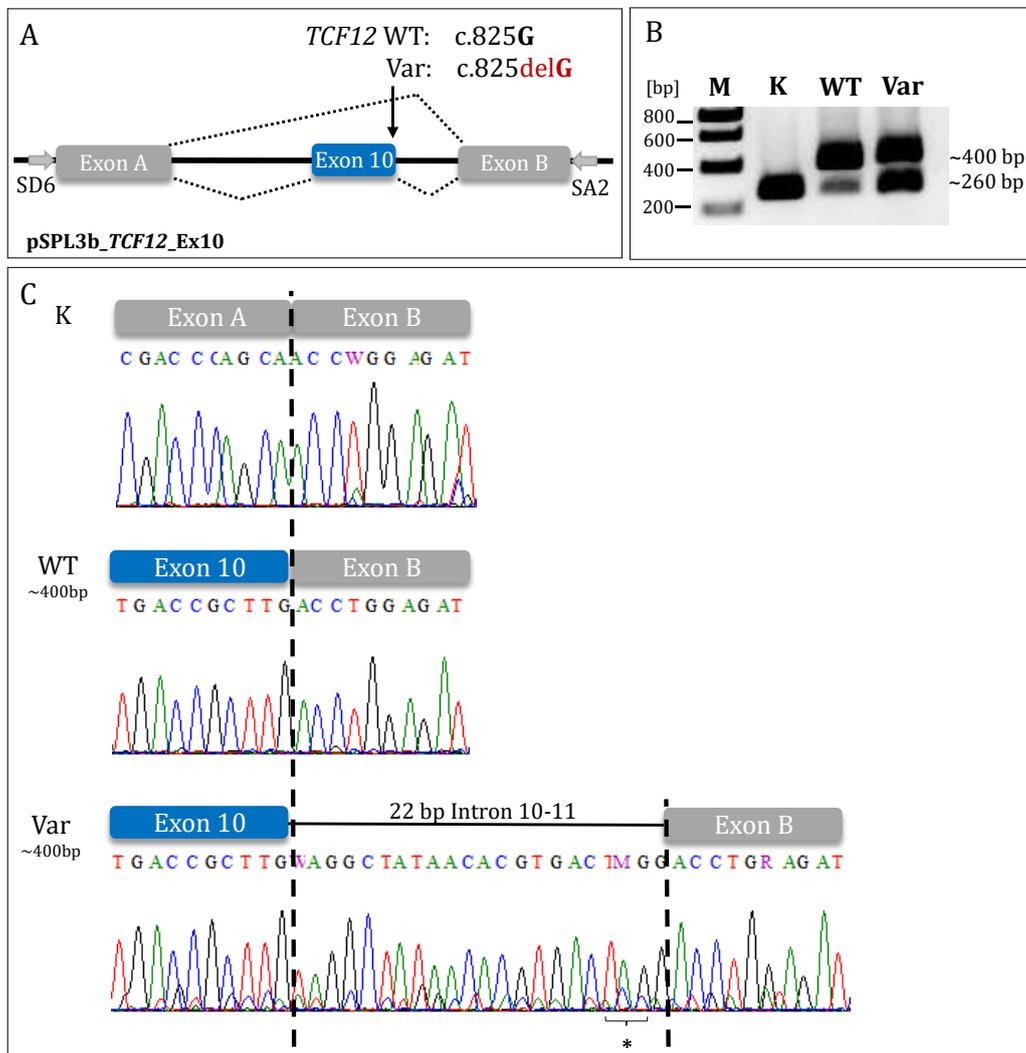


Abbildung 3.24: In vitro Analyse der potentiellen Spleißvariante *TCF12* c.825delG. A Schema von pSPL3b_ *TCF12*_Ex10. Exon 10 und umgebende Intron-Sequenzen des Gens *TCF12* (NM_207037.1) wurden in den Vektor pSPL3b inkloniert. Es wurde ein wildtypisches (WT) und ein verändertes (Var) Konstrukt erstellt, mit denen HEK293T Zellen transfiziert wurden. Anschließend wurde aus diesen Zellen mRNA isoliert und eine cDNA Synthese erfolgte. Der Leervektor diente als Kontrolle (K). Theoretische Spleißprodukte sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. B Gelelektrophoretische Auswertung. Die Produkte der PCR mit den Vektorprimern SD6 und SA2 wurden auf einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. WT und Var zeigen je zwei Banden (ca. 260 bp und ca. 400 bp), von denen die untere Bande auf Höhe der Kontrolle läuft. C Sanger Sequenzierung der Spleißprodukte. Die ca. 260 bp große Bande aller Konstrukte entspricht den Vektor spezifischen Exons A und B. Der Vergleich der ca. 400 bp großen Bande von WT und Var zeigt, dass durch den Nukleotidverlust ein alternativer Spleißdonor genutzt wird. Das entstehende Spleißprodukt beinhaltet 22 bp intronische Sequenz, die ein vorzeitiges Stopcodon (*) enthält.

c) Variante *TCF12* c.1036-1G>C

Mit der Klasse IV Variante von Patientin CRA_80 (3.2.11) wurde ebenfalls eine Spleißanalyse durchgeführt. Der Basenaustausch liegt im Intron 12-13 von *TCF12* (c.1036-1G>C, NM_207037.1) und verändert die Spleißakzeptor Sequenz so, dass Spleißvorhersage

Programme die veränderte Sequenz nicht mehr als Akzeptorstelle erkennen. Eine Änderung im Spleißmuster ist zu erwarten. Für das Minigensystem wurde das 79 bp große Exon 13 und jeweils ca. 500 bp der umgebenden Introns amplifiziert und in den Vektor pSPL3b einkloniert. Es wurde ein wildtypisches (WT, c.1036-1G) und ein verändertes (Var, c.1035-1C) Konstrukt erstellt (Abb. 3.25 A, Anhang G). Als Kontrolle wurde der Leervektor verwendet. U2OS Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert, nach 24 h RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach der PCR mit den Primern SD6 und SA2 wurden die Produkte zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.25 B). Die Kontrolle zeigte eine Bande, deren Größe dem erwarteten Produkt von Exon A und B entsprach (ca. 260 bp). Die PCR-Produkte von WT und Var waren größer als die Kontroll-Bande. Es hatte jedoch den Anschein, dass diese beiden nicht gleich groß sind, sondern das PCR Produkt von Var kleiner als das von WT ist. Für die Analyse, ob zwischen den WT und Var Spleißprodukten ein Unterschied besteht, wurden die PCR Fragmente sequenziert. Die Kontrolle enthält nur Exon A und B Sequenzen, WT noch zusätzlich die vollständige Sequenz von Exon 13 (Abb. 3.25 C). Es zeigte sich jedoch, dass die Sequenzierung des Var Fragments überlagerte Sequenzen ergab, die nicht auswertbar waren. Daraufhin wurden die Var Produkte über unspezifische TA-Klonierung in den pCRII Vektor ligiert, um so die vorliegenden Spleißprodukte identifizieren zu können. DH5 α Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und über Nacht auf Ampicillin LB-Agarplatten selektioniert. Eine PCR und anschließende Sequenzierung erfolgte mit den Primern M13fwd und M13rev und den Einzelkolonien als Template. Die Analyse von 22 Kolonien ergab, dass der Basenaustausch c.1036-1G>C das Spleißmuster *in vitro* ändert und zwei alternative Spleißprodukte entstehen (Abb. 3.25 C Var1/Var2). Bei beiden wird Exon 13 verkürzt und sie unterscheiden sich um drei Nukleotide. Mit dem Human Splicing Finder (HSF3) Programm wurde die Exon 13 Sequenz auf kryptische Spleißstellen hin analysiert. Hierbei werden potentielle Spleißstellen verglichen mit der Konsensussequenz eines Akzeptors (kon: (C/U)₁₂₋₁₇NCAG/G) und bewertet (kon: 100). Das Programm identifizierte 4 kryptische Akzeptorstellen in Exon 13 mit der potentiell neuen Exongrenze an folgenden cDNA Positionen: 1) c.1059 (HSF3: 80,25), 2) c.1062 (HSF3: 81,85), 3) c.1065 (HSF3: 72,81) und 4) c.1091 (HSF3: 80,61). Im *in vitro* System wurden nur die alternativen Stellen 1) und 2) genutzt, dies entspricht genau den Spleißprodukten Var1 und Var2 (Abb. 3.25 C). Von den 22 analysierten Kolonien hatten 9 ein Plasmid mit Var1 und 13 ein Plasmid mit Var2 aufgenommen. Dies passt zu den bioinformatischen Ergebnissen von HSF3, das die beiden kryptischen Akzeptorstellen als ungefähr gleich stark bewertete. Die Nutzung des Akzeptor 1) hätte eine Leserasterverschiebung zur Folge (p.S353Qfs*1), wohingegen ein Stopcodon (p.S354*) durch Akzeptor 2) entstehen würde. In beiden Fällen würde TCF12 verkürzt vorliegen. Mit dem Minigensystem konnte gezeigt werden, dass die Variante von Patientin CRA_80 zu einem geänderten Spleißmuster führt und unterstützt die Einstufung des Basenaustauschs als krankheitsverursachende Variante.

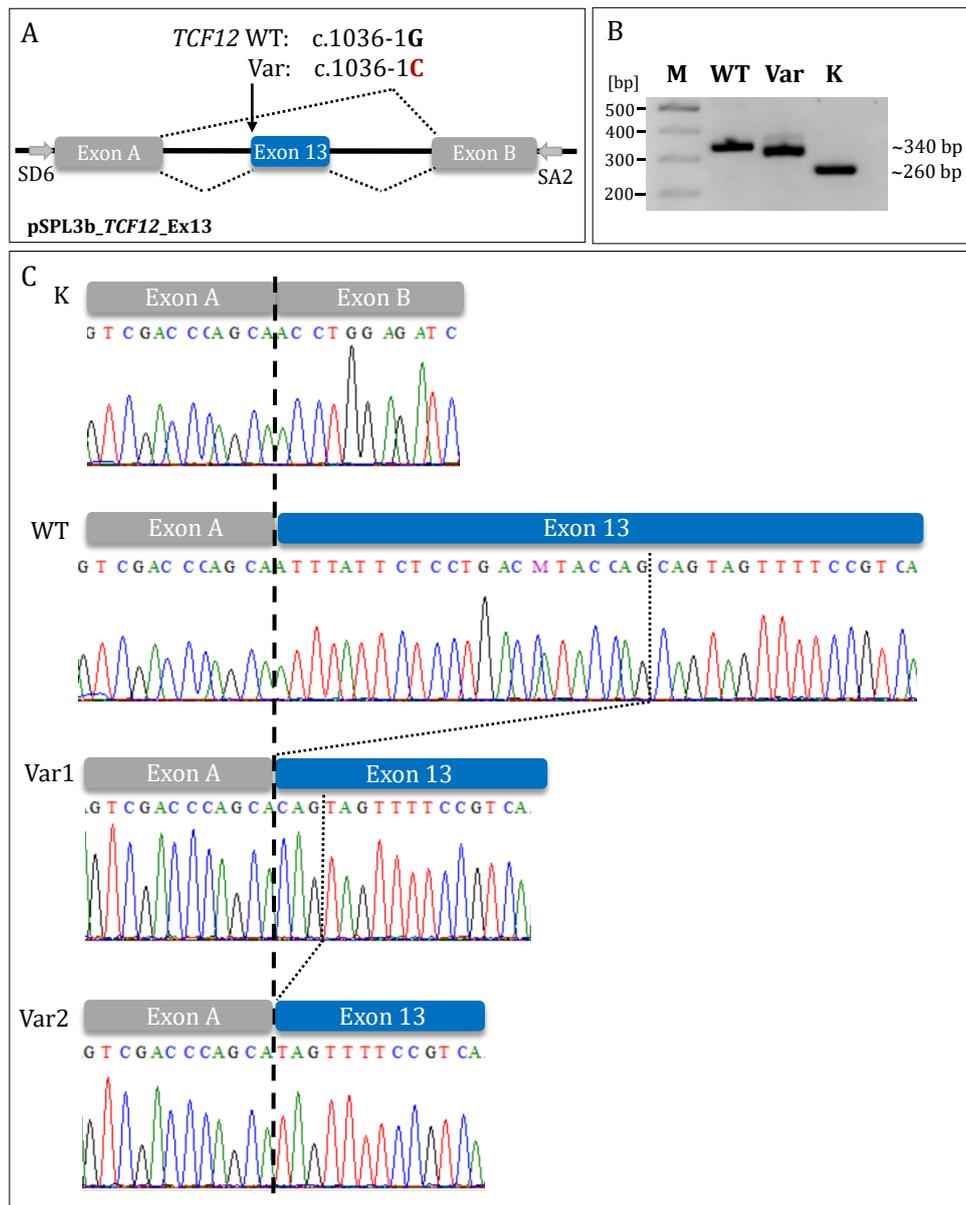


Abbildung 3.25: In vitro Spleißanalyse der Variante *TCF12* c.1036-1G>C. **A** Schema von pSPL3b_*TCF12*_Ex13. In den Vektor pSPL3b wurde Exon 13 und umgebende Intron-Sequenzen des Gens *TCF12* (NM_207037.1) eingebracht. Es wurde ein wildtypisches (WT) und ein verändertes (Var) Konstrukt erstellt, U2OS Zellen transfiziert und anschließend mRNA isoliert. Als Kontrolle (K) wurde der Leervektor verwendet. Mögliche Spleißprodukte sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. **B** Gelelektrophoretische Auswertung. Die Produkte der PCR mit den Vektorprimern SD6 und SA2 wurden auf einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Kontrolle zeigt eine ca. 260 bp große Bande. Die Banden von WT und Var laufen deutlich höher, unterscheiden sich jedoch beide leicht in ihrer Größe. **C** Sanger Sequenzierung der Spleißprodukte. Die Kontrolle enthält nur die Sequenz der Exons A und B, WT hingegen enthält zusätzlich die vollständige Sequenz von Exon 13 von *TCF12*. Das PCR Produkt von Var wurde für die Sequenzierung in den Vektor pCRII inkloniert. Die Sequenzanalyse ergab, dass durch die Variante c.1036-1G>C zwei unterschiedliche Spleißprodukte (Var1 und Var2) entstehen, die beide ein verkürztes Exon 13 beinhalten.

3.4.2 Expressionsmuster und Überexpression von *fgf10a* in *Danio rerio*

Durch Array-CGH wurde eine 28,2 Mb große Duplikation auf Chromosom 5 bei Patient CRA_10 detektiert (3.1.2). Von der Duplikation sind über 130 Gene betroffen. Im Bezug auf die vorliegende Kraniosynostose ist vor allem das Gen *FGF10* interessant. FGF10 ist unter anderem ein Ligand des Rezeptors FGFR2. *Gain-of-function* Mutationen des Rezeptors sind mit mehreren Kraniosynostose-Syndromen assoziiert wie z.B. Crouzon Syndrom und Pfeiffer Syndrom. Daraus ergibt sich die Überlegung, dass eine Überexpression von *FGF10* einen ähnlichen Effekt haben könnte wie ein überaktiver Rezeptor. Hierfür wurden erste Versuche im Modellorganismus *Danio rerio* durchgeführt. Durch eine Genomduplikation gibt es im Zebrafisch zwei orthologe Gene: *fgf10a* und *fgf10b*. Aufgrund der konservierten Syntanie zum humanen *FGF10* Genlocus wurden die Analysen im Zebrafisch mit *fgf10a* durchgeführt. Die humane und die Zebrafisch cDNA haben eine Sequenzähnlichkeit von 58%.

a) Expressionsanalyse von *fgf10a*

Die generelle Expression von *fgf10a* wurde in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben untersucht. Hierfür wurde mittels PCR Stadien- und Gewebe-cDNAs von *Danio rerio* analysiert. Als Amplifikationskontrolle wurde das Haushaltgen *act1a1* (*aktin*) verwendet. Es wird zu allen Zeitpunkten und in allen Geweben exprimiert. Die amplifizierten Produkte für *fgf10a* (ca. 300 bp) und *aktin* (ca. 250 bp) sind in Abbildung 3.26 dargestellt. Die *aktin* Expression erfolgt in allen Entwicklungsstadien und in allen Geweben. Die Konzentrationen der eingesetzten cDNAs scheinen allerdings nicht gleich zu sein, um eine tendenzielle Aussage zu treffen ist dies jedoch ausreichend. In 24 hpf, 32 hpf und 48 hpf alten Embryonen sowie in allen getesteten Geweben wird *fgf10a* stark exprimiert.

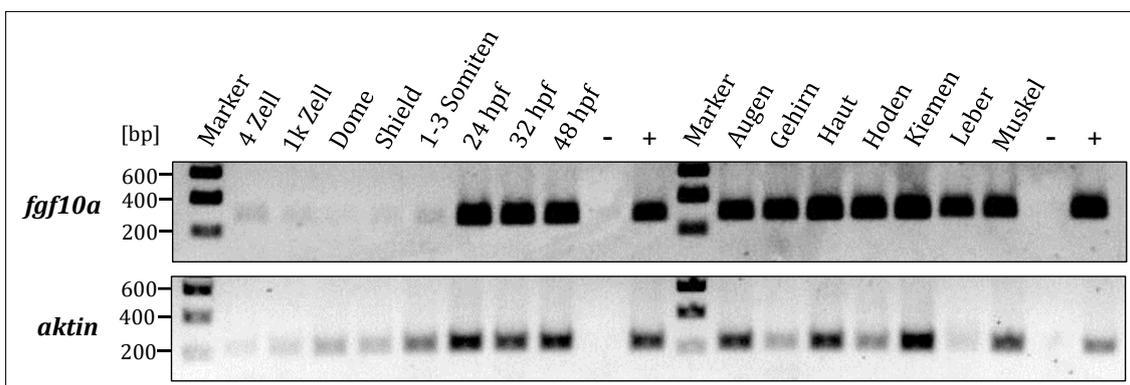


Abbildung 3.26: *fgf10a* und *fgfr2* Expressionsanalyse in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben des Zebrafischs. Von unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Geweben adulter Zebrafische wurde cDNA für die Analyse verwendet. Die amplifizierten Produkte für *fgf10a*, *fgfr2* und *aktin* wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei dient *aktin* der cDNA Kontrolle. Als Positivkontrolle (+) wurde ein Mix aus Stadien- bzw. Gewebe-cDNA und als Negativkontrolle (-) Wasser verwendet.

Daraufhin wurde das Expressionsmuster von *fgf10a* und des Rezeptors *fgfr2* in 24 hpf und 48 hpf Embryonen untersucht. Hierfür wurde die *fgf10a* kodierende Sequenz in den pCRII Vektor eingebracht und eine mit DIG markierte, komplementäre RNA Sonde erstellt. Die Sonden für *fgfr2* und die anschließende *in-situ* Hybridisierung wurden von A. Kirschbauer durchgeführt.

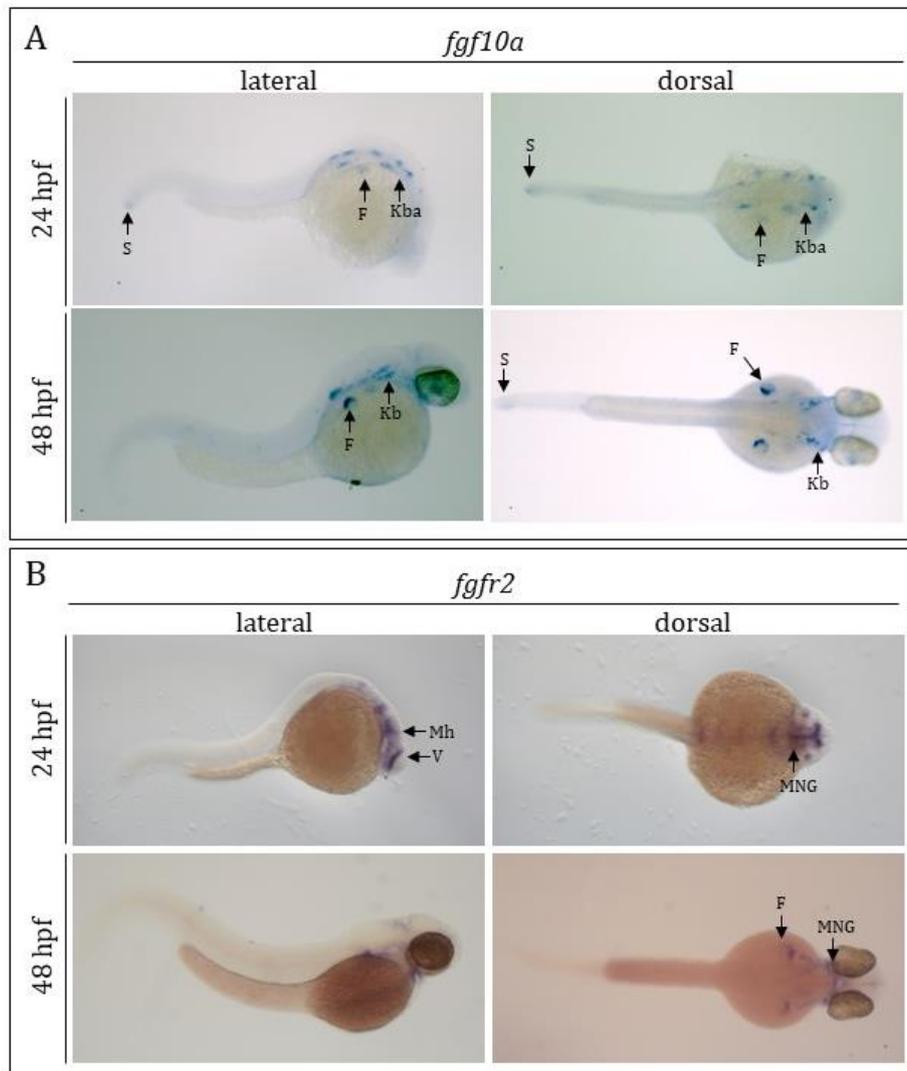


Abbildung 3.27: Expressionsmuster von *fgf10a* und *fgfr2* in *Danio rerio* Embryonen. Hybridisierungssonden der Gene *fgf10a* (A) und *fgfr2* (B) wurden für die Expressionsanalyse in 24 hpf und 48 hpf alten *nac^{-/-}tra^{-/-}* Embryonen verwendet. Von den Embryonen wurden sowohl laterale als auch dorsale Aufnahmen mit 5x Vergrößerung unter dem Stereomikroskop aufgenommen. Gefärbte Strukturen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. F = Flossenansätze, Kb = posteriore Kiemenbögen, Kba = posteriore Kiemenbögenanlagen, Mh = Mittelhirn, MNG = Mittelhirn-Nachhirn Grenze, S = Schwanzknospe, V = Vorderhirn.

Abbildung 3.27 zeigt die Aufnahmen der *in-situ* Hybridisierung der Embryonen mit einem Stereomikroskop. Die Expression von *fgf10a* konnte sowohl in 24 hpf also auch in 48 hpf alten Embryonen vor allem in der Schwanzknospe, den Flossenansätzen und den posterioren Anlagen der Kiemenbögen nachgewiesen werden (Abb. 3.27 A). Das *fgfr2* Expressionsmuster unterscheidet sich hiervon (Abb. 3.27 B). So findet in 24 hpf alten Embryonen hauptsächlich im Vorder- und Mittelhirn *fgfr2* Expression statt. Auch eine Expression im Bereich der Mittelhirn-

Nachhirn Grenze ist deutlich erkennbar. Auch in 48 hpf Embryonen lässt sich *fgfr2* in diesem Bereich nachweisen. Die einzige Region, in der sowohl *fgf10a* als auch *fgfr2* exprimiert werden, sind die Flossenansätze in 48 hpf alten Embryonen.

b) Überexpression von *fgf10a*

Im Folgenden soll untersucht werden, welche Folgen eine ubiquitäre Überexpression von *fgf10a* auf die Entwicklung von Zebrafisch Embryonen hat. Die vollständige kodierende Sequenz von *fgf10a* wurde in das *in vitro* Transkriptionsplasmid pCS2 eingebracht und die *fgf10a* RNA hergestellt (Anhang G). Eine Verdünnung von 100 ng/ μ l der RNA wurde zusammen mit FITC Dextran und Phenolrot in die erste Zelle von *nac*^{-/-}*tra*^{-/-} Embryonen injiziert, um eine ubiquitäre Überexpression zu simulieren. Die Embryonen wurden zusammen mit unbehandelten Kontrollen bei 28°C großgezogen und über drei Tage deren Phänotyp dokumentiert. Insgesamt wurde in 285 Embryonen RNA injiziert, davon starben 225 innerhalb der ersten 24 h. Die meisten von diesen zeigten schwere Entwicklungsdefekte. 23 Embryonen entwickelten sich normal. Fehlbildungen in unterschiedlichem Schweregrad wiesen 37 Embryonen auf. Abbildung 3.28 zeigt exemplarisch Aufnahmen von Embryonen nach 24 h, 48 h und 72 h. Die häufigsten Fehlbildungen betrafen die Augen und das Gehirn. Bei älteren Stadien war auch ein vergrößertes Herz sowie das otische Vesikel auffällig. Aufgrund des schweren Phänotyps wurde das Experiment jeweils nach drei Tagen beendet.

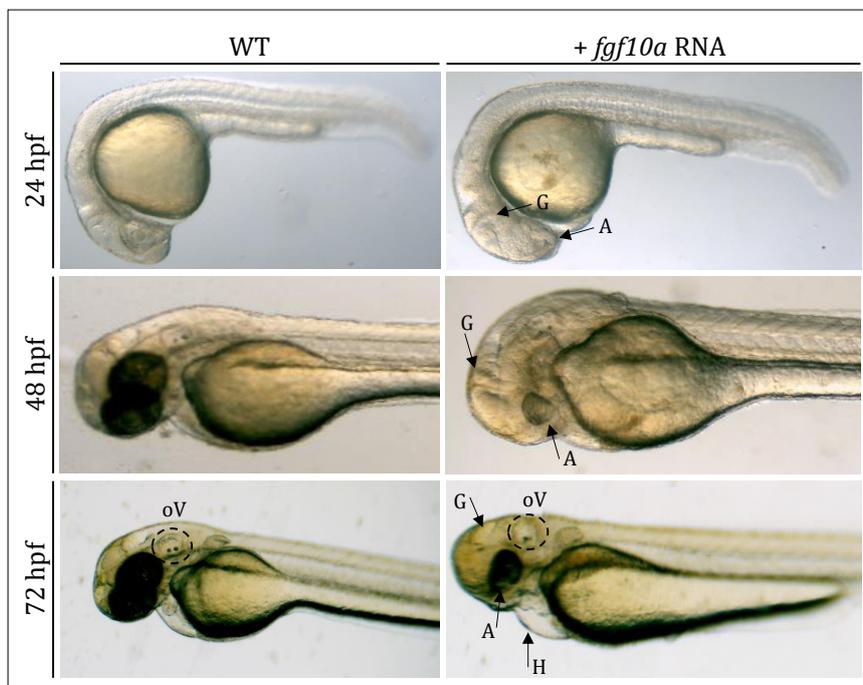


Abbildung 3.28: *fgf10a* RNA Injektion in Zebrafisch Embryonen. Aufnahmen von wildtypischen und injizierten *nac*^{-/-}*tra*^{-/-} Embryonen zu den Zeitpunkten 24 hpf, 48 hpf und 72 hpf. Gravierende phänotypische Veränderungen der injizierten Embryonen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. A = Auge, G = Gehirn, H = Herz, oV = otisches Vesikel.

3.4.3 Expressionsmuster von *huwe1* in *Danio rerio*

Bei Patient CRA_14 wurde die Variante c.329G>A von *HUWE1* als möglicherweise krankheitsverursachend eingestuft. *HUWE1* ist ein erst seit kurzem mit Kraniosynostose assoziiertes Gen (TAYLOR *et al.* 2015). Dem entsprechend sind noch wenig funktionelle Analysen durchgeführt worden. Für ein mögliches Projekt mit dem Modellorganismus Zebrafisch wurden Expressionsanalysen mit cDNA verschiedener Entwicklungsstadien und Geweben sowie *in situ* Hybridisierungen auf Zebrafisch Embryonen durchgeführt. Das Gen *huwe1* liegt auf Chromosom 23 von *Danio rerio* und ist von der Genomduplikation nicht betroffen, weswegen nur ein Ortholog zum humanen Gen vorliegt. Die Sequenzähnlichkeit von humaner und Zebrafisch Sequenz liegt bei 81%. Um zu untersuchen zu welchen Zeitpunkten und in welchen Geweben *huwe1* exprimiert wird, wurde eine PCR mit *huwe1* Primern auf cDNA unterschiedlicher Zebrafisch Entwicklungsstadien und Geweben adulter Fische durchgeführt. Die cDNA Das Haushaltsgen *aktin* wird zu allen Entwicklungszeitpunkten ubiquitär exprimiert und wurde als Kontrolle für die cDNA verwendet. Abbildung 3.29 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte für *huwe1* (ca. 500 bp) und *aktin* (ca. 250 bp). Wie erwartet wird *aktin* zu allen Zeitpunkten und in allen Geweben exprimiert, auch wenn sich hier zeigt, dass die cDNA nicht in allen gleich konzentriert ist. Im Dome- und 1-3 Somiten Stadium wird *huwe1* kaum exprimiert. In 32 hpf und 48 hpf Embryonen scheint die Expression schwächer zu sein als zum Zeitpunkt 24 hpf. Im adulten Fisch wird *huwe1* in allen getesteten Geweben exprimiert.

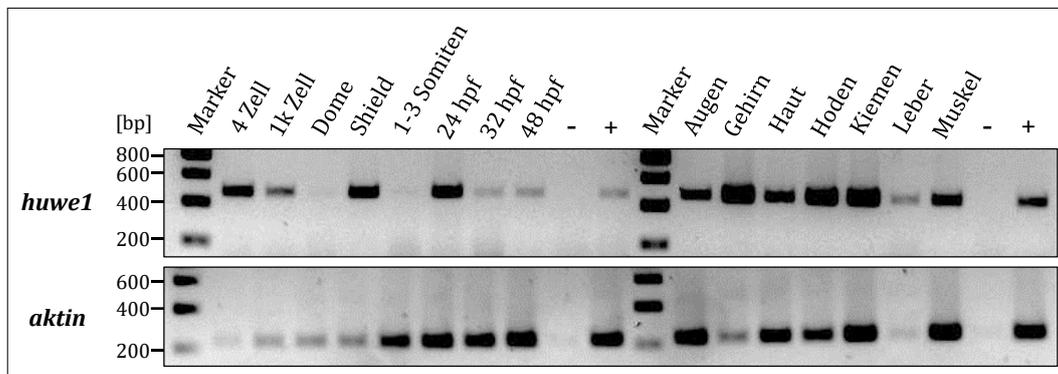


Abbildung 3.29: *huwe1* Expressionsanalyse in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben von *Danio rerio*. Für die Analyse wurden cDNAs unterschiedlicher Entwicklungsstadien und Geweben adulter Zebrafische verwendet. Die amplifizierten Produkte für *huwe1* und *aktin* wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei dient *aktin* der cDNA Kontrolle. Als Positivkontrolle (+) wurde ein Mix aus Stadien- bzw. Gewebe-cDNA und als Negativkontrolle (-) Wasser verwendet.

Für die Analyse des Expressionsmusters in 24 hpf und 52 hpf Embryonen wurde eine *in-situ* Hybridisierung durchgeführt. Die Klonierung, Erstellung der Riboprobe und Hybridisierung auf 24 hpf und 52 hpf Embryonen wurden gemeinsam mit der Praktikantin J. Seidler durchgeführt. Die Aufnahmen in Abbildung 3.30 zeigen eine basale Expression von *huwe1* im gesamten 24 hpf

Embryo. Eine besonders starke Expression ist in den Gehirnregionen erkennbar. Dies ist auch bei 52 hpf Embryonen der Fall, besonders im Bereich des Mittelhirns. Des Weiteren ist eine deutliche Färbung des otischen Vesikels und der Flossenansätze zu erkennen.

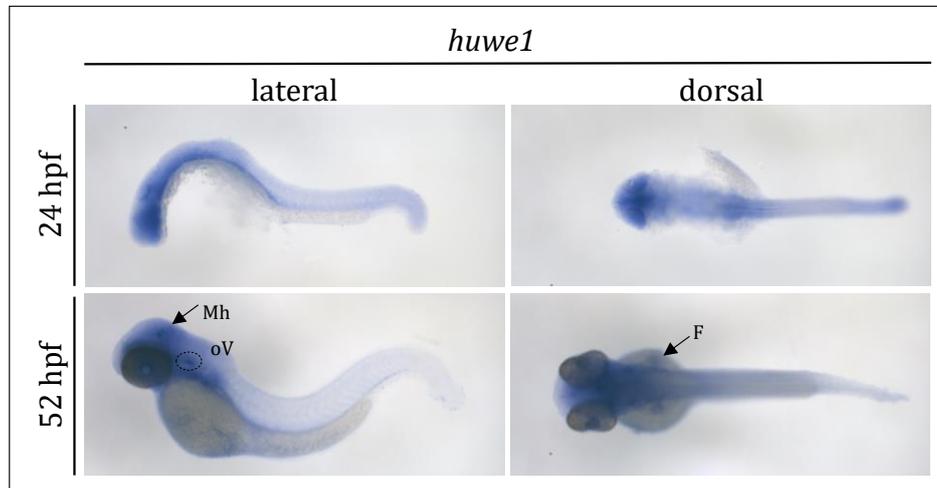


Abbildung 3.30: Expressionsanalyse von *huwe1* in *Danio rerio* Embryonen. Laterale und dorsale Aufnahmen von 24 hpf und 52 hpf *nac^{-/-}tra^{-/-}* Embryonen nach *in situ* Hybridisierung mit einer *huwe1* Sonde. Bei den 24 hpf Embryonen wurde zur bessern Sichtbarkeit der Färbung der Dottersack entfernt. Pfeile kennzeichnen stark gefärbte Strukturen. F = Flossenansätze, Mh = Mittelhirn, oV = otisches Vesikel.

4. DISKUSSION

Zur weiteren Aufklärung der Pathogenese von Kraniosynostosen wurden in dieser Arbeit 83 Kraniosynostose Patienten molekulargenetisch untersucht. Bei 33 Patienten erfolgte eine genomweite Analyse der gDNA nach CNVs durch hochauflösende Array-CGH. Dabei konnten bei 6 Patienten Veränderungen detektiert werden, die als potentiell pathogen bzw. als pathogen bewertet wurden. Es handelt sich sowohl um unbalancierte Translokationen als auch um isolierte Duplikationen und Deletionen. Bei keinem der 33 analysierten Fälle wurden CNVs in nicht-kodierenden Regionen als potentiell pathogen eingestuft. Möglicherweise war die Anzahl an analysierten Fällen dafür zu gering. In einer Studie mit 340 Probanden zu CNVs bei isolierten Extremitäten Fehlbildungen konnten in ca. 5% der Fälle regulatorische, nicht-kodierende CNVs als genetische Ursache festgestellt werden (FLOTTMANN *et al.* 2018). Würde man bei Kraniosynostose in etwa die gleiche Häufigkeit erwarten, so wären es bei der Anzahl an analysierten Fälle ein bis zwei Patienten. Es sollten noch weitere Fälle untersucht werden, um die Häufigkeit solcher CNVs für Kraniosynostosen zu bestimmen.

In 18% der mit Array-CGH analysierten Fälle und somit bei ca. 7% der gesamten Kraniosynostose Kohorte konnten potentiell pathogene CNVs identifiziert werden. Im Vergleich dazu liegt der Anteil in einer Studie mit 666 Patienten bei 2,4% (WILKIE *et al.* 2017). Der Anteil an potentiell pathogenen CNVs in unserer Kohorte zeigt, wie wichtig eine genomweite CNV Analyse bei Kraniosynostose Patienten ist.

Neben den Array-CGH Analysen wurden auch NGS Analysen durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein Kraniosynostose Genpanel erstellt und erfolgreich validiert. Anschließend erfolgte die Analyse von 66 Patienten gDNAs. Nach Auswertung und Bewertung der Sequenzierdaten wurde bei 21 Patienten eine potentiell pathogene Variante festgestellt, was einer Detektionsrate von 32% entspricht. Bei 12 dieser Varianten handelt es sich um neue bzw. sehr seltene Varianten in den Genen *ERF*, *FGFR2*, *HUWE1*, *MEGF8*, *MSX2*, *POR*, *PTCH1* und *TCF12*. Im Rahmen dieser Arbeit konnte so das Mutationsspektrum dieser Gene erweitert werden. Soweit möglich wurden für alle Varianten Segregationsanalysen durchgeführt. Mit einem Minigen-Spleißsystem wurden Auswirkungen von Spleißvarianten auf das Spleißmuster analysiert. Zusätzlich erfolgte für *HUWE1*, das erst in wenigen Fällen beschriebene wurde, Expressionsanalysen in *Danio rerio*. Innerhalb dieser Arbeit wurden auch 8 bereits beschriebene *FGFR* Mutationen (*FGFR1*: 1x, *FGFR2*: 1x und *FGFR3*: 6x) durch das Kraniosynostose Genpanel detektiert. Dies entspricht 12% der durch NGS analysierten Patientenproben. Da bei den meisten Patienten zuvor eine Analyse von einem oder mehreren Genen durch das humangenetische Diagnostiklabor des Instituts durchgeführt wurde, ist der Anteil an bekannten Mutationen unerwartet hoch. Dies zeigt, dass eine klinische Zuordnung zu einem Syndrom aufgrund der überlappenden phänotypischen

Merkmale oft schwierig ist und in der Routinediagnostik häufig die Sequenzierung von mehreren Genen erfordert. Durch das Genpanel können diese Gene parallel analysiert werden, was vor allem bei Patienten mit unklarer klinischer Diagnose eine Zeitersparnis darstellt.

4.1 Varianten im Kontext der Osteoblasten Differenzierung

Im Folgenden werden die genetischen Veränderungen, die als potentiell pathogen eingestuft wurden, im Kontext der Osteoblasten Differenzierung und der Wachstumsregulation der Suturen diskutiert. Abbildung 4.1 greift die Darstellung der Signalwege aus Kapitel 1.4 auf und wurde um die Faktoren, in denen Varianten identifiziert wurden, ergänzt. Viele der betroffenen Faktoren lassen sich den Signalwegen WNT, BMP, FGF und IHH zuordnen.

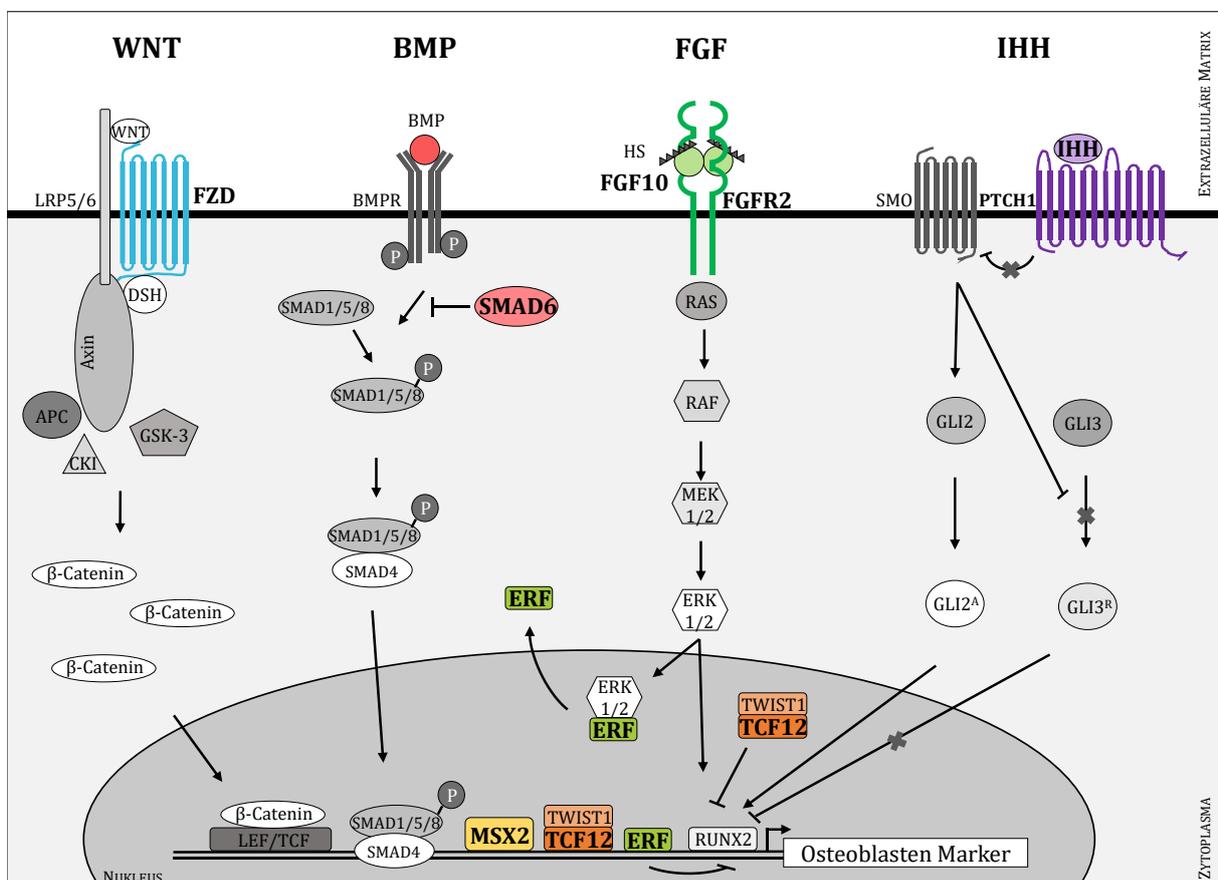


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Signalwege der Osteoblasten Differenzierung. Zur Vereinfachung wurden einige Signalproteine der Signalwege nicht eingezeichnet. Die Faktoren, die von den detektierten genetischen Veränderungen betroffen sind, sind farblich markiert.

4.1.1 FGF Signalweg

Bei der Osteoblasten Differenzierung und der Wachstumsregulation innerhalb der Suturen spielt der FGF Signalweg eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.4.2 und 1.5). Mutationen in den Genen *FGFR1-3* sind mit unterschiedlichen Kraniosynostose Syndromen assoziiert und sind die am häufigsten identifizierten, genetischen Ursachen bei Kraniosynostose Patienten. Innerhalb

dieser Arbeit wurden 8 bereits beschriebene *FGFR* Mutationen (*FGFR1*: 1x, *FGFR2*: 1x und *FGFR3*: 6x) durch das Kraniosynostose Genpanel detektiert.

Eine weitere Variante in *FGFR2* (c.1150G>A, p.G384R) wurde nach dem Abgleich mit Datenbanken und Analysen durch Vorhersageprogramme als Variante unklarer Signifikanz eingestuft (siehe 3.3.4). Sie wurde bisher einmalig bei einem Patienten mit unklarem Kraniosynostose Syndrom beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit von den Vorhersageprogrammen widersprüchlich bewertet (PULLEYN *et al.* 1996). Mutationen im *FGFR2* Gen sind mit allen klassischen Kraniosynostose Syndromen assoziiert. Dabei sind die Mutationen hauptsächlich in der IgIII Domäne und der Tyrosin Kinase Domäne lokalisiert. Aminosäure Substitutionen in der IgIII Domäne können zu Änderungen der Bindeaffinität und -spezifität führen. Eine Liganden unabhängige Aktivierung kann die Folge von Substitutionen in den Kinase Domänen sein (RICE 2008). Die jeweiligen Veränderungen können somit einen Funktionsgewinn des Rezeptors bewirken. Die G384R Variante des Patienten CRA_29 ist in der Transmembran (TM) Domäne von *FGFR2* lokalisiert. Die TM Domäne besteht aus 21 Aminosäuren (p.378-398, Uniprot P21802). Die betroffene Aminosäure Glycin an Position 384 ist konserviert in Mensch, Maus, Huhn und Zebrafisch. Li *et al.* konnten in Zellkultur zeigen, dass Veränderungen in der TM Domäne von *FGFR2* (p.C382R, p.C382D oder p.V392R) zu einer Liganden unabhängigen Aktivierung des Rezeptors führen (LI *et al.* 1997). Es ist jedoch weder bekannt, ob diese TM Veränderungen im Menschen mit Erkrankungen assoziiert sind, noch wurden sie im Tiermodell untersucht. Es wäre jedoch interessant die G384R Variante des Patienten CRA_29 mit diesem Zellkultursystem zu analysieren, um zu untersuchen, ob diese Variante einen ähnlichen Effekt auf den Rezeptor hat. Die Folge einer *FGFR2* Daueraktivierung könnte eine verstärkte Proliferation der Vorläuferzellen in den Suturen sein, die letztendlich zu einer vorzeitigen Fusion der Schädelplatten führen kann. Dieser Mechanismus liegt auch bei einer mit Crouzon Syndrom assoziierten *FGFR3* Mutation vor. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Mutation A391E in der TM Domäne die Liganden unabhängige Dimerisierung von *FGFR3* fördert (LI *et al.* 2006; CHEN *et al.* 2011; SARABIPOUR AND HRISTOVA 2013; DEL PICCOLO *et al.* 2017).

Bisher sind nur zwei weitere Mutationen der *FGFR2* TM Domäne beschrieben. Die Mutationen p.Y381D und p.M391R sind mit dem letalen *Bent Bone Dysplasia* Syndrom (BBDS, OMIM 614592) assoziiert (MERRILL *et al.* 2012; SCOTT *et al.* 2014; STICHELBOU *et al.* 2016). Die Patienten werden mit komplexen Skelettfehlbildungen, die unter anderem Kraniosynostose und gebogene Röhrenknochen beinhalten, geboren. Pränatale Zähne, faziale Dysmorphien sowie Klitoromegalie wurden ebenfalls beschrieben. Merrill *et al.* postulieren als Pathomechanismus für BBDS einen *loss-of-function* Effekt für die p.M391R Mutation. Die Mutation führt dazu, dass *FGFR2* nicht mehr in der Plasmamembran lokalisiert ist (MERRILL *et al.* 2012). Dieser Mechanismus ist für Patient CRA_29 jedoch aufgrund der gravierenden phänotypischen

Unterschiede unwahrscheinlich. Für die bessere Einstufung der vorliegenden G384R Variante wäre eine Analyse der zellulären Lokalisation von FGFR2 sowie der Rezeptordimerisierung hilfreich.

Zusätzlich zu Varianten in den Rezeptoren wurde durch Array-CGH ein Zugewinn von 5p15.1-p12 detektiert, der das Gen für den Liganden FGF10 betrifft (siehe Abb. 3.4). Der 28,4 Mb Zugewinn von Patient CRA_10 umfasst mehr als 130 Gene. In Bezug auf die vorliegende Kraniosynostose ist FGF10 als Ligand des FGF Signalwegs interessant (Abb. 4.1). *FGF10* wird in mesenchymalen Zellen exprimiert und bindet bevorzugt an den epithelialen Rezeptor FGFR2b (ORNITZ *et al.* 1996). FGF10 ist an der Entwicklung vieler Organe beteiligt, wie beispielsweise von Herz und Lunge (VOLCKAERT AND DE LANGHE 2015; ITOH *et al.* 2016). *Fgf10*^{-/-} Mäuse sterben kurz nach der Geburt aufgrund der fehlenden Lungenentwicklung. Zusätzlich bilden sich bei diesen Mäusen keine Extremitäten aus (SEKINE *et al.* 1999). Dies zeigt, dass FGF10 vermittelte Signaltransduktion bereits früh eine wichtige Rolle bei der Extremitätenbildung spielt. Die Schädelentwicklung hingegen ist bei *Fgf10*^{-/-} Mäusen normal, da in mesodermalen Geweben die Isoform FGFR2c exprimiert wird. Dass FGF10 dennoch eine Rolle bei Kraniosynostose spielen kann, zeigt eine Studie im Mausmodell für das Apert Syndrom. In diesen Mäusen wurde die *Fgfr2c* Isoform heterozygot deletiert (*IIIc*^{+/-Δ}), was zu einem Apert-ähnlichen Phänotyp führte (HAJIHOSEINI *et al.* 2001). Die Deletion hat zur Folge, dass verstärkt Isoform *Fgfr2b* auch in den Suturen exprimiert wird. Ein zusätzlicher Knockout des Liganden *Fgf10* in den *IIIc*^{+/-Δ} Mäusen verhindert die vorzeitige Fusion der Suturen (HAJIHOSEINI *et al.* 2009). Dies ist nicht nur bei einer homozygoten *Fgf10* Deletion der Fall, sondern auch bei einer heterozygoten Deletion. Diese Studie zeigt, wenn auch in einem Krankheitsmodell, wie die Verfügbarkeit von Liganden zur Regulation in den Suturen beitragen kann. Aufgrund dessen wurden im Rahmen dieses Projekts erste funktionelle Analysen zu *FGF10* Überexpression im Tiermodell *Danio rerio* durchgeführt (siehe 3.4.2). Zunächst wurde das Expressionsmuster von *fgf10a* mit dem von *fgfr2* verglichen. Hier zeigte sich, dass beide in den Flossenansätzen in 48 hpf Embryonen exprimiert werden (siehe Abb. 3.27). Dies passt zu den bereits erwähnten Studien der *Fgf10*^{-/-} Mäusen, die zeigten, dass *Fgf10* wichtig für die Extremitätenbildung ist. Daraufhin wurde die *fgf10a* mRNA in Embryonen des 1-Zell Stadiums injiziert, um eine ubiquitäre Überexpression zu simulieren. Schwere Entwicklungsdefekte waren die Folge, die Augen, Gehirn, Herz und otische Vesikel betrafen (siehe Abb. 3.28). Fehlbildungen der Flossen gehörten allerdings nicht dazu. Vega-Hernández *et al.* konnten zeigen, dass für die Herzentwicklung die Signaltransduktion durch FGF10/FGFR2b notwendig ist (VEGA-HERNANDEZ *et al.* 2011). Dies könnte den vergrößerten Herzsack der behandelten Fische erklären. Diese Vorexperimente zeigen, dass *Danio rerio* ein geeignetes Tiermodell ist, um Untersuchungen zu FGF10 durchzuführen. Hierbei wäre es interessant zu analysieren, wie sich eine gewebespezifische Überexpression von *fgf10a* auf die Knochenbildung und im Besonderen auf die Schädelbildung auswirken kann. Dazu könnte eine

transgene Fischlinie mit der *fgf10a* kodierenden Sequenz unter der Kontrolle des *Osx* Promotors erstellt werden, sodass die verstärkte Expression spezifisch in Osteoblasten stattfindet. Durch die Erstellung einer Fischlinie bestünde auch die Möglichkeit Effekte in älteren Fischen zu untersuchen, da sich durch die einmalige RNA Injektion der Einfluss nur für frühe Stadien und für einen kurzen Zeitraum analysieren lässt.

In der Literatur sind mehrere Fälle mit partieller 5p Trisomie beschrieben, allerdings ohne eine Assoziation mit Kraniosynostose. Hierbei sind sowohl die Größen der Trisomien als auch der Phänotyp sehr variabel. Eine grobe Genotyp-Phänotyp Korrelation ergibt sich aus den beschriebenen Fällen. Distale Trisomien (5p13.3-pter) sind mit einem milderem Phänotyp assoziiert. Die Patienten haben häufig faziale Dismorphien, tief-sitzende Ohren und Klumpfüße. Der Phänotyp von Patienten mit proximalen Trisomien (5p11-p13.2) hingegen ist häufig schwerwiegender und komplexer. Herzdefekte, Auffälligkeiten der Extremitäten, intestinale oder renale Fehlbildungen sowie mentale Retardierung sind Beispiele für gravierendere klinische Merkmale (AVANSINO *et al.* 1999; VASQUEZ-VELASQUEZ *et al.* 2011; IZZO *et al.* 2012; WALTERS-SEN *et al.* 2015; CAMEROTA *et al.* 2017). Die 5p15.1-p12 Duplikation von Patient CRA_10 überlappt mit beiden Bereichen. Dennoch zeigt er einen eher milden Phänotyp mit Kraniosynostose, fazialen Auffälligkeiten, Entwicklungsverzögerung und Lernschwäche. In der Datenbank DECIPHER sind 15 Patienten aufgeführt, die mit der detektierten 28,4 Mb Aberration überlappende 5p Trisomien aufweisen (Anhang E). Bei vier Patienten ist *FGF10* von der Duplikation betroffen. Die klinischen Merkmale sind auch bei diesen Patienten sehr variabel. Kraniosynostose wurde auch hier bei keinem Patienten vermerkt. Allerdings wurde bei Patient 255925 ein Dolichocephalus festgestellt, sodass möglicherweise bei diesem Patienten die Sagittalnaht vorzeitig fusioniert ist. Die Duplikation dieses Patienten ist mit 3,7 Mb im Vergleich zu anderen 5p Trisomien relativ klein (GRCh37/hg19, chr5:35.589.089-39.328.506) und betrifft *FGF10* nicht.

In dem Fall von Patient CRA_10 lässt sich nicht abschließend eine Hypothese zu der Pathogenese, die zur vorliegenden Kraniosynostose führt, aufstellen. Hier könnten Analysen eventuell in einem Tiermodell, wie z.B. *Danio rerio*, zur weiteren Aufklärung beitragen.

4.1.2 BMP Signalweg

Im Gegensatz zu syndromalen Kraniosynostosen, sind für isolierte Kraniosynostosen nur wenige genetische Ursachen bekannt. Von Timberlake *et al.* wurde eine Patienten Kohorte mit metopischer und/oder sagittaler Kraniosynostose molekulargenetisch untersucht und dabei Varianten im *SMAD6* Gen als mögliche genetische Ursache identifiziert (TIMBERLAKE *et al.* 2016; TIMBERLAKE *et al.* 2017). Die heterozygoten *loss-of-function* Varianten zeigten jedoch eine reduzierte Penetranz, da manche elterliche Anlagenträger nicht von Kraniosynostose betroffen sind. Ein möglicher Zusammenhang eines häufigen SNPs (rs1884302 T>C, MAF = 42%), der

345 kb 3' von dem Gen *BMP2* lokalisiert ist, mit sagittaler Kraniosynostose wurde bereits in einer anderen Studie gezeigt (JUSTICE *et al.* 2012). Daraufhin wurden bei allen Familien mit identifizierten *SMAD6* Varianten untersucht, ob an dieser Position das wildtypische (T) oder das veränderte (C) Nukleotid vorliegt. Es zeigte sich, dass die Mehrheit der Patienten sowohl eine *SMAD6* Variante als auch die Substitution T>C tragen. Allerdings liegt bei keinem phänotypisch unauffälligen Familienmitglied diese Kombination vor. Dies führte zu der Annahme, dass Cystein an dieser Position ein Risikoallel für Frontal- bzw. Sagittalnahtsynostosen darstellt und eine digene Vererbung vorliegt (TIMBERLAKE *et al.* 2016). Um zu untersuchen wie relevant *SMAD6* Mutationen bei isolierten Kraniosynostosen sind, wurden innerhalb dieser Arbeit 96 gDNAs von Patienten mit metopischer oder sagittaler Kraniosynostose analysiert. Es konnten vier potentiell pathogene Varianten in drei Patienten identifiziert werden, von denen eine Variante bereits von Timberlake *et al.* beschrieben wurde (siehe Tabelle 3.6 und Abb. 4.2). Dies entspricht einem Anteil von 3,1% innerhalb der Patienten Kohorte. Alle Veränderungen sind in den Domänen des Proteins lokalisiert. Bei zwei Patienten liegt auch das *BMP2* Risikoallel „C“ vor. Potentiell pathogene *SMAD6* Varianten scheinen eher selten zu sein, wenn man die Häufigkeit an isolierten Frontal- und Sagittalnahtsynostosen bedenkt. Allerdings wurde in dieser Arbeit auch eine relativ kleine Kohorte untersucht. Studien mit einer größeren Patientenzahl könnten dazu beitragen, die Häufigkeit von möglichen pathogenen Varianten in *SMAD6* genauer zu bestimmen.

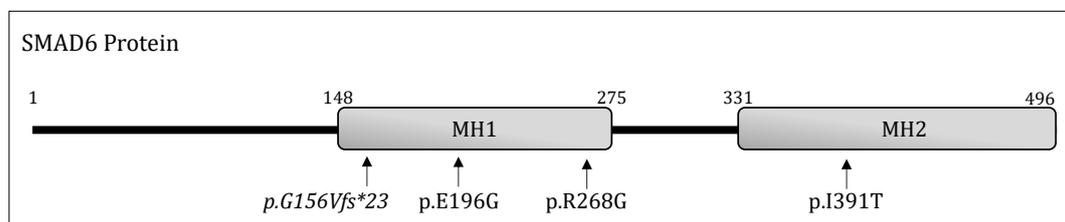


Abbildung 4.2: Lokalisation der detektierten SMAD6 Varianten. Die Aminosäureveränderungen liegen alle in der MH1 und MH2 Domäne von SMAD6. Die Leserasterverschiebung wurde bereits von Timberlake *et al.* publiziert (TIMBERLAKE *et al.* 2017).

SMAD6 und SMAD7 sind inhibitorische SMADs der BMP und TGF- β Signalwege. Sie verhindern die Phosphorylierung der regulatorischen SMADs durch die aktivierten Rezeptoren (Abb. 4.1). Außerdem konnte gezeigt werden, dass SMAD6 aktiviertes SMAD1 bindet und so eine Komplexbildung mit SMAD4 verhindern kann und somit die Signaltransduktion unterbindet (HATA *et al.* 1998). Zusätzlich kann SMAD6 einen Komplex mit SMURF1 bilden, das dadurch die Ubiquitinierung und Degradation des Rezeptors und der regulatorischen SMADs induziert (MURAKAMI *et al.* 2003). SMAD6 defiziente Mäuse entwickeln einen stark gewölbten Schädel und zeigen Knochenablagerungen im Bereich der Frontalnaht (ESTRADA *et al.* 2011). Obwohl keine Kraniosynostose nachgewiesen wurde, zeigt dies die Beteiligung von SMAD6 an einer normalen Schädelentwicklung. SMAD6 ist ein wichtiger Regulator des BMP Signalwegs während der Osteoblasten Differenzierung. Dennoch sind weitere Analysen notwendig, um den

Zusammenhang mit isolierten Kraniosynostosen aufzuklären. Dass BMP2 eine wichtige Rolle während der Osteoblasten Differenzierung spielt, ist bereits bekannt (LEE *et al.* 2003; LUU *et al.* 2007; WANG *et al.* 2010). Es stellt sich nun die Frage wie ein 345 kb entfernt liegender SNP Einfluss auf die BMP Expression nehmen kann und dazu führt, dass zusammen mit einer möglichen SMAD6 Haploinsuffizienz die Frontal- bzw. Sagittalnaht vorzeitig fusionieren. Justice *et al.* postulieren, dass der SNP in einer *BMP2* regulatorischen Region liegt und dass das Risikoallel „C“ eine leichte Änderung der Regulation bewirkt und so zu einer geänderten *BMP2* Expression beiträgt (JUSTICE *et al.* 2012). Bisher wurden dazu noch keine funktionellen Analysen durchgeführt. Der *BMP2* Lokus ist allerdings bekannt dafür, dass die *BMP2* Expression durch weit entfernte Regulatorregionen beeinflusst werden kann. So ist beispielsweise eine Duplikation einer nicht-kodierenden Region, die 110 kb 3' von *BMP2* lokalisiert ist, assoziiert mit Brachydaktylie Typ A2. Die duplizierte Region enthält hoch konservierte Bereiche und kann in einem Reportersystem die spezifische Expression des Reporters in den Extremitäten vermitteln (DATHE *et al.* 2009; SU *et al.* 2011). Eine Analyse der Region des *BMP2* Risikoallels durch den ECR Browser zeigte jedoch, dass der SNP nicht in einer evolutionär konservierten Region lokalisiert ist. Es sind weitere Studien notwendig, um die Hypothese einer gesteigerten bzw. veränderten *BMP2* Expression durch das Risikoallel zu bestätigen.

4.1.3 WNT Signalweg

Durch Array-CGH wurde bei Patient CRA_59 ein heterozygoter, 3,7 Mb großer Verlust von 7q21.13-q21.3 detektiert. Dieser ist bei dem Patienten *de novo* entstanden (siehe Abb. 3.10). Bis auf die Lambdanaht waren alle Schädelnähte vorzeitig fusioniert. Zusätzlich wurde eine leichte Sprach- und Entwicklungsverzögerung beschrieben (siehe 3.1.6). Von der interstitiellen Deletion sind über 30 Gene betroffen. Darunter *FZD1* und *COL1A2*. Heterozygote *loss-of-function* Mutationen von *COL1A2* sind assoziiert mit Osteogenesis Imperfecta (OMIM 259420, 166210, 166220) und Ehlers-Danlos Syndrom Typ 2 (OMIM 617821). Klinisch sind diese Erkrankungen jedoch nicht passend. Auch sind in der *Osteogenesis Imperfecta Variant Database* keine vollständigen Deletionen von *COL1A2* aufgeführt. Vermutlich entsteht der Phänotyp eher durch fehlgebildete Kollagen I Moleküle als durch eine Dosisänderung. *FZD1* kodiert für einen Rezeptor der WNT Liganden und wird in Osteoblasten exprimiert (ZHANG *et al.* 2010). Der Rezeptor vermittelt die Signaltransduktion, die dazu führt, dass β -Catenin im Zytoplasma akkumuliert, in den Zellkern gelangt und die Transkription von Osteoblasten Marker vermittelt (Abb. 4.1). *FZD1* könnte somit an dem Gleichgewicht aus Proliferation und Differenzierung in den Osteoblasten beteiligt sein und wäre eine mögliche Ursache für die beim Patienten vorliegende komplexe Kraniosynostose. In Zellkultur hat die Reduktion von *FZD1* zur Folge, dass die Osteoblasten Differenzierung und folglich die Mineralisierung der Zellen inhibiert wird (YU *et al.* 2015; YU *et al.* 2016). *In vivo* hat der Verlust jedoch keinen Effekt, *Fzd1*^{-/-} Mäuse sind gesund und

phänotypisch unauffällig (YU *et al.* 2010; LAPOINTE *et al.* 2012). Diese Studien deuten darauf hin, dass eine Haploinsuffizienz von FZD1 nicht zu einer Kraniosynostose führt, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der heterozygote Verlust von FZD1 die Osteoblasten Proliferation oder Differenzierung beeinflusst.

Es sind sehr wenige Fälle publiziert, die eine interstitielle Deletion der Zytobande 7q21 aufweisen. Die meisten beschriebenen heterozygoten Deletionen betreffen 7q11-q21.3 und sind somit deutlich größer als der Verlust, der bei Patient CRA_59 detektiert wurde. Es ist schwierig eine Genotyp-Phänotyp Korrelation zu erstellen, da bei vielen Fällen aufgrund der verwendeten Analysemethoden nur grobe Angaben der Zytobanden vorhanden sind. Häufig liegt bei den Patienten eine Entwicklungsverzögerung oder eine Intelligenzminderung sowie verzögertes Größenwachstum vor. Gemeinsame kraniofaziale Auffälligkeiten sind eine hohe Stirn, Hypertelorismus, faziale Asymmetrie, tief-sitzende Ohren und Mikrognathie. Bei keinem Patienten wurde Kraniosynostose festgestellt (COURTENS *et al.* 2005; KIM *et al.* 2014). Der Patient 251554 in der DECIPHER Datenbank hat eine heterozygote, 3,4 Mb große Deletion, die vollständig innerhalb des deletierten Bereichs von Patient CRA_59 liegt. Zu Patient 251554 sind allerdings keine klinischen Daten vermerkt. Darüber hinaus sind 9 weitere Patienten mit überlappenden Deletionen, die ebenfalls *FZD1* betreffen, in der DECIPHER Datenbank aufgeführt (Anhang E). Alle Deletionen sind deutlich größer (>10 Mb) als die bei Patient CRA_59 detektierte Deletion. Die klinischen Auffälligkeiten sind sehr variabel und ergeben keinen spezifischen Phänotyp. Häufig sind faziale Dysmorphien, Mikrozephalie, Intelligenzminderung, Minderwuchs sowie Extremitäten Fehlbildungen. Abschließend lässt sich die genaue Ursache für die komplexe Kraniosynostose bei Patient CRA_59 nicht bestimmen.

4.1.4 IHH Signalweg

Bei einer Patientin CRA_35, die eine syndromale Form der Kraniosynostose hat, wurde eine unbalancierte Translokation detektiert (siehe 3.1.4). Es liegt ein 29,5 Mb Zugewinn von 2q34-qter sowie ein 111 kb Verlust von 17q25.3 vor (siehe Abb. 3.8). Die Gene *B3GNTL1* und *METRNL* sind von dem heterozygoten Verlust betroffen und wurden nicht als klinisch relevant eingestuft. Von den über 200 Genen innerhalb der Duplikation gibt es bei drei Genen Hinweise auf eine Assoziation mit Skeletterkrankungen. Hierbei handelt es sich um die Gene *PAX3*, *EPHA4* und *IHH*. *Loss-of-function* Mutationen und Deletionen von *PAX3* sind mit dem Waardenburg Syndrom (OMIM 193500) assoziiert, das sich zusätzlich zu skelettalen Auffälligkeiten durch Pigmentstörungen und Taubheit auszeichnet, allerdings nicht mit Kraniosynostose in Verbindung gebracht wird (PINGAULT *et al.* 2010). In diesem Fall kann das Syndrom ausgeschlossen werden, da hier ein Zugewinn vorliegt und Patientin CRA_35 weder eine Pigmentstörung noch eine sensorineurale Hörstörung aufweist. In Mäusen führt der Verlust von *EphA4* zu Koronarnahtsynostosen, bisher wurden jedoch noch keine Mutationen im Menschen

beschrieben (TING *et al.* 2009). Die wahrscheinlichste Ursache für die bei Patientin CRA_35 vorliegende Kraniosynostose ist der Zugewinn von *IHH*. Die Signaltransduktion durch *IHH* ist hauptsächlich bekannt für die Beteiligung an der Chondrozyten Proliferation und dem Längenwachstum der Röhrenknochen (BILEZIKIAN *et al.* 2002). *IHH* wird jedoch auch in den Suturen exprimiert und *Ihh* defiziente Mäuse weisen kleinere Schädelplatten als Kontrollmäuse auf, was die Vermutung nahelegt, dass *IHH* auch an der Wachstumsregulation innerhalb der Suturen beteiligt ist (JACOB *et al.* 2007; LENTON *et al.* 2011). Die Signaltransduktion über *IHH* verhindert die Bildung der Repressor Form von *GLI3* (Abb. 4.1). *GLI3^R* wiederum beeinflusst die Osteoblasten Differenzierung durch die negative Regulation von *RUNX2* (OHBA *et al.* 2008; LOPEZ-RIOS *et al.* 2012). Wie wichtig diese Regulation in Suturen ist, zeigt sich in *Gli3^{-/-}* Mäusen, die unter anderem Kraniosynostose entwickeln (RICE *et al.* 2010). Die Dosisänderung von *IHH* durch den Zugewinn bei Patientin CRA_35 könnte also dazu führen, dass die Bildung des Repressors *GLI3^R* verhindert wird und dadurch die Osteoblasten Differenzierung gesteigert wird. Unterstützt wird diese These von Studien von Klopocki *et al.* und Will *et al.*, die zeigen konnten, dass eine gesteigerte *IHH* Expression durch Duplikation einer Enhancer Region bei Patienten und Mäusen zu Kraniosynostose und Syndaktylien führt (KLOPOCKI *et al.* 2011; WILL *et al.* 2017). Den gegenteiligen Effekt zeigt jedoch eine spezifische *Ihh* Überexpression in kranialen NLZ. Die Mäuse entwickeln kraniofaziale Malformationen mit Lippen- und Kieferspalten und bilden keine Schädelplatten (YANG *et al.* 2016). Dies zeigt allerdings auch, dass *IHH* an der Regulation des Schädelwachstums beteiligt ist, auch wenn noch weitere Studien nötig sind, um zu untersuchen, ob es eventuell eine kritische Grenze für einen *IHH* Dosis abhängigen Effekt gibt. In der Literatur sind mehrere Fälle von partiellen 2q Trisomien mit assoziierten Monosomien anderer Chromosomen beschrieben, allerdings bisher nicht in der Kombination wie sie bei Patientin CRA_35 vorliegt. Isolierte Trisomien von 2q33-qter sind sehr selten und zeigen je nach Größe der Region variable, aber auch einige gemeinsame, klinische Merkmale. Zu den häufigsten Auffälligkeiten zählen faciale Dysmorphien, Extremitätenfehlbildungen, Wachstums- und Entwicklungsverzögerungen sowie mentale Retardierung, Hypertelorismus, Epikanthus, eine breite Nasenwurzel, ein langes Philtrum, eine schmale Oberlippe, tief-sitzende Ohren sowie Mikrognathie sind charakteristische faciale Auffälligkeiten (SLAVOTINEK *et al.* 2003; ELBRACHT *et al.* 2009; PONNALA *et al.* 2012; MA *et al.* 2015). Der Phänotyp der Patientin CRA_35 passt in dieses Phänotypspektrum. Obwohl bei vielen Fällen *IHH* von der Trisomie betroffen ist, wurde bisher keine Kraniosynostose bei diesen Patienten beschrieben. Eine prominente Stirn war die häufigste vermerkte Auffälligkeit des Schädels. Drei Patienten der DECIPHER Datenbank (ID 260838, 265082, 331143) haben ähnlich große Zugewinne, der Großteil der Patienten jedoch deutlich kleinere, bei denen *IHH* nicht betroffen ist. Die drei Patienten haben zusätzliche, klinisch relevante Aberrationen auf den Chromosomen 4, 7, 9 und 17. Der Phänotyp von Patient 260838 ist mit Glaukom und Intelligenzminderung und der von Patient 265082 mit Katarakt,

Nystagmus, Iris Kolobom, Mikrokornea, Mikrophthalmie sowie sekundärer Amenorrhoe beschrieben. Bei Patientin CRA_35 wurde ebenfalls Glaukom beider Augen diagnostiziert. Neben *IHH* wurde in der Kraniosynostose Kohorte auch eine Variante in dessen Rezeptor *PTCH1* als mögliche genetische Ursache für eine syndromale Form der Kraniosynostose identifiziert. Zusätzlich zur Frontalnahtsynostose lagen Syn- und Polydaktylien der Füße vor (siehe 3.2.6). Die Variante c.3436G>A führt zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure 1146 nach Asparagin (siehe Abb. 3.17). *PTCH1* ist ein Transmembran Protein mit 12 Transmembrandomänen, zwei größeren extrazellulären Proteinloops, die die Bindung mit den HH Liganden vermitteln, sowie zwei intrazellulärer Domänen (JOHNSON *et al.* 1996; MARIGO *et al.* 1996; GONG *et al.* 2018). Durch die Ligandenbindung wird die Inhibition des Transmembranproteins SMO aufgehoben und die Signaltransduktion ins Zytoplasma vermittelt, die, wie bereits erwähnt, dazu führt, dass die Bildung von $GLI3^R$ verhindert wird (Abb. 4.1). Der Aminosäureaustausch p.D1146N ist in einer hoch konservierten extrazellulären Region (p.1142-1154) lokalisiert. Mutationen, die zur Haploinsuffizienz von *PTCH1* führen, sind assoziiert mit dem Basalzellenävis Syndrom (BCNS, OMIM 109400). Angeborene Fehlbildungen können bei diesen Patienten sein: Makrozephalie, mandibuläre Prognathie, ein hoher Gaumen, Rippenanomalien sowie Syn- und Polydaktylien. Kraniosynostose wurde bisher noch nicht im Zusammenhang mit BCNS beschrieben. Einige klinische Symptome entwickeln sich erst im Jugend- oder Erwachsenenalter wie beispielsweise Basalzellkarzinome und Kieferzysten (FUJII AND MIYASHITA 2014). Homozygote *Ptch1* Mutationen in Mäusen sind embryonal letal (GOODRICH *et al.* 1997; HAHN *et al.* 1998). Heterozygote *Ptch1*^{+/-} Mäuse hingegen zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie BCNS Patienten. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Knochenbildung festgestellt werden (GOODRICH *et al.* 1997; HAHN *et al.* 1998; OHBA *et al.* 2008). Feng *et al.* beschreiben jedoch auch Kraniosynostose der Lambdanaht bei Mäusen mit einer *Ptch1* Spleißmutation (FENG *et al.* 2013). In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass *Ptch1*^{+/-} Vorläuferzellen verstärkt zu Osteoblasten differenzieren. Des Weiteren wurde eine Reduktion von $GLI3^R$ festgestellt (OHBA *et al.* 2008). Die genannten Studien, der Zusammenhang von *IHH* mit Kraniosynostose sowie ein phänotypischer Vergleich machen es wahrscheinlich, dass die detektierte *PTCH1* Variante ursächlich für den Phänotyp von Patient CRA_43 ist. Eine Änderung der *PTCH1* Funktion oder Dosis könnte dazu führen, dass die Inhibition von SMO reduziert wird und somit verstärkte Signaltransduktion stattfinden kann. Dadurch wiederum wird die Bildung des Repressors $GLI3^R$ verhindert und es erfolgt eine Änderung in der Kontrolle der Osteoblasten Differenzierung. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei dem Patienten CRA_43 BCNS mit Kraniosynostose vorliegt, sollte regelmäßige Krebsvorsorge erfolgen. Zum letzten uns bekannten Untersuchungszeitpunkt zeigte der Patient noch keine Anzeichen für Kieferzysten oder Basalzellkarzinome.

4.1.5 Transkriptionsfaktoren

Es wurden neue potentiell pathogene Varianten in den Transkriptionsfaktoren MSX2, TCF12 und ERF identifiziert. Diese Transkriptionsfaktoren sind alle an der Osteoblasten Differenzierung beteiligt und Mutationen ihrer kodierenden Sequenzen sind bereits mit Kraniosynostose assoziiert. Ihre Pathogenese ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

MSX2

Das Gen, das 1993 als erste genetische Ursache für Kraniosynostose identifiziert wurde, ist *MSX2*. In einer Familie mit 19 betroffenen Personen über drei Generationen wurde zunächst die distale Region von 5q mit der Erkrankung assoziiert (MULLER *et al.* 1993). *MSX2* ist auf 5q35.2 lokalisiert und eine Sequenzierung ergab, dass alle Betroffenen die Mutation c.443C>A, p.P148H tragen (JABS *et al.* 1993). Die häufigsten phänotypischen Auffälligkeiten sind Kraniosynostose, starke Kopfschmerzen und Sehschwächen. Seltener sind milde Auffälligkeiten der Hände und Füße beschrieben (WARMAN *et al.* 1993). Der Phänotyp der Familie wurde als Kraniosynostose Typ Boston bezeichnet (Kraniosynostose 2, OMIM 604757). Lange Zeit waren die Betroffenen dieser Familien die einzigen Kraniosynostose Patienten, in denen eine *MSX2* Mutation nachgewiesen wurde. Erst 2013 und 2017 wurden drei weitere Familien mit Kraniosynostose und einer möglichen pathogene *MSX2* Variante beschrieben (FLORISSON *et al.* 2013; JANSSEN *et al.* 2013; MILLER *et al.* 2017).

Tabelle 4.1: Phänotypischer Vergleich von Kraniosynostose Patienten mit *MSX2* p.P148 Substitution

	MSX2 Mutation	Schädeldeformation	Skelettauffälligkeiten	zusätzliche Auffälligkeiten	
Familie CRA_48 3 Patienten	c.442C>G, p.P148A	Koronarnaht- synostose 2/3 Lambdanahtsynostose 1/3	verkürzte Phalangen der Daumen 2/3	Sehschwäche abfallende Lidachsen	3/3 2/3
Warman et al. 1993 19 Patienten	c.443C>A, p.P148H	frontoorbitale Rezession 8/19 prominente Stirn 2/19 Turribrachy- zephalus 7/19 Kleeblattschädel 2/19	dreigliedriger Daumen 1/19 verkürzte Mittelfußknochen 3/19 Weichgaumenspalte 1/19	Sehschwäche Kopfschmerzen Krampfanfälle	19/19 5/19 2/19
Florisson et al. 2013 8 Patienten	c.443C>T, p.P148L	Brachyzephalus 2/8 Turricephalus 2/8 Einzelnahtsynostose 3/8 multiple Synostose 1/8	Brachydaktylie 1/8 Hypertelorismus 2/8 verkürzte Phalangen 3/8	-	
Janssen et al. 2013 4 Patienten	c.443C>T, p.P148L	Skaphozephalus 2/4 Trigonozephalus 1/4 multiple Synostose 1/4	milde Klinodaktylie 1/4	Exophthalmus Syndaktylie	2/4 2/4
Miller et al. 2017 2 Patienten	c.443C>T, p.P148L	Koronarnaht- synostose 2/2	kurze, breite Daumen 1/2 kurzer Kleinfinger 1/2 Klinodaktylie 1/2	Strabismus	1/2

Bei allen Patienten dieser Familien ist auch Prolin an der Position 148 von der Substitution betroffen (c.443C>T, p.P148L). Innerhalb dieses Projekts konnte bei Patient CRA_48 an gleicher Aminosäureposition ein Austausch nachgewiesen werden, der innerhalb der Familie mit der Erkrankung segregiert (siehe Abb. 3.18). Hier erfolgt der Austausch von Prolin nach Alanin (c.442C>G, p.P148A). Tabelle 4.1 zeigt den Vergleich der beschriebenen klinischen Merkmale aller Familien. Hier zeigt sich, dass auch intrafamiliär eine hohe phänotypische Variabilität vorliegt. Neben Kraniosynostosen haben viele der Patienten milde Auffälligkeiten an den Händen und/oder Füßen sowie Sehschwächen.

MSX1 und MSX2 zählen zu den Homöobox Proteinen und sind Transkriptionsfaktoren. Während der Embryonalentwicklung wird *MSX2* unter anderem in den kranialen NLZ und an den Wachstumsfronten in den Suturen exprimiert (HILL *et al.* 1989; MACKENZIE *et al.* 1991; LIU *et al.* 1996). Die Bindung an DNA erfolgt über die Homöodomäne des Proteins. Die Domäne ist 60 Aminosäuren lang (MSX2 p.141-201) und bildet drei α -Helices aus, von denen zwei eine *helix-loop-helix* Struktur formen. Die Aminosäuresequenz der Homöodomäne ist evolutionär hoch konserviert (Abb. 4.3). In allen Kraniosynostose 2 Fällen ist die Aminosäure Prolin an der Position 148 von einem Austausch betroffen (Abb. 4.3 gelbe Markierung). Dieser N-terminale Bereich interagiert während der DNA-Bindung mit der kleinen Furche der DNA (HOVDE *et al.* 2001). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das veränderte P148H Protein eine höhere DNA Bindeaffinität hat als das wildtypische Protein (MA *et al.* 1996). Des Weiteren führt die transgene Expression des P148H Proteins in Mäusen zu einem gesteigerten Wachstum der parietalen Schädelpalten und letztendlich zu deren Fusion (LIU *et al.* 1995). Dies lässt einen Funktionsgewinn durch die Mutation P148H vermuten. Möglicherweise liegt bei P148L und P148A der gleiche Mechanismus vor, allerdings wurden dazu noch keine funktionellen Analysen durchgeführt. Interessant wäre, neben der Analyse der DNA Bindeaffinität, auch die Untersuchung des Einfluss der Varianten auf die transkriptionelle Aktivität von MSX2, durch beispielsweise Luziferase-Reporter Assays. Zellkultursysteme mit Osteoblasten Vorläufern könnten zur Analyse der Auswirkungen der *MSX2* Varianten auf die Osteoblasten Differenzierung verwendet werden. *In vivo* könnten die Varianten z.B. im Tiermodell *Danio rerio* untersucht werden.

Im Gegensatz zur transgenen *Msx2*-P148H Expression zeigen *Msx2* defiziente Mäuse eine verzögerte Ossifikation des Schädels durch eine gestörte Proliferation der Osteoblasten Vorläuferzellen (SATOKATA *et al.* 2000). Diese Studie verdeutlicht, dass MSX2 eine wichtige Rolle in der Regulation der Osteoblasten Differenzierung einnimmt. Auch im Menschen führen heterozygote *loss-of-function* Mutationen oder Deletionen von *MSX2* zu einer defekten Ossifikation der *Os parietale* (WILKIE *et al.* 2000; WUYTS *et al.* 2000; GARCIA-MINAUR *et al.* 2003; MAVROGIANNIS *et al.* 2006). Diese Erkrankung wird als Parietale Foramina 1 (OMIM 168500) bezeichnet. Die meisten Mutationen sind hierbei ebenfalls in der Homöodomäne lokalisiert (Abb.

4.2). Wilkie et al. konnten *in vitro* für die Mutationen p.159-160RKdel und p.R172H eine deutlich verringerte DNA Bindeaffinität zeigen (WILKIE *et al.* 2000).

	MSX2 Homöodomäne (60 AS)
human	NRKPRT P FTTSQLLALERKFRQKQYLSIAERA E FSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Familie CRA_48	NRKPRT A FTTSQLLALERKFRQKQYLSIAERA E FSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Jabs et al. 1993	NRKPRT H FTTSQLLALERKFRQKQYLSIAERA E FSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Florisson et al. 2013	NRKPRT L FTTSQLLALERKFRQKQYLSIAERA E FSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Janssen et al. 2013	NRKPRT L FTTSQLLALERKFRQKQYLSIAERA E FSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Maus	NRKPRT P FTTSQLLALERKFRQKQYLSIAERA E FSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Huhn	NRKPRT P FTTSQLLALERKFRQKQYLSIAERA E FSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Zebrafisch	NRKPRT P FTTSQLLALERKFRQKQYLSIAERA E FSSSLTLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Fruchtfliege	NRKPRT P FTTQQLSLEKKFREKQYLSIAERA E FSSSLRLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
<i>loss-of function</i> Mutationen assoziiert mit Parietaler Foramina 1	
Wilkie et al. 2000	NRKPRT P FTTSQLLALERKFRQKQYLSIA E H A E F SSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Wilkie et al. 2000	NRKPRT P FTTSQLLALE _ FRQKQYLSIAERA E FSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Wuyts et al. 2000	NRKPRT P FTTSQ P LALERKFRQKQYLSIAERA E FSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Mavrogiannis et al. 2006	NRKPRT P FTTSQLL P AP R PG A Q V PS E T V PL H CR A CR V L Q L S EP H RD P G Q N L V P EP K G Q G E

Abbildung 4.3: Aminosäure Alignment der MSX2 Homöodomäne verschiedener Spezies. Der Vergleich der MSX2 Homöodomäne-Sequenzen von Mensch, Maus, Huhn, Zebrafisch und Fruchtfliege zeigt, dass die Domäne evolutionär hoch konserviert ist. Prolin 148, die beschriebenen Mutationen und die Variante der Familie CRA_48 sind markiert. Des Weiteren sind beispielhaft vier Mutationen der Domäne aufgeführt, die mit Parietale Foramina 1 assoziiert sind.

Der Einfluss von MSX2 auf die Osteoblasten Differenzierung scheint komplex zu sein und der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Die bereits genannten Studien führen zu der Annahme, dass MSX2 fördernd auf die Osteoblasten Differenzierung wirkt. Wie bereits erwähnt, ist die Proliferation von Osteoblasten Vorläuferzellen in *Msx2*^{-/-} Mäusen reduziert. Damit verbunden ist eine Reduktion der *Runx2* Expression (SATOKATA *et al.* 2000). *Msx2* reguliert die *Runx2* Expression in der frühen Phase der Osteoblasten Differenzierung. Ichida et al. konnten außerdem zeigen, dass in den Vorläuferzellen die Adipozyten Differenzierung inhibiert und damit die Differenzierung zu Osteoblasten begünstigt wird (ICHIDA *et al.* 2004). Zusätzlich kann MSX2 die Proliferation der Vorläuferzellen stimulieren (DODIG *et al.* 1996; LIU *et al.* 1999; ISHII *et al.* 2003). Weitere *in vitro* Studien zeigen jedoch, dass MSX2 auch einen negativen Effekt auf die Differenzierung bzw. die Expression von Osteoblasten Markern haben kann. Beispiel hierfür ist die Bindung von *Msx2* an den Osteocalcin Promotor und der damit verbundenen Transkriptionshinhibition von Osteocalcin. Gleiches konnte auch für Typ I Kollagen gezeigt werden (TOWLER *et al.* 1994; DODIG *et al.* 1996; HOFFMANN *et al.* 1996; NEWBERRY *et al.* 1997). Diese Gene werden allerdings erst in der späteren Phase der Differenzierung exprimiert. Im Gegensatz zum fördernden Einfluss auf die *Runx2* Expression, steht die Inhibition der *Runx2* Aktivität durch die direkte Bindung von *Msx2* an *Runx2* (SHIRAKABE *et al.* 2001). Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass MSX2 in der frühen und späten Phase der Osteoblasten Differenzierung unterschiedliche Funktionen hat und somit eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Balance von Proliferation und Differenzierung innerhalb der Suturen einnimmt. Wie wichtig in diesem Gleichgewicht die Dosis von MSX2 ist, zeigte die

Überexpression von wildtypischem *Msx2* in Mäusen. Eine gesteigerte Proliferation der Osteoblasten Vorläufer und Fusion der Schädelplatten waren die Folgen in diesen Mäusen (LIU *et al.* 1995; LIU *et al.* 1999). Innerhalb der Kraniosynostose Kohorte wurde bei den beiden Patientinnen CRA_32 und CRA_58 partielle Trisomien von 5q durch Array-CGH nachgewiesen (siehe Abb. 3.6 und 3.8). Beide Aberrationen führen zu einem Zugewinn von *MSX2* und einigen anderen Genen. Bei Patientin CRA_32 wurde neben dem ca. 8 Mb Zugewinn von 5q auch ein 1,5 Mb Verlust von 2q detektiert, der als pathogen eingestuft wurde. Phänotypisch zeigten sich Fusion multipler Suturen, faziale Dysmorphien und eine Entwicklungsverzögerung (siehe 3.1.3) (KÖNIG *et al.* 2015). Eine unbalancierte Translokation mit 14 Mb großer, partieller 5q Trisomie und 4 Mb großer, partieller 8q Monosomie wurde bei Patientin CRA_58 nachgewiesen. Zusätzlich zur Pansynostose und fazialen Dysmorphien wurden bei ihr ein Hydrozephalus, Mittelgesichtshypoplasie und eine Chari II Malformation festgestellt (siehe 3.1.5). Bei beiden Patientinnen ist die vorzeitige Fusion von Schädelnähten sehr wahrscheinlich auf einen Zugewinn von *MSX2* zurückzuführen. In der Literatur sind mehrere Fälle von partieller 5q Trisomie, sowohl isoliert als auch in Kombination mit weiteren chromosomalen Aberrationen, beschrieben. Die Patienten zeigen einen sehr variablen Phänotyp mit Kleinwuchs, Mikrozephalie, kraniofazialen Auffälligkeiten und mentaler Retardierung. Seltener sind auch Fehlbildungen der Extremitäten, Herzerkrankungen oder Hernien beschrieben (RODEWALD *et al.* 1980; KUMAR *et al.* 1987; HUNTER *et al.* 2005; CHEN *et al.* 2006; KARIMINEJAD *et al.* 2009). Bei 13 dieser Patienten liegt nachgewiesen eine Kraniosynostose vor (KUMAR *et al.* 1987; ELIAS-JONES *et al.* 1988; VAN DER BURGT *et al.* 1992; SCHIMMENTI *et al.* 1995; WYSOCKA *et al.* 2002; SHIIHARA *et al.* 2004; BERNARDINI *et al.* 2007; WANG *et al.* 2007b; KARIMINEJAD *et al.* 2009; VASQUEZ-VELASQUEZ *et al.* 2011; PELEGRINO KDE *et al.* 2012).

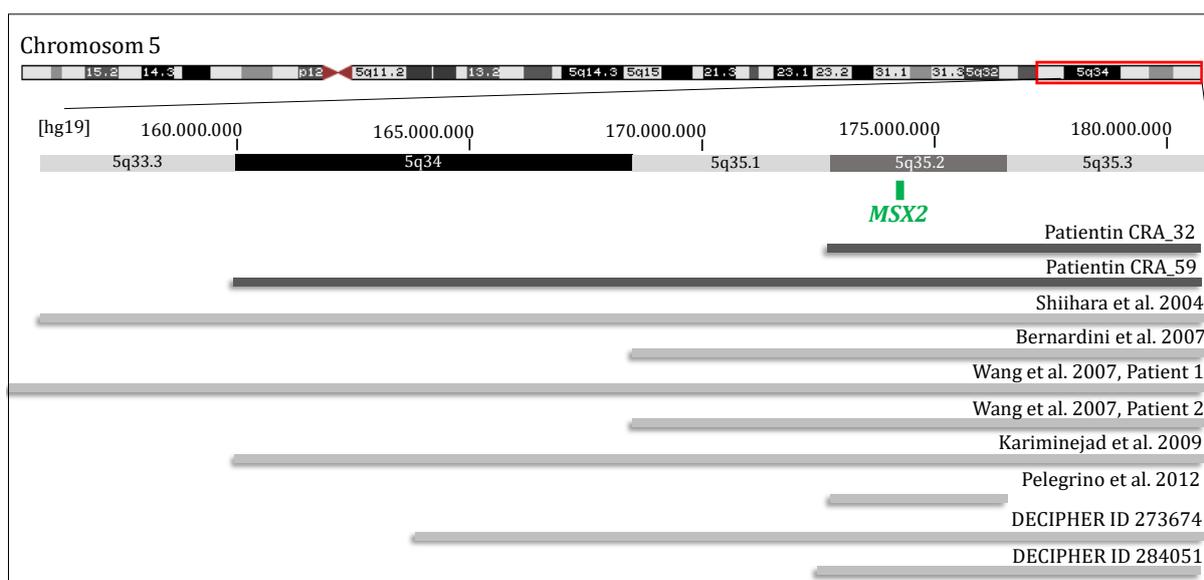


Abbildung 4.4: Vergleich partieller 5q Trisomien von Kraniosynostose Patienten. Der Bereich 5q33.3-qter ist vergrößert dargestellt und die Position von *MSX2* auf Chromosom 5 gekennzeichnet. Die Duplikationen der Patientinnen CRA_32 und CRA_58 sind hervorgehoben. Die Trisomien wurden durch Karyogramme, CGH oder Array-CGH detektiert.

Abbildung 4.4 zeigt einen Vergleich der partiellen 5q Trisomien von 6 dieser Kraniosynostose Patienten mit denen von den Patientinnen CRA_32 und CRA_58 sowie beispielhaft von zwei DECIPHER Patienten (ID 273674 und 284051). Die phänotypischen Merkmale werden in Tabelle 4.2 verglichen. Bei den 5q Aberrationen handelt es sich hauptsächlich um distale Trisomien der Zytobanden 5q33-qter, die alle auch *MSX2* betreffen. Insgesamt sind in DECIPHER 7 Patienten gelistet, bei denen dies auch der Fall ist (DECIPHER IDs 282073, 273674, 285499, 280719, 282379, 278114, 284051). Patient 273674 weist als einziger eine Kraniosynostose auf. Abgesehen von Patient 284051, für den eine abnormale Gesichtsform vermerkt ist, wurden bei den anderen Patienten keine kraniofazialen Auffälligkeiten beschrieben. Proximal gelegene Trisomien sind bisher nicht mit Kraniosynostose assoziiert. Allerdings ist Kraniosynostose auch nicht bei allen Patienten mit distalen Trisomien mit *MSX2* beschrieben. Häufig sind bei diesen jedoch auch auffällige Kopfformen vermerkt. Die Daten von *gain-of-function* und *loss-of-function* Mutationen sowie Überexpression von *MSX2* zeigen, dass für eine normale Schädelentwicklung eine korrekte *MSX2* Funktion und Dosis notwendig ist.

Tabelle 4.2: Klinische Auffälligkeiten von Patienten mit partieller 5q Trisomie

	5q Trisomie	weitere Aberration	Kranio-synostose	kraniofaziale Dysmorphien	zusätzliche Auffälligkeiten
Patientin CRA_32	5q35.2-qter	Monosomie 2q37.3-qter	koronar, lambda	Plagiozephalus / Mikrozephalus / Strabismus / abfallende Lidspalten / spitze Nase / flaches Philtrum / schmale Oberlippe / kleiner Mund / weit auseinanderstehende Zähne	Hypotonie / breite Daumen / Entwicklungsverzögerung
Patientin CRA_58	5q34-qter	Monosomie 8p23.3-pter	Kleeblattschädel	Mittelgesichtshypoplasie / Exophthalmus / Epikanthus / tief-sitzende Augen / hoher Gaumen	Chiari II Malformation / Antepositio ani / Klitoromegalie
Shiihara et al. 2004	5q33.3-qter	Monosomie 13q34-qter	sagittal, lambda	Turrizephalus / Hypertelorismus / schmale Unterlippe / kleiner Mund / hoher Gaumen / tief-sitzende Ohren	Herzfehler
Bernardini et al. 2007	5q35-qter	-	metopisch, sagittal, lambda	milder Exophthalmus / abfallende Lidspalten / kleine Nase / langes Philtrum / kleiner Mund / schmale Unterlippe / hoher Gaumen / tief-sitzende, rotierte Ohren	Herzfehler / Hypotonie / Wachstumsverzögerung / Leistenhernie / schwerer Reflux / Entwicklungsverzögerung
Wang et al. 2007 Patient 1	5q33-qter	Monosomie 10q26.3-qter	metopisch, sagittal, lambda	Brachyzephalus / hohe Stirn / abfallende Lidspalten / kurze Nase / langes Philtrum / schmale Unterlippe / tief-sitzende, rotierte Ohren	breite Daumen + Großzehe / Syndaktylie der II.-III. Zehen / Entwicklungsverzögerung

Wang et al. 2007 Patient 2	5q35.1-qter	Monosomie 17p13.3-pter	metopisch	Epikanthus / kurze Nase / hoher Gaumen / kleiner Mund	Brachyklino-daktylie V. Finger / milde Syndaktylie der II.-III. Zehen
Kariminejad et al. 2009	5q34-qter	Monosomie 2q37	metopisch, koronar	Hypertelorismus / abfallende Lidachsen / Epikanthus / kleine Nase / langes Philtrum / kleiner Mund / schmale Lippen / hoher Gaumen	Leistenhernie / Entwicklungsverzögerung
Pelegriño et al. 2012	5q35.2	Monosomie 4q22.1, 8p24.3, 9q34, 2q34.3	koronar	Strabismus / ansteigende Lidachsen / hoher Gaumen / tief-sitzende, rotierte Ohren / Retrognathie	Hypotonie / Hyponatriämie / Entwicklungsverzögerung
DECIPHER ID 273674	5q35.1-qter	Monosomie 5p14.3-pter	metopisch	Mikrozephalie / Mittelgesichts-hypoplasie / Hypotelorismus / Strabismus / ansteigende Lidspalten / schmale Lippen / langes Philtrum / hoher Gaumen	Kniefehlstellung / Klinodaktylie V. Finger / Intelligenzminderung

Der Phänotyp der Patientinnen CRA_32 und CRA_58 wird wahrscheinlich nicht nur durch die partielle 5q Trisomie verursacht, sondern die detektierten Monosomien tragen ebenfalls dazu bei. Partielle Monosomien von 2q und 8p wurden in der Literatur häufig beschrieben.

Auch wenn der Phänotyp variabel ausgeprägt ist, so zeigen Patienten mit 2q37 Deletionssyndrom (OMIM 600430) gemeinsame kraniofaziale Dysmorphien, wie eine prominente Stirn, eine eingesunkene Nasenwurzel, tief-sitzende Augen mit aufwärts zeigenden Lidspalten, volle Wangen und eine dünne Unterlippe. Zusätzlich sind kardiale, gastrointestinale oder renale Fehlbildungen in ca. 30% der Patienten beschrieben. Bisher ist bei keinem Patienten Kraniosynostose festgestellt worden (FALK AND CASAS 2007). Vor allem kraniofazial zeigt Patientin CRA_32 eine phänotypische Überlappung mit dem 2q37 Deletionssyndrom (siehe 3.1.3). Kariminejad et al. beschreiben einen Patienten, der die gleiche Kombination an chromosomalen Aberrationen zeigt wie Patientin CRA_32 (KARIMINEJAD *et al.* 2009). Wie in Tabelle 4.2 gezeigt, haben beide einen sehr ähnlichen Phänotyp.

In der Zytobande 8p23.1 sind segmentale Duplikationen lokalisiert, die dazu führen, dass chromosomale Veränderungen der distalen 8p Region relativ häufig sind (HOLLOX *et al.* 2008). In der Literatur sind ca. 50 Fälle von terminalen 8p Monosomien beschrieben, die in ihrer Größe jedoch stark variieren und damit auch der assoziierte Phänotyp. Fünf Patienten mit isolierter 8p23.1-pter Monosomie zeigen gemeinsame klinische Merkmale wie Wachstumsverzögerung, Mikrozephalie und milde faziale Dysmorphien. Intelligenzminderung, Verzögerung der sprachlichen Entwicklung und Verhaltensauffälligkeiten wurden ebenfalls beschrieben, allerdings keine Kraniosynostose (CHIEN *et al.* 2010; WU *et al.* 2010; BURNSIDE *et al.* 2013; SHI *et al.* 2017). Einige dieser klinischen Merkmale zeigt auch Patientin CRA_58 (siehe 3.1.5).

TCF12

TCF12 gehört zusammen mit TCF3 und TCF4 zu der Familie der E Proteine (Murre 1989). Neben einer *basic helix-loop-helix* (bHLH) Domäne besitzt TCF12 eine Repressordomäne und zwei Aktivierungsdomänen. Neben dem Haupttranskript NM_207037.1, das 21 Exons umfasst, kann auch ein alternatives, verkürztes Transkript NM_207040 durch einen alternativen Transkriptionsstart am sogenannten Exon 9A, sowie Spleißvarianten dieser Transkripte gebildet werden (WANG *et al.* 2006). Exon 9A ist in dem längeren Transkript nicht enthalten. Von beiden Transkripten entstehen funktionelle Proteine, die unterschiedliche Funktionen haben können (WANG *et al.* 2006). Verschiedene Studien deuten auf eine TCF12 Beteiligung an der T-Zell Entwicklung, Neurogenese, Myogenese sowie der Metastasenbildung bei Dickdarmkrebs hin (HU *et al.* 1992; NEUMAN *et al.* 1993; BARNDT *et al.* 2000; WANG *et al.* 2006; LEE *et al.* 2012). 2013 wurde *TCF12* erstmals mit Kraniosynostose assoziiert. Sharma *et al.* identifizierten 36 unterschiedliche, heterozygote *TCF12* Mutationen in Patienten mit unilateraler oder bilateraler Kraniosynostose (SHARMA *et al.* 2013). Daraufhin wurde das *TCF12* Mutationsspektrum durch Studien von di Rocco *et al.* und Paumard-Hernandez *et al.* erweitert (DI ROCCO *et al.* 2014; PAUMARD-HERNANDEZ *et al.* 2015). Hierbei handelt es sich bei den Mutationen um *loss-of-function* Mutationen, die hauptsächlich zwischen Exon 10 und Exon 19 lokalisiert sind. Die Exons in diesem Bereich kodieren für die Aktivierungsdomäne 2, die Repressordomäne und die bHLH Domäne (Abb. 4.5). *TCF12* Mutationen führen bei fast alle Patienten zu Koronarhaftsynostosen. Sofern weitere klinische Merkmale vorhanden sind, sind diese sehr variabel und können mit den klinischen Auffälligkeiten des Saethre-Chatzen Syndroms überlappen. So sind neben fazialen Dismorphien Auffälligkeiten der Extremitäten sowie Entwicklungsverzögerung oder Lernschwächen beschrieben (SHARMA *et al.* 2013; DI ROCCO *et al.* 2014; PAUMARD-HERNANDEZ *et al.* 2015; LEE *et al.* 2017). Des Weiteren zeigte sich, dass klinisch unauffällige Familienmitglieder die gleiche Mutation tragen können wie das betroffene Mitglied. Die unvollständige Penetranz lag in der Studie von Sharma *et al.* bei 53% (SHARMA *et al.* 2013).

Innerhalb dieser Arbeit wurden durch das Kraniosynostose Panel bei drei Patienten potentiell pathogene *TCF12* Varianten detektiert (siehe 3.2.9, 3.2.10 und 3.2.11). Alle drei Varianten führen sehr wahrscheinlich zu einer Haploinsuffizienz von TCF12 durch eine Leserasterverschiebung (c.825delG, p.S276Vfs*12), eine veränderte Spleißstelle (c.1036-1G>C) und ein vorzeitiges Stopcodon (c.1885C>T, p.Q629*) (NM_207037.1).

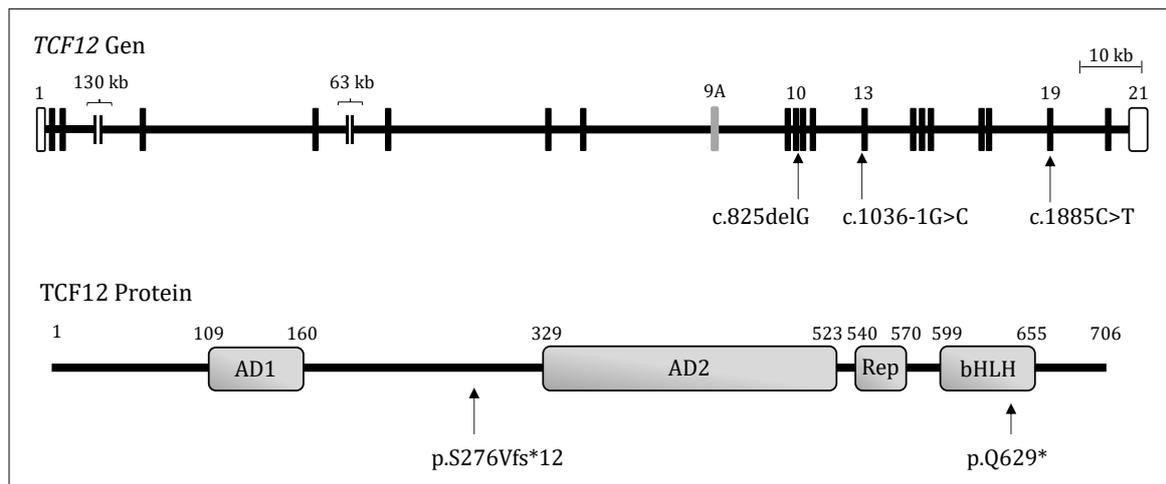


Abbildung 4.5: Lokalisation der detektierten *TCF12* Varianten. Die Varianten der Patienten CRA_56, CRA_64 und CRA_80 sind sowohl im Gen als auch im Protein gekennzeichnet. Die Spleißvariante c.1036-1G>C wird im Protein jedoch nicht dargestellt. *TCF12* besitzt 21 Exons, von denen Exon 1 und 21 nicht kodierend sind (weiß). Der alternative Transkriptionsstart Exon 9A ist in grau dargestellt und ist in dem Haupttranskript NM_207037.1 nicht enthalten. Das Protein besteht aus 706 Aminosäuren und enthält zwei Aktivierungsdomänen (AD1 und AD2), eine Repressordomäne (Rep) und eine bHLH Domäne.

Das Stopcodon entsteht innerhalb der bHLH Domäne und führt dazu, dass diese nicht mehr vollständig im Protein enthalten ist (Abb. 4.5).

Der Nukleotidaustausch am Spleißakzeptor von Exon 13 (c.1036-1G>C) ändert laut Vorhersageprogrammen dessen Sequenz so, dass das Spleißosom den Akzeptor nicht mehr erkennen würde (siehe Abb. 3.22). Da eine Analyse der Patienten mRNA auf ein verändertes Spleißmuster nicht möglich war, wurde die Variante in einem *in vitro* Spleißsystem analysiert (siehe 3.4.1 C). Hier zeigte sich, dass die Variante eine Änderung des Spleißmusters bewirkt. Es werden zwei alternative Spleißakzeptoren innerhalb von Exon 13 genutzt (siehe Abb. 3.25). Die alternativen Exongrenzen lägen bei c.1059 und c.1062. Dies hätte in beiden Fällen eine Leserasterverschiebung mit einem vorzeitigen Stopcodon zur Folge. Große Teile der Aktivierungsdomäne 2, die Repressordomäne sowie die bHLH Domäne würden in den trunkierten Proteinen fehlen und somit würde eine Haploinsuffizienz von *TCF12* vorliegen.

Bei Patientin CRA_64 ist das letzte Nukleotid von Exon 10 deletiert (c.825delG), wodurch zwei *loss-of-function* Effekte möglich sind (siehe Abb. 3.21). Zum einen führt die Deletion zu einer Leserasterverschiebung mit einem vorzeitigen Stopcodon (p.S276Vfs*12). Das verkürzte Proteine würde nur die Aktivierungsdomäne 1 enthalten und wäre somit nicht funktionell. Zum anderen könnte die Deletion auch das Spleißverhalten beeinflussen, da dadurch der Spleißdonor geschwächt wird. Die *in vitro* Analyse in dem Minigensystem zeigte, dass ein kryptischer Spleißdonor in Intron 10-11 genutzt wird und das Transkript 22 bp intronische Sequenz enthält, was zu einem vorzeitigen Stopcodon führt (siehe Abb. 3.24). Somit scheint die Variante c.825delG in jedem Fall in eine *TCF12* Haploinsuffizienz zu resultieren. Im *in vitro* Spleißsystem führten jedoch sowohl Wildtyp als auch Variante in manchen Transkripten zu einem *Exon Skipping* von Exon 10. Möglicherweise wurden in den Vektor nicht alle intronischen

Sequenzelemente, die für das effiziente Spleißen von Exon 10 notwendig sind, eingebracht. Mit dem *in vitro* System kann nur ein kleiner Teil der prä-mRNA dargestellt werden.

Der Phänotyp der drei Patienten variiert stark, von isolierter bilateraler Koronarnahtsynostose bis zu Kleeblattschädel mit zusätzlichen klinischen Auffälligkeiten.

Neben den drei Sequenzvarianten konnte durch Array-CGH eine heterozygote, partielle Deletion von *TCF12* bei den Zwillingenbrüdern CRA_1 und CRA_2 detektiert werden (Abb. 4.6). Die 193 kb große Deletion wurde durch qPCR validiert und betrifft Exon 6 bis Exon 21 von *TCF12* (siehe Abb. 3.2) Das entstehende Protein wäre stark verkürzt und alle wichtigen Domänen würden fehlen, sodass in diesem Fall auch eine Haploinsuffizienz von *TCF12* vorliegt. Die Aberration wurde maternal vererbt. Patient CRA_1 hat eine unilaterale und Patient CRA_2 bilaterale Koronarnahtsynostose. Die Mutter hingegen ist phänotypisch unauffällig, sodass man davon ausgehen kann, dass in dieser Familie auch unvollständige Penetranz vorliegt. In der Literatur sind weitere Kraniosynostose Fälle mit chromosomalen Veränderungen, die *TCF12* betreffen, beschrieben (Abb. 4.6).

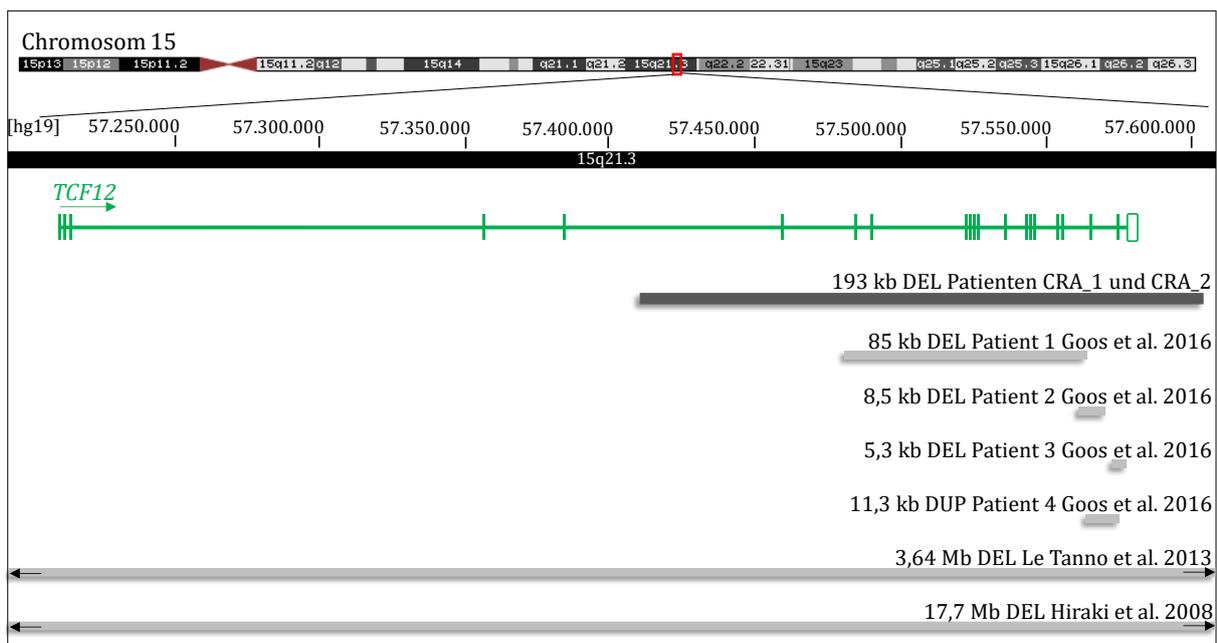


Abbildung 4.6: Positionsvergleich von *TCF12* Deletionen und Duplikationen assoziiert mit Kraniosynostose. Das *TCF12* Gen ist auf Chromosom 15 (15q21.3) lokalisiert. Bereits publizierte Fälle weisen sowohl intragenische Deletionen und Duplikationen als auch Deletionen des ganzen Gens auf (HIRAKI *et al.* 2008; LE TANNO *et al.* 2014; GOOS *et al.* 2016). Dabei sind die intragenischen Veränderungen nur am 3'Ende des Gens lokalisiert.

Hierbei handelt es sich sowohl um intragenische Deletionen und Duplikationen, die nur wenige Exons betreffen, als auch um größere Deletionen, die mehrere Gene umfassen (FUKUSHIMA *et al.* 1990; HIRAKI *et al.* 2008; LE TANNO *et al.* 2014; GOOS *et al.* 2016). Die heterozygoten, intragenischen Deletionen betreffen entweder die Aktivierungsdomäne 2 oder die bHLH Domäne und führen somit zu einem nicht-funktionellen Protein (GOOS *et al.* 2016). Die betroffenen Kraniosynostose Patienten zeigen, wie auch die Patienten mit *TCF12* Mutationen, einen variablen Phänotyp. Dadurch lässt sich keine Genotyp-Phänotyp Korrelation feststellen.

Manche Patienten mit nur kleinen Deletionen zeigen einen syndromalen Phänotyp, andere Patienten, bei denen die gleiche Region oder das gesamte *TCF12* Gen betroffen ist, zeigen einen milderen Phänotyp (FUKUSHIMA *et al.* 1990; HIRAKI *et al.* 2008; LE TANNO *et al.* 2014; GOOS *et al.* 2016). Des Weiteren beschreibt Piard *et al.* eine Patientin ohne Kraniosynostose, die eine 120 kb Deletion besitzt, die Exon 19 bis 21 von *TCF12* betrifft. Bei ihr wurden faziale Asymmetrie, Entwicklungsverzögerung sowie Intelligenzminderung festgestellt (PIARD *et al.* 2015). Die Datenbank DECIPHER ergab 12 Patienten, die überlappende Deletionen für diesen Chromosomen Abschnitt besitzen. Alle Deletionen sind deutlich größer (>500 kb) als die von den Patienten CRA_1 und CRA_2 (Anhang E). Für 8 Patienten sind klinische Daten hinterlegt worden. Diese Beschreibungen beinhalten jedoch weder Kraniosynostose noch den Vermerk einer auffälligen Kopfform. Das häufigste Merkmal ist Intelligenzminderung.

Die Pathogenese von *TCF12* Haploinsuffizienz ist noch nicht vollständig geklärt. Yi *et al.* konnten jedoch zeigen, dass eine *TCF12* Überexpression die Osteoblasten Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen inhibiert. Die Herunterregulierung von *TCF12* hingegen fördert die Differenzierung und ist mit einem Anstieg an BMP Signalen verbunden (Yi 2017). Hierbei scheint die Heterodimerbildung mit TWIST1 eine wichtige Rolle zu spielen (Abb. 4.1). Wie in Kapitel 1.4 erläutert, kann TWIST1 Heterodimere mit E Proteinen bilden (T/E) und tut dies auch nachweislich mit *TCF12* (CONNERNEY *et al.* 2006). Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass TWIST1 und *TCF12* zusammen eine deutlich höhere transkriptionelle Aktivität zeigen als die jeweiligen einzelnen Proteine (SHARMA *et al.* 2013). T/E Dimere sind vor allem in Bereichen der Wachstumsfronten lokalisiert, an denen sie die Expression von *FGFR2* und damit die Proliferation der Zellen inhibieren. Sie tragen somit zu dem Gleichgewicht aus Proliferation und Differenzierung in den Suturen bei. Dies führt zur Annahme, dass Haploinsuffizienzen der Dimerpartner TWIST1 und *TCF12* ein Ungleichgewicht innerhalb der Suturen bewirken, was wiederum zu einer vorzeitigen Fusion führen kann. Wie wichtig TWIST1 und *TCF12* zusammen für die Erhaltung der Suturen sind, wurde in Mausstudien gezeigt. Beide Koronarnähte waren bei fast allen *Twist1*^{+/-}, *Tcf12*^{fllox/+} Mäusen vollständig fusioniert. Dahingegen trat bei *Twist1*^{+/-} Mäusen eine Fusion nur partiell und bei *Tcf12*^{fllox/+} Mäusen keine Fusion auf (SHARMA *et al.* 2013). Die Diskrepanz zwischen Haploinsuffizienz in Mäusen und im Menschen könnte daran liegen, dass die humanen Koronarnähte sensitiver auf Dosisänderungen von *TCF12* reagieren. Ein Knockout von *Tcf12* in Mäusen führt zu Defekten in der Entwicklung des Immunsystems (WANG *et al.* 2006; WOJCIECHOWSKI *et al.* 2007). Sharma *et al.* konnten allerdings weder eine erhöhte Infektanfälligkeit noch Änderungen der Zellen des Immunsystems bei *TCF12* Patienten feststellen (SHARMA *et al.* 2013). Zur weiteren Aufklärung der *TCF12* Funktion werden in unserer Arbeitsgruppe von R. Blümel verschiedene Zebrafischlinien erstellt und in einem Reporter System die Auswirkungen der humanen *TCF12* Mutationen auf die transkriptionelle Aktivität untersucht.

ERF

ERF (ETS2) gehört zu der Familie der ETS Transkriptionsfaktoren und wirkt als transkriptioneller Repressor. Neben einer Repressordomäne und einer DNA-Bindedomäne besitzt ERF auch eine ERK Bindedomäne. ERF wird ubiquitär, unter anderem an den Wachstumsfronten der Schädelplatten, exprimiert und ist an der Regulation der zellulären Proliferation beteiligt (LE GALLIC *et al.* 1999; HOLLENHORST *et al.* 2011; TWIGG *et al.* 2013). Twigg *et al.* assoziierten heterozygote *loss-of-function* Mutationen von *ERF* mit Kraniosynostose (TWIGG *et al.* 2013). Hierbei sind häufig multiple Suturen von einer Fusion betroffen. Kraniofaziale Auffälligkeiten wie Hypertelorismus oder eine prominente Stirn, Chiari Malformation sowie sprachliche Entwicklungsverzögerung gehören ebenfalls zum phänotypischen Spektrum (TWIGG *et al.* 2013; CHAUDHRY *et al.* 2015). Durch NGS Panel Analyse wurde bei Patientin CRA_34 eine 1 bp Deletion im *ERF* Gen detektiert, die zu einer Verschiebung des Leserasters und folglich zu einem vorzeitigen Stoppcodon führt (c.151del G, p.D51Tfs*26; siehe Abb. 3.16). Von dem vorzeitigen Stopp sind alle ERF Proteindomänen betroffen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Variante zu einer ERF Haploinsuffizienz bei der Patientin führt. Die klinisch ebenfalls betroffene Schwester trägt die gleiche Variante. Bei beiden liegt eine Sagittalnahtsynostose, Hypertelorismus, Exophthalmus, eine sprachliche Entwicklungsverzögerung sowie eine Lernstörung vor. Der Phänotyp passt zu den bereits beschriebenen Patienten mit *ERF* Mutation. Die Segregationsanalyse wies die Variante auch bei dem phänotypisch unauffälligen Vater nach. Dennoch wird die Variante als wahrscheinlich pathogen eingestuft, da in der Studie von Twigg *et al.* ebenfalls Familienmitglieder beschrieben sind, die Anlageträger sind, aber nur milde kraniofaziale Auffälligkeiten zeigen, sodass vermutlich unvollständige Penetranz vorliegt (TWIGG *et al.* 2013). In Mäusen führt der heterozygote Verlust von *Erf* zu keinem Phänotyp. Im Gegensatz dazu ist der homozygote Verlust schon embryonal letal (PAPADAKI *et al.* 2007). Um die embryonale Sterblichkeit zu umgehen wurde ein Allel konditionell deletiert. Bei diesen *Erf^{loxP/-}* Mäusen sind mehrere Suturen von Kraniosynostose betroffen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ERF in der Nähe von RUNX2 Bindestellen an die DNA bindet und die transaktivierende Aktivität von RUNX2 hemmen kann (Abb. 4.1) (TWIGG *et al.* 2013). Möglicherweise hat die ERF Bindung Einfluss auf die Bildung regulatorischer Komplexe anderer Transkriptionsfaktoren wie RUNX2 und beeinflusst dadurch die Transkription von Osteoblasten Markern. Eine ERF Haploinsuffizienz könnte zu einer Aufhebung der transkriptionellen Suppression und damit einer unregulierten Proliferation und Differenzierung führen. Es sind jedoch weitere Studien nötig um die genaue Interaktion von ERF mit RUNX2 aufzuklären. Die Wirkung von ERF kann durch die Effektor kinase ERK1 und somit auch durch den FGF Signalweg, reguliert werden. ERF kann an ERK1 binden und wird von dieser an mehreren Stellen phosphoryliert. Die Phosphorylierung bewirkt den Export von ERF aus dem Zellkern (Abb. 4.1) (LE GALLIC *et al.* 2004; POLYCHRONOPOULOS *et al.* 2006).

4.1.6 weitere Faktoren

MEGF8

Twigg et al. identifizierten homozygote und *compound* heterozygote Mutationen in dem Gen *MEGF8* als genetische Ursache für einen syndromalen Phänotyp bei vier Patienten. Neben Kraniosynostose und fazialen Dysmorphien können bei den Patienten auch Polysyndaktylien, Adipositas, Hodenhochstand, Herzdefekte und Lateralisierungsdefekte vorliegen (Tabelle 4.3) (TWIGG *et al.* 2012). Da die klinischen Merkmale mit dem Carpenter Syndrom überlappen, wird der Phänotyp dieser Patienten als Carpenter Syndrom 2 (OMIM 614976) bezeichnet. Es handelt sich um ein sehr seltenes Syndrom. Bisher wurden keine weiteren Patienten in der Literatur beschrieben. In der hier untersuchten Kraniosynostose Kohorte wurden zwei neue, potentiell pathogene *MEGF8* Varianten bei drei Patienten identifiziert (NM_001410, Abb. 4.7). Die Phänotypen der Patienten CRA_18, CRA_19 und CRA_49 werden in Tabelle 4.3 mit den klinischen Merkmalen der publizierten Fälle verglichen. Im Gegensatz zu diesen Fällen zeigen die drei Patienten keine Lateralisierungs- oder Herzdefekte.

Tabelle 4.3: Phänotypischer Vergleich von Patienten mit *MEGF8* Varianten

	CRA_18	CRA_19	CRA_49	Twigg et al. 2012
Geschlecht	M	M	M	3xM, 1xW
Kraniosynostose	+	sagittal	metopisch	(4/4)
Kraniosfaziale Auffälligkeiten	Hypertelorismus / Epikanthus / breite Nasenwurzel / große, tief-sitzende und revertierte Ohren	tief-sitzende und revertierte Ohren	abfallende Lidachsen / gebogene Augenbrauen	(4/4)
Akrale Auffälligkeiten	verbreiterte Daumenendglieder / Klinodakylie des V. Fingers	verbreiterte Daumenendglieder / Kamptodakylie der II. Finger	-	(4/4)
Syndaktylie	Partiell II.-III. und III.-IV. Finger I.-V. Zehe	I.-II. Finger I.-V. Zehe	I.-II. Finger I.-V. Zehe	(4/4)
Polydaktylie	Hexadaktylie der Füße	Hexadaktylie der Füße	Hexadaktylie der Hände und Füße	(2/4)
Lateralisierungsdefekte	-	-	-	(3/4)
Herzdefekt	-	-	-	(4/4)
Genitalien	Hodenhochstand	Hodenhochstand	Hodenhochstand	(3/3)
weiter Mamillenabstand	-	-	+	(4/4)
Entwicklungsverzögerung	+	-	?	(2/3)

Bei den Brüdern CRA_18 und CRA_19 wurde die homozygote Variante c.828G>A detektiert, die keine Änderung der Aminosäure bewirkt (p.P276P), aber die Spleißdonorsequenz von Exon 5 ändert. Die konsanguinen Eltern sind heterozygot für die Variante (siehe Abb. 3.14). Spleißvorhersage Programme bewerten die Veränderung als einen Verlust des Spleißdonors. Mit einem Minigen-System wurde daraufhin der Einfluss der Variante auf das Spleißmuster untersucht (siehe 3.4.1 a). Es zeigte sich, dass durch die Variante ein *Exon Skipping* von Exon 5 erfolgt (siehe Abb. 3.23). Dadurch würde es zu einer Verschiebung des Leserasters kommen, was in einem vorzeitigen Stopcodon resultiert (p.Q248Cfs*20). *Exon Skipping* trat allerdings auch bei einem Teil der Transkripte mit der wildtypischen Sequenz auf. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Wildtyp Spleißdonor auch nicht optimal von dem Spleißosom erkannt wird. In dem *in vitro* System wird jedoch auch nur ein kleiner Teil der prä-mRNA analysiert, sodass es möglich ist, dass sich das *in vitro* Spleißmuster von dem *in vivo* unterscheidet.

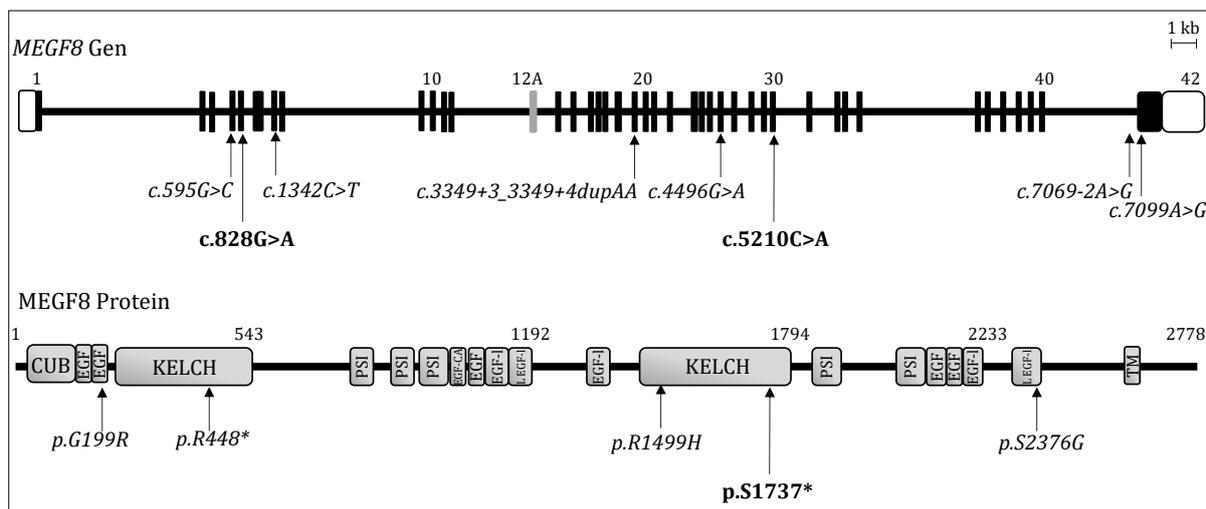


Abbildung 4.7: Lokalisation der *MEGF8* Varianten auf Genom- und Protein Ebene. Das Gen besteht aus 42 Exons und es werden zwei alternative Transkripte gebildet. Das alternative Exon 12A ist grau markiert. Das Transkript NM_001410.2 wurde als Referenz verwendet. Die von Twigg et al. publizierten homozygoten bzw. *compound* heterozygoten Mutationen sind kursiv dargestellt (TWIGG *et al.* 2012). Die in dieser Arbeit identifizierten Varianten sind hervorgehoben, die Spleißvariante auf Protein Ebene jedoch nicht gekennzeichnet. Das Protein besteht aus verschiedenen Domänen: einer CUB Domäne, 5 EGF Domänen, einer EGF-CA Domäne, drei EGF-like Domänen, zwei Laminin EGF-like Domänen, zwei Kelch Domänen, 5 PSI Domänen sowie einer Transmembrandomäne. Die bisher beschriebenen Mutationen sind über das gesamte Gen bzw. Protein verteilt.

Eine Stopmutation wurde bei Patient CRA_49 identifiziert (c.5210C>G, p.S1737*), dessen Phänotyp in das klinische Spektrum von Carpenter Syndrom 2 passt (Tabelle 4.3). Die Variante liegt allerdings nur heterozygot vor und wurde von seiner klinisch unauffälligen Mutter vererbt (siehe Abb. 3.19). Die bisher beschriebenen Fälle tragen alle homozygote oder *compound* heterozygote Mutationen und ihre heterozygoten Familienmitglieder sind phänotypisch unauffällig (TWIGG *et al.* 2012). Eine zweite, potentiell pathogene Variante in der kodierenden Sequenz von *MEGF8* sowie eine größere Deletion wurden ausgeschlossen. Daraufhin wurde untersucht, ob es trotz gleicher Variante Unterschiede in der *MEGF8* Expression zwischen

Mutter und Sohn gibt. Es zeigte sich, dass bei beiden die mRNA Menge reduziert ist und kein Unterschied zwischen Mutter und Sohn besteht (siehe Abb. 3.19 C). Dies macht es unwahrscheinlicher, dass die Variante von Patient CRA_49 die alleinige genetische Ursache für seinen Phänotyp ist. Da jedoch über MEGF8 und seine Funktion bisher sehr wenig bekannt ist, wird die Variante weiterhin als Variante mit unklarer klinischer Relevanz eingestuft.

Es ist bekannt, dass MEGF8 multiple Proteindomänen besitzt, von denen manche Protein-Protein-Interaktionen eingehen können (Abb. 4.7). Trotz einer Transmembrandomäne ist MEGF8 nicht in der Zellmembran, sondern im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert (ZHANG *et al.* 2009). Welche Funktion es dort hat, ist noch unbekannt. Sowohl in Mäusen als auch im Zebrafisch wird *Megf8* ubiquitär exprimiert (ZHANG *et al.* 2009; ENGELHARD *et al.* 2013). Mäuse mit homozygoten *Megf8* Mutationen zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die Patienten: Polydaktylien aller Extremitäten, verzögerte Ossifikation der Rippen, Lateralisierungsdefekte und angeborene Herzfehler (ZHANG *et al.* 2009; ENGELHARD *et al.* 2013). Auch im Zebrafisch kommt es zu einer Störung der Lateralisierung von Herz und Darm (ZHANG *et al.* 2009). Der homozygote Verlust des Drosophila *MEGF8* Homologs ist bereits im Larven Stadium letal (LLOYD *et al.* 2018). Es gibt sowohl in Mäusen, als auch in Drosophila erste Hinweise darauf, dass MEGF8 am BMP Signalweg beteiligt sein könnte (ENGELHARD *et al.* 2013; LLOYD *et al.* 2018). Weitere Studien sind nötig, um die Funktion und die Interaktionspartner von MEGF8 aufzuklären. Möglicherweise liegt bei Patient CRA_49 noch zusätzlich eine Veränderung innerhalb des Wirkmechanismus von MEGF8 vor, sodass dies zusammen mit der *MEGF8* Variante den Phänotyp des Patienten verursacht.

HUWE1

Das X-chromosomale Gen *HUWE1* kodiert für eine E3 Ubiquitin Protein Ligase. Das 4374 Aminosäure große Protein wird ubiquitär exprimiert. Es wurde gezeigt, dass HUWE1 an der Neurogenese, Spermatogenese, Genomstabilität und Tumorgenese beteiligt ist (CHEN *et al.* 2005; ZHAO *et al.* 2008; PARSONS *et al.* 2009; ZHAO *et al.* 2009; D'ARCA *et al.* 2010; CHOE *et al.* 2016; BOSE *et al.* 2017; FOK *et al.* 2017; MYANT *et al.* 2017). Mutationen sowie Mikroduplikationen von *HUWE1* sind vor allem in männlichen Patienten assoziiert mit Intelligenzminderung, fazialen Dysmorphien und Minderwuchs (FROYEN *et al.* 2008; MOORTGAT *et al.* 2018). Deletionen sind jedoch bisher nicht beschrieben und könnten möglicherweise letal sein, da *Huwe1*^{-/-} Mäuse embryonal eine hohe Sterblichkeit aufweisen (ZHAO *et al.* 2008; ZHAO *et al.* 2009). Durch das NGS Kraniosynostose Genpanel wurde bei Patient CRA_14 eine *HUWE1* Variante (c.329G>A, p.R110Q, siehe Abb. 3.13) detektiert. In der Literatur sind bisher nur vier weitere Kraniosynostose Patienten mit *HUWE1* Mutationen beschrieben (AVANSINO *et al.* 1999; TAYLOR *et al.* 2015; ZHU *et al.* 2015; MILLER *et al.* 2017; MOORTGAT *et al.* 2018). Bei allen ist die gleiche, evolutionäre hoch konservierte Aminosäure Arginin an Position 110 von einer Substitution betroffen. Diese liegt in

der DUF908 Domäne des Proteins, deren Funktion noch unbekannt ist. Die Phänotypen aller Patienten mit *HUWE1* p.R110 Mutationen sind in Tabelle 4.4 miteinander verglichen. Moortgat et al. publizierten eine Patientin (P1), die ebenfalls die p.R110Q Mutation hat, jedoch keine Kraniosynostose entwickelt hat (MOORTGAT *et al.* 2018). Patient CRA_14 und Patientin P3 waren noch zu jung, um eine Beurteilung ihrer Intelligenz durchzuführen. Insgesamt scheinen Substitutionen von p.R110 ursächlich für einen spezifischen Phänotyp aus Intelligenzminderung, fazialen Dysmorphien und Kraniosynostose zu sein. Bei allen Patientinnen wurde die X-Inaktivierung untersucht und dabei festgestellt, dass präferentiell die Expression des mutierten Allels erfolgt (>90%) (TAYLOR *et al.* 2015; MOORTGAT *et al.* 2018). Bisher ist die Pathogenese von *HUWE1* noch unklar. *HUWE1* scheint in unterschiedlichen Zellen verschiedene Zielproteine zu haben, die polyubiquitiniert werden (D'ARCA *et al.* 2010; VAUGHAN *et al.* 2015; MANDEMAKER *et al.* 2017; Qu *et al.* 2018). In humanen 293T Zellen, murinen intestinalen Stammzellen, *Drosophila mel.* und *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass *HUWE1* mit dem WNT Signalweg interagiert und hier eine regulatorische Funktion einnimmt (VANDEWALLE *et al.* 2013; DE GROOT *et al.* 2014; DOMINGUEZ-BRAUER *et al.* 2017). Es sind jedoch noch weitere Studien notwendig, um zu klären, wie *HUWE1* Mutationen zu diesem Phänotyp und im Speziellen wie die p.R110Q/W Mutationen zu Kraniosynostose führen.

Tabelle 4.4: Phänotypischer Vergleich von Patienten mit *HUWE1* p.R110Q bzw. p.R110W Mutation

	<i>HUWE1</i> Variante	Kranio- synostose	kraniofaziale Dysmorphien	zusätzliche Auffälligkeiten
Patient CRA_14	c.329G>A p.R110Q	metopisch / koronar bilateral / lambda	Turrizephalus / flaches Mittelgesicht / Exophthalmus / abfallende Lidachsen / breite Nasenwurzel / antevertierte Nares / tief-sitzendes rechtes Ohr / langes Philtrum / kleiner Mund mit schmalem Oberkiefer / hoher Gaumen	Hörstörung
Moortgat et al. 2017 Patientin P1	c.329G>A p.R110Q	-	hohe Stirn / flaches Mittelgesicht / abfallende Lidachsen / kleine Nase / tief-sitzende rotierte Ohren / kurzes Philtrum / schmale Oberlippe / dentale Anomalien	Skoliose / Brachydaktylie / kurze distale Phalangen / milde Intelligenzminderung
Moortgat et al. 2017 Patientin P3	c.329G>A p.R110Q	metopisch / koronar	Mikrozephalie / hohe Stirn / Hypertelorismus / Strabismus / kleine Nase / schmale Oberlippe	Syndaktylie II.-III. Zehe / motorische Entwicklungsverzögerung
Miller et al. 2016 Patient 14	c.328C>T p.R110W	metopisch	faziale Dysmorphien / dentale Anomalien	Pectus excavatum / Skoliose / Chiari Malformation / mittlere- schwere Intelligenzminderung

Taylor et al. 2015 Patientin CRS_4659	c.329G>A p.R110Q	multiple	hohe Stirn / flaches Mittelgesicht / Epikanthus / abfallende Lidachsen / Strabismus / kleine Nase / schmale Oberlippe / hoher Gaumen / dentale Anomalien	Hörstörung / Brachydaktylie / kurze distale Phalangen / Hypotonie / Chiari Malformation / sprachliche Entwicklungsverzögerung / milde Intelligenzminderung
Zhu et al. 2015 Patient 99	c.328C>T p.R110W	koronar unilateral	Strabismus	Hörstörung / Chiari I Malformation / Entwicklungsverzögerung

Mit Patient CRA_14 konnte dazu beigetragen werden Substitutionen von p.R110 als genetische Ursache für einen spezifischen Phänotyp aus Intelligenzminderung und Kraniosynostose zu bestätigen. Um die Pathogenese von *HUWE1* zu untersuchen, wurden erste Versuche in *Danio rerio* durchgeführt. *HUWE1* ist ein evolutionär konserviertes Gen, das 81% Sequenzähnlichkeit zwischen Mensch und Zebrafisch aufweist. Die Expressionsanalyse in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben ergab, dass *huwe1* zu fast allen Zeitpunkten und in allen Geweben stark exprimiert wird (siehe 3.4.3). Daraufhin wurde das Expressionsmuster in 24 hpf und 52 hpf Embryonen analysiert. Eine besonders starke Expression ließ sich im Gehirn feststellen. Dies passt zu den Beobachtungen, dass *HUWE1* an der embryonalen Neurogenese beteiligt ist. Bei 52 hpf Embryonen ließ sich zudem eine Expression im otischen Vesikel und den Flossenansätzen nachweisen. Bei einigen *HUWE1* Patienten, u.a. CRA_14, wurden Hörstörungen und milde Malformationen der Hände und Füße festgestellt. *Danio rerio* eignet sich somit als Modellsystem für Analysen zu *HUWE1*. Weitere Schritte wären nun Fischlinien mit humanen Mutationen zu erstellen, deren Phänotyp zu analysieren und zu untersuchen, wie sich die p.R110Q/W Mutation von anderen Mutationen unterscheidet.

POR

Homozygote und *compound* heterozygote Mutationen in dem Gen *POR* sind assoziiert mit dem Antley-Bixler ähnlichen Syndrom (OMIM 201750). Der Phänotyp ist charakterisiert durch Kraniosynostose, weiteren Skelettfehlbildungen, Anomalien der Genitalien, sowie einer gestörten Steroidogenese (HUANG *et al.* 2005). Das Gen *POR* kodiert für die NADPH Cytochrom P450 Oxidoreduktase, die im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Dort ist *POR* unter anderem notwendig für die Aktivierung von CYP-Monooxygenasen (SUE MASTERS AND MAROHNIC 2006). Mutationen, die eine Funktionsänderung oder -verlust von *POR* bewirken, haben unter anderem Einfluss auf den Retinolsäuremetabolismus oder die Steroidogenese (SIMPSON *et al.* 1994; OTTO *et al.* 2003). Der homozygote Verlust von *Por* ist in Mäusen letal (SHEN *et al.* 2002; OTTO *et al.* 2003). Der konditionelle Knockout von *Por* in Osteoblasten Vorläufern hingegen führt zu kraniofazialen Fehlbildungen und einem reduzierten Wachstum der langen Röhrenknochen (PANDA *et al.* 2013).

Bei Patient CRA_6 wurde eine homozygote *POR* Variante (c.902G>A, p.R301H) identifiziert und aufgrund der Vorhersageprogramme als potentiell pathogen eingestuft (siehe Abb. 3.12). Die klinischen Auffälligkeiten zeigen Überlappungen mit dem Antley-Bixler Syndrom. Jedoch liegen bei Patient CRA_6 weder genitale Auffälligkeiten noch Änderungen in der Steroidogenese vor. Eine molekulargenetische Analyse in einem anderen Diagnostiklabor zeigte, dass die Eltern heterozygot für diese Variante sind. Daraufhin wurde die gDNA eines gesunden Bruders sequenziert und festgestellt, dass dieser die Variante ebenfalls homozygot trägt. Dadurch ist es unwahrscheinlich, dass die Variante ursächlich für den Phänotyp des Patienten CRA_6 ist. Durch ein anderes Diagnostiklabor wurde eine Exom Sequenzierung (*SureSelect Human All Exon V6*, Agilent) durchgeführt, deren Auswertung, nach unserem Kenntnisstand, jedoch keine anderen, klinisch relevanten Varianten ergab. Ebenso wurden zuvor größere chromosomale Aberrationen ausgeschlossen. Aufgrund des schweren und komplexen Phänotyps ist jedoch eine genetische Ursache wahrscheinlich, sodass man in Erwägung ziehen könnte bei diesem Patienten eine Genomsequenzierung durchzuführen. Eventuell sind auch Veränderungen in zwei unterschiedlichen Genen für den Phänotyp verantwortlich.

4.2 Fazit & Ausblick

Für 30% der Patienten der Kraniosynostose Kohorte konnte im Rahmen dieser Arbeit eine genetische Ursache identifiziert werden. Davon waren 23% chromosomale Veränderungen. Dies zeigt, dass eine CNV Analyse bei Kraniosynostose Patienten, vor allem bei syndromalen Fällen, erfolgen sollte. Neben größeren Aberrationen konnte auch eine intragenische, pathogene CNV in *TCF12* nachgewiesen werden. Diese konnte auch in den NGS Daten durch einen Vergleich der Anzahl der Reads gezeigt werden. Zum Nachweis größerer CNVs ist jedoch nach wie vor die Array-CGH die Analyse Methode der Wahl. 77% der genetischen Ursachen wurden durch das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Kraniosynostose Panel identifiziert. Das Genpanel stellt somit ein effizientes Tool in der Diagnostik von Kraniosynostose Patienten dar. Die Anzahl an Kraniosynostose assoziierten Genen steigt jedoch mit der allgemeinen Zunahme an NGS Exom Analysen beständig. Beispiele hierfür sind die Gene *HUWE1*, *ZIC1* und *CDC45* (TAYLOR *et al.* 2015; FENWICK *et al.* 2016; ARUGA AND MILLEN 2018). Mutationen in diesen Genen sind zwar selten, dennoch wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine mögliche pathogene *HUWE1* Variante detektiert. Dies macht eine ständige Aktualisierung des Genpanels erforderlich. Da die Kosten für eine Exom Sequenzierung in den letzten Jahren deutlich gesunken sind, wäre eine Exom Sequenzierung nun die Alternative zu dem Genpanel. Für die Auswertung dieser Daten würde für den diagnostischen Ansatz ein *in silico* Panel mit den zum Zeitpunkt der Analyse bekannten Genen angewendet werden. Gleichzeitig stünden für etwaige Forschungsprojekte jedoch auch die gesamten Exom Daten zur Verfügung. Zusätzlich würde die Anwendung der Exom

Sequenzierung innerhalb der Diagnostik eine Zeitersparnis von Probeneingang bis Befundung bedeuten. Ein Sammeln der Proben für einen vollständigen Lauf (12 Proben) würde entfallen. Die Anreicherung kann parallel mit der Anreicherung von Patientenproben anderer Erkrankungen erfolgen.

Eine 30%ige Detektionsrate insgesamt bedeutet allerdings gleichzeitig auch, dass bei 70% der Patienten über den gewählten Ansatz keine genetische Ursache identifiziert werden konnte. Für eine weitere Analyse dieser Patienten wäre die Exom Sequenzierung eine Möglichkeit. Hilfreich bei der Auswertung der Sequenzierdaten wäre hierbei eine interne Datenbank von Exom Daten, die es ermöglicht häufige Sequenzierfehler der Sequenziermaschine sowie häufig auftretende SNPs innerhalb der Patienten Kohorte herauszufiltern. Bei der Auswertung von Einzelfällen kann es relativ schwierig werden Varianten bei einer sowohl genetisch als auch klinisch so heterogenen Erkrankung wie Kraniosynostose zuverlässig zu bewerten. Ein Beispiel hierfür sind *HUWE1* Mutationen, die bisher hauptsächlich mit isolierter Intelligenzminderung assoziiert sind. Substitutionen der Aminosäure p.R110 scheinen jedoch ursächlich für einen spezifischen, kombinierten Phänotyp aus Kraniosynostose und Intelligenzminderung zu sein (TAYLOR *et al.* 2015; MILLER *et al.* 2017; MOORTGAT *et al.* 2018). Hier sind weitere Patienten hilfreich, um die Kausalität einer Variante zu bestärken. Internationales *Data Sharing* und ein Abgleich mit diesen Daten könnte die Suche nach weiteren Patienten und die Bewertung von Varianten erleichtern. Ein nützliches Online-Tool hierfür ist GeneMatcher. Die Plattform vermittelt den Kontakt zwischen Forschergruppen oder Ärzten, die ein Interesse an dem gleichen Kandidaten-Gen haben (SOBREIRA *et al.* 2015). Eine weitere Herausforderung bei der Analyse der bisher ungelösten Fälle ist die Möglichkeit einer digenischen Vererbung oder von sogenannten *Modifier* Effekten. Ein Beispiel hierfür ist der mögliche Zusammenhang von *SMAD6* Mutationen mit einem Risiko-SNP in der Nähe von *BMP2* bei isolierten Frontal- und Sagittalnahtsynostosen (TIMBERLAKE *et al.* 2016). Dies macht eine Auswertung komplex und erschwert die Bewertung von Varianten, da SNPs in der Auswertung in der Regel aufgrund der Frequenz in der Normalbevölkerung herausgefiltert werden. Diese komplexen Vererbungsmuster erfordern Studien mit größeren Kohorten z.B. über internationale Netzwerke.

Für manche Varianten, insbesondere solche die in Genen lokalisiert sind, die bisher noch nicht mit Kraniosynostose assoziiert wurden, sind funktionelle Analysen notwendig, um ihre Pathogenität zu bekräftigen. Hierbei können Analysen der Patienten mRNA hilfreich sein, um eventuelle Auswirkungen auf die Genexpression von potentiellen *loss-/gain-of-function* Varianten oder auf das Spleißen zu untersuchen. Sofern OP Material von Patienten Calvarien zur Verfügung steht, könnte damit, neben der Gewinnung von mRNA, eine Zellkultur für weiterführende Analysen angelegt werden. Besteht keine Möglichkeit entsprechendes Patientenmaterial zu erhalten, so eignet sich, wie in dieser Arbeit gezeigt, für die Analyse von Spleißvarianten z.B. ein *in vitro* Spleißsystem. Des Weiteren lassen sich durch die CRISPR/Cas

Methode sowohl Zellen als auch Tiermodelle, wie beispielsweise *Danio rerio*, genetisch so verändern, dass auch Einzelnukleotidveränderungen der Patienten eingebracht werden können (Knock-in). Anschließend wären damit funktionelle Studien wie Protein- und Phänotypenanalysen möglich.

Abschließend bleibt noch die Frage zu klären, warum es bei einer Erkrankung wie Kraniosynostose, deren momentane einzige therapeutische Möglichkeit ein chirurgischer Eingriff ist, wichtig ist die genetische Ursache und die zugrundeliegende Pathogenese zu identifizieren. Zum einen kann es für die Familienplanung der Eltern oder des Patienten selbst relevant sein das jeweilige Vererbungsrisiko zu kennen. Zum anderen kann die genetische Diagnose Einfluss auf die medizinische Betreuung haben sowie den Familien eine Auskunft zu Langzeitprognosen ermöglichen. In einigen Fällen kann ein zweiter chirurgischer Eingriff notwendig werden, da die betroffenen Suturen trotz Operation wieder vorzeitig fusionieren können. Retrospektive Studien zeigen, dass dieses Risiko beispielsweise für Patienten mit einer nachgewiesenen *FGFR3* p.P250R Mutation erhöht ist im Vergleich zu Patienten ohne geklärte genetische Ursache (THOMAS *et al.* 2005; WILKIE *et al.* 2010). Die Aufklärung der Pathogenese von Kraniosynostosen kann dazu beitragen neue Therapieformen zu entwickeln, um den invasiven Eingriff so gering wie möglich zu halten. Erste Studien dazu gibt es bereits. Ratten, denen humane, *FGFR2* mutierte Osteoblasten in die Dura mater unterhalb der Koronarnähte transplantiert wurden, entwickelten Kraniosynostosen. Die betroffenen Suturen zeigten eine Reduktion des BMP Inhibitors Noggin. Die gleichzeitige lokale Platzierung von Beads mit Noggin verhinderte jedoch eine Fusion der Schädelnähte (SHEN *et al.* 2009). Cooper *et al.* führten ähnliche Studien in Mäusen durch und konnten zeigen, dass an den mit Noggin behandelten Suturen die Ossifikation inhibiert wurde (COOPER *et al.* 2009). Die lokale Implantation von Inhibitorbeads könnte also unterstützend zur Operation eingesetzt werden, um das Risiko einer erneuten vorzeitigen Fusion und somit einer weiteren Operation zu minimieren. Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von MEK1/ERK1 Kinaseinhibitoren bei gesteigerter FGF Signaltransduktion, wie es beispielsweise bei Crouzon oder Apert Syndrom Patienten der Fall ist. Shukla *et al.* injizierten intraperitoneal einen Kinaseinhibitor in trächtige Mäuse, deren Nachwuchs die *Fgfr2* Mutation S252W, ursächlich für das Apert Syndrom, aufweist. Zusätzlich wurde die Inhibitor Injektion bis zu 18 Tage postnatal fortgesetzt. Die Ausbildung des „Apert-Phänotyps“ konnte dadurch zum Teil verhindert werden (SHUKLA *et al.* 2007). Dieser Ansatz birgt jedoch einige Probleme, so ist sowohl der Zeitpunkt der Verabreichung als auch die Dosis kritisch. Mit der Identifikation neuer genetischer Ursachen könnten auch neue mögliche Ziele für eine alternative oder unterstützende Therapie identifiziert werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Aruga, J., and K. J. Millen, 2018 ZIC1 Function in Normal Cerebellar Development and Human Developmental Pathology. *Adv Exp Med Biol* 1046: 249-268.
- Avansino, J. R., T. R. Dennis, P. Spallone, A. D. Stock and M. L. Levin, 1999 Proximal 5p trisomy resulting from a marker chromosome implicates band 5p13 in 5p trisomy syndrome. *Am J Med Genet* 87: 6-11.
- Aviv, R. I., E. Rodger and C. M. Hall, 2002 Craniosynostosis. *Clin Radiol* 57: 93-102.
- Bafico, A., G. Liu, A. Yaniv, A. Gazit and S. A. Aaronson, 2001 Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3: 683-686.
- Barndt, R. J., M. Dai and Y. Zhuang, 2000 Functions of E2A-HEB heterodimers in T-cell development revealed by a dominant negative mutation of HEB. *Mol Cell Biol* 20: 6677-6685.
- Baroni, T., P. Carinci, C. Lilli, C. Bellucci, M. C. Aisa *et al.*, 2005 P253R fibroblast growth factor receptor-2 mutation induces RUNX2 transcript variants and calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 202: 524-535.
- Bennett, C. N., K. A. Longo, W. S. Wright, L. J. Suva, T. F. Lane *et al.*, 2005 Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3324-3329.
- Bennett, C. N., H. Ouyang, Y. L. Ma, Q. Zeng, I. Gerin *et al.*, 2007 Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 22: 1924-1932.
- Bernardini, L., M. Castori, A. Capalbo, V. Mokini, R. Mingarelli *et al.*, 2007 Syndromic craniosynostosis due to complex chromosome 5 rearrangement and MSX2 gene triplication. *Am J Med Genet A* 143a: 2937-2943.
- Bialek, P., B. Kern, X. Yang, M. Schrock, D. Sosic *et al.*, 2004 A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 6: 423-435.
- Bilezikian, J. P., L. G. Raisz and G. A. Rodan, 2002 *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, California.
- Bitgood, M. J., and A. P. McMahon, 1995 Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 172: 126-138.
- Bonewald, L. F., 2011 The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26: 229-238.
- Bose, R., K. Sheng, A. R. Moawad, G. Manku, C. O'Flaherty *et al.*, 2017 Ubiquitin Ligase Huwe1 Modulates Spermatogenesis by Regulating Spermatogonial Differentiation and Entry into Meiosis. *Sci Rep* 7: 17759.
- Boulet, S. L., S. A. Rasmussen and M. A. Honein, 2008 A population-based study of craniosynostosis in metropolitan Atlanta, 1989-2003. *Am J Med Genet A* 146a: 984-991.
- Brunet, L. J., J. A. McMahon, A. P. McMahon and R. M. Harland, 1998 Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280: 1455-1457.
- Burnside, R. D., J. G. Pappas, S. Sacharow, C. Applegate, A. Hamosh *et al.*, 2013 Three cases of isolated terminal deletion of chromosome 8p without heart defects presenting with a mild phenotype. *Am J Med Genet A* 161a: 822-828.
- Camerota, L., M. Pitzianti, D. Postorivo, A. M. Nardone, C. Ligas *et al.*, 2017 A Small Supernumerary Marker Derived from the Pericentromeric Region of Chromosome 5: Case Report and Delineation of Partial Trisomy 5p Phenotype. *Cytogenet Genome Res* 153: 22-28.
- Camps, M., A. Nichols and S. Arkininstall, 2000 Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb j* 14: 6-16.
- Capulli, M., R. Paone and N. Rucci, 2014 Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 561: 3-12.
- Carlton, M. B., W. H. Colledge and M. J. Evans, 1998 Crouzon-like craniofacial dysmorphology in the mouse is caused by an insertional mutation at the Fgf3/Fgf4 locus. *Dev Dyn* 212: 242-249.

- Case, N., M. Ma, B. Sen, Z. Xie, T. S. Gross *et al.*, 2008 Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts. *J Biol Chem* 283: 29196-29205.
- Cawthorn, W. P., A. J. Bree, Y. Yao, B. Du, N. Hemati *et al.*, 2012 Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a beta-catenin-dependent mechanism. *Bone* 50: 477-489.
- Celil, A. B., and P. G. Campbell, 2005 BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem* 280: 31353-31359.
- Chaudhry, A., P. Sabatini, L. Han, P. N. Ray, C. Forrest *et al.*, 2015 Heterozygous mutations in ERF cause syndromic craniosynostosis with multiple suture involvement. *Am J Med Genet A* 167a: 2544-2547.
- Chen, C. P., S. P. Lin, C. C. Lin, Y. J. Chen, S. R. Chern *et al.*, 2006 Molecular cytogenetic analysis of de novo dup(5)(q35.2q35.3) and review of the literature of pure partial trisomy 5q. *Am J Med Genet A* 140: 1594-1600.
- Chen, D., N. Kon, M. Li, W. Zhang, J. Qin *et al.*, 2005 ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121: 1071-1083.
- Chen, F., C. Degen, M. Laederich, W. A. Horton and K. Hristova, 2011 The A391E mutation enhances FGFR3 activation in the absence of ligand. *Biochim Biophys Acta* 1808: 2045-2050.
- Chen, L., D. Li, C. Li, A. Engel and C. X. Deng, 2003 A Ser252Trp [corrected] substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis. *Bone* 33: 169-178.
- Chien, W. H., S. S. Gau, Y. Y. Wu, Y. S. Huang, J. S. Fang *et al.*, 2010 Identification and molecular characterization of two novel chromosomal deletions associated with autism. *Clin Genet* 78: 449-456.
- Choe, K. N., C. M. Nicolae, D. Constantin, Y. Imamura Kawasawa, M. R. Delgado-Diaz *et al.*, 2016 HUWE1 interacts with PCNA to alleviate replication stress. *EMBO Rep* 17: 874-886.
- Ciurea, A. V., and C. Toader, 2009 Genetics of craniosynostosis: review of the literature. *J Med Life* 2: 5-17.
- Cohen, M. M., Jr., 1993 Sutural biology and the correlates of craniosynostosis. *Am J Med Genet* 47: 581-616.
- Connerney, J., V. Andreeva, Y. Leshem, M. A. Mercado, K. Dowell *et al.*, 2008 Twist1 homodimers enhance FGF responsiveness of the cranial sutures and promote suture closure. *Dev Biol* 318: 323-334.
- Connerney, J., V. Andreeva, Y. Leshem, C. Muentener, M. A. Mercado *et al.*, 2006 Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev Dyn* 235: 1345-1357.
- Cooper, G. M., A. Usas, A. Olshanski, M. P. Mooney, J. E. Losee *et al.*, 2009 Ex vivo Noggin gene therapy inhibits bone formation in a mouse model of postoperative resynostosis. *Plast Reconstr Surg* 123: 94s-103s.
- Courtens, W., S. Vermeulen, W. Wuyts, L. Messiaen, J. Wauters *et al.*, 2005 An interstitial deletion of chromosome 7 at band q21: a case report and review. *Am J Med Genet A* 134a: 12-23.
- D'Arca, D., X. Zhao, W. Xu, N. C. Ramirez-Martinez, A. Iavarone *et al.*, 2010 Huwe1 ubiquitin ligase is essential to synchronize neuronal and glial differentiation in the developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5875-5880.
- Dathe, K., K. W. Kjaer, A. Brehm, P. Meinecke, P. Nurnberg *et al.*, 2009 Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2. *Am J Hum Genet* 84: 483-492.
- Day, T. F., X. Guo, L. Garrett-Beal and Y. Yang, 2005 Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8: 739-750.
- Day, T. F., and Y. Yang, 2008 Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1: 19-24.
- de Groot, R. E., R. S. Ganji, O. Bernatik, B. Lloyd-Lewis, K. Seipel *et al.*, 2014 Huwe1-mediated ubiquitylation of dishevelled defines a negative feedback loop in the Wnt signaling pathway. *Sci Signal* 7: ra26.

- de Melker, A. A., N. Desban and J. L. Duband, 2004 Cellular localization and signaling activity of beta-catenin in migrating neural crest cells. *Dev Dyn* 230: 708-726.
- Del Piccolo, N., S. Sarabipour and K. Hristova, 2017 A New Method to Study Heterodimerization of Membrane Proteins and Its Application to Fibroblast Growth Factor Receptors. *J Biol Chem* 292: 1288-1301.
- Delezoide, A. L., C. Benoist-Lasselien, L. Legeai-Mallet, M. Le Merrer, A. Munnich *et al.*, 1998 Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mech Dev* 77: 19-30.
- Desviat, L. R., B. Perez and M. Ugarte, 2012 Minigenes to confirm exon skipping mutations. *Methods Mol Biol* 867: 37-47.
- Devlin, R. D., Z. Du, R. C. Pereira, R. B. Kimble, A. N. Economides *et al.*, 2003 Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology* 144: 1972-1978.
- di Rocco, F., G. Baujat, E. Arnaud, D. Renier, J. L. Laplanche *et al.*, 2014 Clinical spectrum and outcomes in families with coronal synostosis and TCF12 mutations. *Eur J Hum Genet* 22: 1413-1416.
- Dodig, M., M. S. Kronenberg, A. Bedalov, B. E. Kream, G. Gronowicz *et al.*, 1996 Identification of a TAAT-containing motif required for high level expression of the COL1A1 promoter in differentiated osteoblasts of transgenic mice. *J Biol Chem* 271: 16422-16429.
- Dominguez-Brauer, C., R. Khatun, A. J. Elia, K. L. Thu, P. Ramachandran *et al.*, 2017 E3 ubiquitin ligase Mule targets beta-catenin under conditions of hyperactive Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E1148-e1157.
- Doss, C. G. P., B. Rajith and C. Chakraborty, 2013 Predicting the impact of deleterious mutations in the protein kinase domain of FGFR2 in the context of function, structure, and pathogenesis--a bioinformatics approach. *Appl Biochem Biotechnol* 170: 1853-1870.
- Dupin, E., and J. M. Coelho-Aguiar, 2013 Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. *Cytometry A* 83: 38-47.
- el Ghouzzi, V., M. Le Merrer, F. Perrin-Schmitt, E. Lajeunie, P. Benit *et al.*, 1997 Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15: 42-46.
- Elbracht, M., A. Roos, N. Schonherr, S. Busse, R. Damen *et al.*, 2009 Pure distal trisomy 2q: a rare chromosomal abnormality with recognizable phenotype. *Am J Med Genet A* 149a: 2547-2550.
- Elias-Jones, A. C., P. Habibi, V. F. Larcher, T. Spencer and L. J. Butler, 1988 The trisomy (5)(q31-qter) syndrome: study of a family with a t(5:14) translocation. *Arch Dis Child* 63: 427-431.
- Engelhard, C., S. Sarsfield, J. Merte, Q. Wang, P. Li *et al.*, 2013 MEGF8 is a modifier of BMP signaling in trigeminal sensory neurons. *Elife* 2: e01160.
- Estrada, K. D., K. N. Retting, A. M. Chin and K. M. Lyons, 2011 Smad6 is essential to limit BMP signaling during cartilage development. *J Bone Miner Res* 26: 2498-2510.
- Eswarakumar, V. P., M. C. Horowitz, R. Locklin, G. M. Morriss-Kay and P. Lonai, 2004 A gain-of-function mutation of *Fgfr2c* demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12555-12560.
- Eswarakumar, V. P., I. Lax and J. Schlessinger, 2005 Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 139-149.
- Falk, R. E., and K. A. Casas, 2007 Chromosome 2q37 deletion: clinical and molecular aspects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145c: 357-371.
- Feng, W., I. Choi, D. E. Clouthier, L. Niswander and T. Williams, 2013 The *Ptch1(DL)* mouse: a new model to study lambdoid craniosynostosis and basal cell nevus syndrome-associated skeletal defects. *Genesis* 51: 677-689.
- Fenwick, A. L., M. Kliszczak, F. Cooper, J. Murray, L. Sanchez-Pulido *et al.*, 2016 Mutations in CDC45, Encoding an Essential Component of the Pre-initiation Complex, Cause Meier-Gorlin Syndrome and Craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 99: 125-138.
- Florisson, J. M., A. J. Verkerk, D. Huigh, A. J. Hoogeboom, S. Swagemakers *et al.*, 2013 Boston type craniosynostosis: report of a second mutation in MSX2. *Am J Med Genet A* 161a: 2626-2633.

- Flottmann, R., B. K. Kragestein, S. Geuer, M. Socha, L. Allou *et al.*, 2018 Noncoding copy-number variations are associated with congenital limb malformation. *Genet Med* 20: 599-607.
- Fok, K. L., R. Bose, K. Sheng, C. W. Chang, M. Katz-Egorov *et al.*, 2017 *Huwe1* Regulates the Establishment and Maintenance of Spermatogonia by Suppressing DNA Damage Response. *Endocrinology* 158: 4000-4016.
- Forrest, C. R., and R. A. Hopper, 2013 Craniofacial syndromes and surgery. *Plast Reconstr Surg* 131: 86e-109e.
- Franceschi, R. T., and G. Xiao, 2003 Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, *Runx2*: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* 88: 446-454.
- Franz-Odenaal, T. A., B. K. Hall and P. E. Witten, 2006 Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235: 176-190.
- Froyen, G., M. Corbett, J. Vandewalle, I. Jarvela, O. Lawrence *et al.*, 2008 Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase *HSD17B10* and the E3 ubiquitin ligase *HUWE1* are associated with mental retardation. *Am J Hum Genet* 82: 432-443.
- Fujii, K., and T. Miyashita, 2014 Gorlin syndrome (nevoid basal cell carcinoma syndrome): update and literature review. *Pediatr Int* 56: 667-674.
- Fukushima, Y., K. Wakui, T. Nishida and H. Nishimoto, 1990 Craniosynostosis in an infant with an interstitial deletion of 15q [46,XY,del(15)(q15q22.1)]. *Am J Med Genet* 36: 209-213.
- Garcia-Minaur, S., L. A. Mavrogiannis, S. V. Rannan-Eliya, M. A. Hendry, W. A. Liston *et al.*, 2003 Parietal foramina with cleidocranial dysplasia is caused by mutation in *MSX2*. *Eur J Hum Genet* 11: 892-895.
- Gazzerro, E., V. Gangji and E. Canalis, 1998 Bone morphogenetic proteins induce the expression of *noggin*, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 102: 2106-2114.
- Ge, C., Q. Yang, G. Zhao, H. Yu, K. L. Kirkwood *et al.*, 2012 Interactions between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAP kinase pathways in the control of *RUNX2* phosphorylation and transcriptional activity. *J Bone Miner Res* 27: 538-551.
- Golding, J. P., P. Trainor, R. Krumlauf and M. Gassmann, 2000 Defects in pathfinding by cranial neural crest cells in mice lacking the neuregulin receptor *ErbB4*. *Nat Cell Biol* 2: 103-109.
- Goldring, M. B., K. Tsuchimochi and K. Ijiri, 2006 The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97: 33-44.
- Gong, X., H. Qian, P. Cao, X. Zhao, Q. Zhou *et al.*, 2018 Structural basis for the recognition of Sonic Hedgehog by human *Patched1*. *Science*.
- Goodrich, L. V., L. Milenkovic, K. M. Higgins and M. P. Scott, 1997 Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse *patched* mutants. *Science* 277: 1109-1113.
- Goos, J. A., A. L. Fenwick, S. M. Swagemakers, S. J. McGowan, S. J. Knight *et al.*, 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: 732-736.
- Gripp, K. W., E. H. Zackai and C. A. Stolle, 2000 Mutations in the human *TWIST* gene. *Hum Mutat* 15: 150-155.
- Gu, K., L. Zhang, T. Jin and R. B. Rutherford, 2004 Identification of potential modifiers of *Runx2/Cbfa1* activity in C2C12 cells in response to bone morphogenetic protein-7. *Cells Tissues Organs* 176: 28-40.
- Guo, X., T. F. Day, X. Jiang, L. Garrett-Beal, L. Topol *et al.*, 2004 Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev* 18: 2404-2417.
- Hahn, H., L. Wojnowski, A. M. Zimmer, J. Hall, G. Miller *et al.*, 1998 Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med* 4: 619-622.
- Hajhosseini, M. K., R. Duarte, J. Pegrum, A. Donjacour, E. Lana-Elola *et al.*, 2009 Evidence that *Fgf10* contributes to the skeletal and visceral defects of an Apert syndrome mouse model. *Dev Dyn* 238: 376-385.
- Hajhosseini, M. K., and J. K. Heath, 2002 Expression patterns of fibroblast growth factors-18 and -20 in mouse embryos is suggestive of novel roles in calvarial and limb development. *Mech Dev* 113: 79-83.

- Hajihosseini, M. K., S. Wilson, L. De Moerlooze and C. Dickson, 2001 A splicing switch and gain-of-function mutation in Fgfr2-IIIc hemizygotes causes Apert/Pfeiffer-syndrome-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3855-3860.
- Hall, B. K., and T. Miyake, 1995 Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol* 39: 881-893.
- Hamidouche, Z., O. Fromigue, U. Nuber, P. Vaudin, J. C. Pages *et al.*, 2010 Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 224: 509-515.
- Hanafusa, H., S. Torii, T. Yasunaga and E. Nishida, 2002 Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4: 850-858.
- Hata, A., G. Lagna, J. Massague and A. Hemmati-Brivanlou, 1998 Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12: 186-197.
- Hill, R. E., P. F. Jones, A. R. Rees, C. M. Sime, M. J. Justice *et al.*, 1989 A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. *Genes Dev* 3: 26-37.
- Hill, T. P., D. Spater, M. M. Taketo, W. Birchmeier and C. Hartmann, 2005 Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8: 727-738.
- Hiraki, Y., M. Moriuchi, N. Okamoto, N. Ishikawa, Y. Sugimoto *et al.*, 2008 Craniosynostosis in a patient with a de novo 15q15-q22 deletion. *Am J Med Genet A* 146a: 1462-1465.
- Hoffmann, H. M., T. L. Beumer, S. Rahman, L. R. McCabe, C. Banerjee *et al.*, 1996 Bone tissue-specific transcription of the osteocalcin gene: role of an activator osteoblast-specific complex and suppressor hox proteins that bind the OC box. *J Cell Biochem* 61: 310-324.
- Hollenhorst, P. C., L. P. McIntosh and B. J. Graves, 2011 Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annu Rev Biochem* 80: 437-471.
- Hollox, E. J., J. C. Barber, A. J. Brookes and J. A. Armour, 2008 Defensins and the dynamic genome: what we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1. *Genome Res* 18: 1686-1697.
- Hovde, S., C. Abate-Shen and J. H. Geiger, 2001 Crystal structure of the Msx-1 homeodomain/DNA complex. *Biochemistry* 40: 12013-12021.
- Howard, T. D., W. A. Paznekas, E. D. Green, L. C. Chiang, N. Ma *et al.*, 1997 Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15: 36-41.
- Hsieh, J. C., L. Kodjabachian, M. L. Rebbert, A. Rattner, P. M. Smallwood *et al.*, 1999 A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398: 431-436.
- Hu, H., M. J. Hilton, X. Tu, K. Yu, D. M. Ornitz *et al.*, 2005 Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132: 49-60.
- Hu, J. S., E. N. Olson and R. E. Kingston, 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: 1031-1042.
- Huang, N., A. V. Pandey, V. Agrawal, W. Reardon, P. D. Lapunzina *et al.*, 2005 Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet* 76: 729-749.
- Hunter, A. G., B. Dupont, M. McLaughlin, L. Hinton, E. Baker *et al.*, 2005 The Hunter-McAlpine syndrome results from duplication 5q35-qter. *Clin Genet* 67: 53-60.
- Ichida, F., R. Nishimura, K. Hata, T. Matsubara, F. Ikeda *et al.*, 2004 Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279: 34015-34022.
- Iseki, S., A. O. Wilkie, J. K. Heath, T. Ishimaru, K. Eto *et al.*, 1997 Fgfr2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2. *Development* 124: 3375-3384.
- Iseki, S., A. O. Wilkie and G. M. Morriss-Kay, 1999 Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development* 126: 5611-5620.

- Ishii, M., A. E. Merrill, Y. S. Chan, I. Gitelman, D. P. Rice *et al.*, 2003 Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development* 130: 6131-6142.
- Itoh, N., H. Ohta, Y. Nakayama and M. Konishi, 2016 Roles of FGF Signals in Heart Development, Health, and Disease. *Front Cell Dev Biol* 4: 110.
- Izzo, A., R. Genesio, V. Ronga, V. Nocera, L. Marullo *et al.*, 2012 40 Mb duplication in chromosome band 5p13.1p15.33 with 800 kb terminal deletion in a foetus with mild phenotypic features. *Eur J Med Genet* 55: 140-144.
- Jabs, E. W., U. Muller, X. Li, L. Ma, W. Luo *et al.*, 1993 A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75: 443-450.
- Jacob, A. L., C. Smith, J. Partanen and D. M. Ornitz, 2006 Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Dev Biol* 296: 315-328.
- Jacob, S., C. Wu, T. A. Freeman, E. Koyama and R. E. Kirschner, 2007 Expression of Indian Hedgehog, BMP-4 and Noggin in craniosynostosis induced by fetal constraint. *Ann Plast Surg* 58: 215-221.
- Janssen, A., M. J. Hosen, P. Jeannin, P. J. Coucke, A. De Paepe *et al.*, 2013 Second family with the Boston-type craniosynostosis syndrome: novel mutation and expansion of the clinical spectrum. *Am J Med Genet A* 161a: 2352-2357.
- Jenny, A., 2010 Planar cell polarity signaling in the Drosophila eye. *Curr Top Dev Biol* 93: 189-227.
- Jiang, X., S. Iseki, R. E. Maxson, H. M. Sucov and G. M. Morriss-Kay, 2002 Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev Biol* 241: 106-116.
- Joeng, K. S., C. A. Schumacher, C. R. Zylstra-Diegel, F. Long and B. O. Williams, 2011 Lrp5 and Lrp6 redundantly control skeletal development in the mouse embryo. *Dev Biol* 359: 222-229.
- Johnson, D., S. Iseki, A. O. Wilkie and G. M. Morriss-Kay, 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: 341-345.
- Johnson, D., and A. O. Wilkie, 2011 Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* 19: 369-376.
- Johnson, D. E., and L. T. Williams, 1993 Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60: 1-41.
- Johnson, R. L., A. L. Rothman, J. Xie, L. V. Goodrich, J. W. Bare *et al.*, 1996 Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272: 1668-1671.
- Justice, C. M., G. Yagnik, Y. Kim, I. Peter, E. W. Jabs *et al.*, 2012 A genome-wide association study identifies susceptibility loci for nonsyndromic sagittal craniosynostosis near BMP2 and within BBS9. *Nat Genet* 44: 1360-1364.
- Kague, E., M. Gallagher, S. Burke, M. Parsons, T. Franz-Odenaal *et al.*, 2012 Skeletogenic fate of zebrafish cranial and trunk neural crest. *PLoS One* 7: e47394.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J. W. Gray *et al.*, 1992 Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821.
- Kariminejad, A., R. Kariminejad, A. Tzschach, R. Ullmann, A. Ahmed *et al.*, 2009 Craniosynostosis in a patient with 2q37.3 deletion 5q34 duplication: association of extra copy of MSX2 with craniosynostosis. *Am J Med Genet A* 149a: 1544-1549.
- Kim, H. J., D. P. Rice, P. J. Kettunen and I. Thesleff, 1998 FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development* 125: 1241-1251.
- Kim, K. B., J. S. Ha, S. J. Shin, C. S. Kim and J. G. Bae, 2014 Prenatal diagnosis of a 7q21.13q22.1 deletion detected using high-resolution microarray. *Obstet Gynecol Sci* 57: 318-324.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling, 1995 Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203: 253-310.
- Kimonis, V., J. A. Gold, T. L. Hoffman, J. Panchal and S. A. Boyadjiev, 2007 Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol* 14: 150-161.

- Klopocki, E., S. Lohan, F. Brancati, R. Koll, A. Brehm *et al.*, 2011 Copy-number variations involving the IHH locus are associated with syndactyly and craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 88: 70-75.
- Kobayashi, H., Y. Gao, C. Ueta, A. Yamaguchi and T. Komori, 2000 Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 630-636.
- Koga, T., Y. Matsui, M. Asagiri, T. Kodama, B. de Crombrughe *et al.*, 2005 NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 11: 880-885.
- Kohn, A. D., and R. T. Moon, 2005 Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38: 439-446.
- Komori, T., 2005 Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem* 95: 445-453.
- Komori, T., 2006 Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99: 1233-1239.
- Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki *et al.*, 1997 Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764.
- König, E., L. Engmann, W. Kress, A. Quattländer, T. Schweitzer *et al.*, 2015 Craniosynostosis associated with Partial Monosomy 2q37.3 and Partial Trisomy 5q35 including MSX2. *J Rare Dis Diagn Ther* 1:2.
- Kubota, Y., and K. Ito, 2000 Chemotactic migration of mesencephalic neural crest cells in the mouse. *Dev Dyn* 217: 170-179.
- Kumar, D., P. R. Heath and C. E. Blank, 1987 Clinical manifestations of trisomy 5q. *J Med Genet* 24: 180-184.
- Lajeunie, E., M. Le Merrer, C. Bonaiti-Pellie, D. Marchac and D. Renier, 1995 Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am J Med Genet* 55: 500-504.
- Lapointe, E., A. Boyer, C. Rico, M. Paquet, H. L. Franco *et al.*, 2012 FZD1 regulates cumulus expansion genes and is required for normal female fertility in mice. *Biol Reprod* 87: 104.
- Le Gallic, L., D. Sgouras, G. Beal, Jr. and G. Mavrothalassitis, 1999 Transcriptional repressor ERF is a Ras/mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation. *Mol Cell Biol* 19: 4121-4133.
- Le Gallic, L., L. Virgilio, P. Cohen, B. Biteau and G. Mavrothalassitis, 2004 ERF nuclear shuttling, a continuous monitor of Erk activity that links it to cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 24: 1206-1218.
- Le Tanno, P., B. Poreau, F. Devillard, G. Vieville, F. Amblard *et al.*, 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: 1530-1536.
- Lee, B., K. Thirunavukkarasu, L. Zhou, L. Pastore, A. Baldini *et al.*, 1997 Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet* 16: 307-310.
- Lee, C. C., W. S. Chen, C. C. Chen, L. L. Chen, Y. S. Lin *et al.*, 2012 TCF12 protein functions as transcriptional repressor of E-cadherin, and its overexpression is correlated with metastasis of colorectal cancer. *J Biol Chem* 287: 2798-2809.
- Lee, E., T. Le, Y. Zhu, G. Elakis, A. Turner *et al.*, 2017 A craniosynostosis massively parallel sequencing panel study in 309 Australian and New Zealand patients: findings and recommendations. *Genet Med*.
- Lee, K. S., S. H. Hong and S. C. Bae, 2002 Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene* 21: 7156-7163.
- Lee, M. H., T. G. Kwon, H. S. Park, J. M. Wozney and H. M. Ryoo, 2003 BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 689-694.
- Lenton, K., A. W. James, A. Manu, S. A. Brugmann, D. Birker *et al.*, 2011 Indian hedgehog positively regulates calvarial ossification and modulates bone morphogenetic protein signaling. *Genesis* 49: 784-796.

- Levine, J. P., J. P. Bradley, D. A. Roth, J. G. McCarthy and M. T. Longaker, 1998 Studies in cranial suture biology: regional dura mater determines overlying suture biology. *Plast Reconstr Surg* 101: 1441-1447.
- Leyns, L., T. Bouwmeester, S. H. Kim, S. Piccolo and E. M. De Robertis, 1997 Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88: 747-756.
- Li, C., D. A. Scott, E. Hatch, X. Tian and S. L. Mansour, 2007 Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development* 134: 167-176.
- Li, E., M. You and K. Hristova, 2006 FGFR3 dimer stabilization due to a single amino acid pathogenic mutation. *J Mol Biol* 356: 600-612.
- Li, Y., K. Mangasarian, A. Mansukhani and C. Basilico, 1997 Activation of FGF receptors by mutations in the transmembrane domain. *Oncogene* 14: 1397-1406.
- Liu, Y. H., R. Kundu, L. Wu, W. Luo, M. A. Ignelzi, Jr. *et al.*, 1995 Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing *Msx2* transgenes in the developing skull. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6137-6141.
- Liu, Y. H., L. Ma, R. Kundu, M. Ignelzi, F. Sangiorgi *et al.*, 1996 Function of the *Msx2* gene in the morphogenesis of the skull. *Ann N Y Acad Sci* 785: 48-58.
- Liu, Y. H., Z. Tang, R. K. Kundu, L. Wu, W. Luo *et al.*, 1999 *Msx2* gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for *MSX2*-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol* 205: 260-274.
- Liu, Z., J. Xu, J. S. Colvin and D. M. Ornitz, 2002 Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev* 16: 859-869.
- Lloyd, D. L., M. Toegel, T. A. Fulga and A. O. M. Wilkie, 2018 The *Drosophila* homologue of *MEGF8* is essential for early development. *Sci Rep* 8: 8790.
- Logan, C. Y., and R. Nusse, 2004 The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Long, F., and D. M. Ornitz, 2013 Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a008334.
- Lopez-Rios, J., D. Speziale, D. Robay, M. Scotti, M. Osterwalder *et al.*, 2012 *GLI3* constrains digit number by controlling both progenitor proliferation and BMP-dependent exit to chondrogenesis. *Dev Cell* 22: 837-848.
- Luu, H. H., W. X. Song, X. Luo, D. Manning, J. Luo *et al.*, 2007 Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 25: 665-677.
- Ma, L., S. Golden, L. Wu and R. Maxson, 1996 The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148-->His mutation in the N-terminal arm of the *MSX2* homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Hum Mol Genet* 5: 1915-1920.
- Ma, R., Y. Peng, Y. Zhang, Y. Xia, G. Tang *et al.*, 2015 Partial trisomy 2q33.3-q37.3 in a patient with an inverted duplicated neocentric marker chromosome. *Mol Cytogenet* 8: 10.
- Mackenzie, A., G. L. Leeming, A. K. Jowett, M. W. Ferguson and P. T. Sharpe, 1991 The homeobox gene *Hox 7.1* has specific regional and temporal expression patterns during early murine craniofacial embryogenesis, especially tooth development in vivo and in vitro. *Development* 111: 269-285.
- Mandemaker, I. K., L. van Cuijk, R. C. Janssens, H. Lans, K. Bezstarosti *et al.*, 2017 DNA damage-induced histone H1 ubiquitylation is mediated by *HUWE1* and stimulates the *RNF8-RNF168* pathway. *Sci Rep* 7: 15353.
- Mao, B., W. Wu, G. Davidson, J. Marhold, M. Li *et al.*, 2002 Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417: 664-667.
- Mao, J. J., and H. D. Nah, 2004 Growth and development: hereditary and mechanical modulations. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 125: 676-689.
- Marigo, V., R. A. Davey, Y. Zuo, J. M. Cunningham and C. J. Tabin, 1996 Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384: 176-179.

- Massari, M. E., and C. Murre, 2000 Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20: 429-440.
- Mavrogiannis, L. A., I. B. Taylor, S. J. Davies, F. J. Ramos, J. L. Olivares *et al.*, 2006 Enlarged parietal foramina caused by mutations in the homeobox genes ALX4 and MSX2: from genotype to phenotype. *Eur J Hum Genet* 14: 151-158.
- Merrill, A. E., A. Sarukhanov, P. Krejci, B. Idoni, N. Camacho *et al.*, 2012 Bent bone dysplasia-FGFR2 type, a distinct skeletal disorder, has deficient canonical FGF signaling. *Am J Hum Genet* 90: 550-557.
- Miller, K. A., S. R. Twigg, S. J. McGowan, J. M. Phipps, A. L. Fenwick *et al.*, 2017 Diagnostic value of exome and whole genome sequencing in craniosynostosis. *J Med Genet* 54: 260-268.
- Montero, A., Y. Okada, M. Tomita, M. Ito, H. Tsurukami *et al.*, 2000 Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest* 105: 1085-1093.
- Moore, R., P. Ferretti, A. Copp and P. Thorogood, 2002 Blocking endogenous FGF-2 activity prevents cranial osteogenesis. *Dev Biol* 243: 99-114.
- Moortgat, S., S. Berland, I. Aukrust, I. Maystadt, L. Baker *et al.*, 2018 HUWE1 variants cause dominant X-linked intellectual disability: a clinical study of 21 patients. *Eur J Hum Genet* 26: 64-74.
- Muenke, M., W. Kress, H. Collmann and B. D. Solomon, 2011 *Craniosynostoses - Molecular Genetics, Principles of Diagnosis, and Treatment* S. Karger AG, Basel, Switzerland.
- Muller, U., M. L. Warman, J. B. Mulliken and J. L. Weber, 1993 Assignment of a gene locus involved in craniosynostosis to chromosome 5qter. *Hum Mol Genet* 2: 119-122.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn *et al.*, 1986 Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Mundlos, S., F. Otto, C. Mundlos, J. B. Mulliken, A. S. Aylsworth *et al.*, 1997 Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89: 773-779.
- Murakami, G., T. Watabe, K. Takaoka, K. Miyazono and T. Imamura, 2003 Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 14: 2809-2817.
- Myant, K. B., P. Cammareri, M. C. Hodder, J. Wills, A. Von Kriegsheim *et al.*, 2017 HUWE1 is a critical colonic tumour suppressor gene that prevents MYC signalling, DNA damage accumulation and tumour initiation. *EMBO Mol Med* 9: 181-197.
- Nakashima, K., X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng *et al.*, 2002 The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29.
- Naski, M. C., and D. M. Ornitz, 1998 FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci* 3: d781-794.
- Neuman, T., A. Keen, E. Knapik, D. Shain, M. Ross *et al.*, 1993 ME1 and GE1: basic helix-loop-helix transcription factors expressed at high levels in the developing nervous system and in morphogenetically active regions. *Eur J Neurosci* 5: 311-318.
- Newberry, E. P., J. M. Boudreaux and D. A. Towler, 1997 Stimulus-selective inhibition of rat osteocalcin promoter induction and protein-DNA interactions by the homeodomain repressor Msx2. *J Biol Chem* 272: 29607-29613.
- Newberry, E. P., T. Latifi and D. A. Towler, 1999 The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. *Biochemistry* 38: 10678-10690.
- Niemann, S., C. Zhao, F. Pascu, U. Stahl, U. Aulepp *et al.*, 2004 Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 74: 558-563.
- Noden, D. M., and P. A. Trainor, 2005 Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat* 207: 575-601.
- Ohba, S., H. Kawaguchi, F. Kugimiya, T. Ogasawara, N. Kawamura *et al.*, 2008 Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev Cell* 14: 689-699.

- Ohbayashi, N., M. Shibayama, Y. Kurotaki, M. Imanishi, T. Fujimori *et al.*, 2002 FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev* 16: 870-879.
- Opperman, L. A., T. M. Sweeney, J. Redmon, J. A. Persing and R. C. Ogle, 1993 Tissue interactions with underlying dura mater inhibit osseous obliteration of developing cranial sutures. *Dev Dyn* 198: 312-322.
- Ornitz, D. M., J. Xu, J. S. Colvin, D. G. McEwen, C. A. MacArthur *et al.*, 1996 Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271: 15292-15297.
- Ortuno, M. J., S. Ruiz-Gaspa, E. Rodriguez-Carballo, A. R. Susperregui, R. Bartrons *et al.*, 2010 p38 regulates expression of osteoblast-specific genes by phosphorylation of osterix. *J Biol Chem* 285: 31985-31994.
- Otto, D. M., C. J. Henderson, D. Carrie, M. Davey, T. E. Gundersen *et al.*, 2003 Identification of novel roles of the cytochrome p450 system in early embryogenesis: effects on vasculogenesis and retinoic Acid homeostasis. *Mol Cell Biol* 23: 6103-6116.
- Otto, F., H. Kanegane and S. Mundlos, 2002 Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat* 19: 209-216.
- Otto, F., A. P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K. C. Gilmour *et al.*, 1997 Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-771.
- Pan, Q., Y. Yu, Q. Chen, C. Li, H. Wu *et al.*, 2008 Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J Cell Physiol* 217: 228-241.
- Panda, S. P., A. R. Guntur, S. R. Polusani, R. J. Fajardo, P. T. Gakunga *et al.*, 2013 Conditional deletion of cytochrome p450 reductase in osteoprogenitor cells affects long bone and skull development in mice recapitulating antley-bixler syndrome: role of a redox enzyme in development. *PLoS One* 8: e75638.
- Papadaki, C., M. Alexiou, G. Cecena, M. Verykokakis, A. Bilitou *et al.*, 2007 Transcriptional repressor erf determines extraembryonic ectoderm differentiation. *Mol Cell Biol* 27: 5201-5213.
- Park, O. J., H. J. Kim, K. M. Woo, J. H. Baek and H. M. Ryoo, 2010 FGF2-activated ERK mitogen-activated protein kinase enhances Runx2 acetylation and stabilization. *J Biol Chem* 285: 3568-3574.
- Park, Y., M. Sugimoto, A. Watrin, M. Chiquet and E. B. Hunziker, 2005 BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 527-536.
- Parsons, J. L., P. S. Tait, D. Finch, Dianova, II, M. J. Edelmann *et al.*, 2009 Ubiquitin ligase ARF-BP1/Mule modulates base excision repair. *Embo j* 28: 3207-3215.
- Paumard-Hernandez, B., J. Berges-Soria, E. Barroso, C. I. Rivera-Pedroza, V. Perez-Carrizosa *et al.*, 2015 Expanding the mutation spectrum in 182 Spanish probands with craniosynostosis: identification and characterization of novel TCF12 variants. *Eur J Hum Genet* 23: 907-914.
- Pelegrino Kde, O., S. Sugayama, K. Lezirovitz, A. L. Catelani, F. Kok *et al.*, 2012 MSX2 copy number increase and craniosynostosis: copy number variation detected by array comparative genomic hybridization. *Clinics (Sao Paulo)* 67: 981-985.
- Piard, J., V. Roze, A. Czorny, M. Lenoir, M. Valduga *et al.*, 2015 TCF12 microdeletion in a 72-year-old woman with intellectual disability. *Am J Med Genet A* 167a: 1897-1901.
- Pingault, V., D. Ente, F. Dastot-Le Moal, M. Goossens, S. Marlin *et al.*, 2010 Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat* 31: 391-406.
- Pinkel, D., R. Seagraves, D. Sudar, S. Clark, I. Poole *et al.*, 1998 High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20: 207-211.
- Plon, S. E., D. M. Eccles, D. Easton, W. D. Foulkes, M. Genuardi *et al.*, 2008 Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 29: 1282-1291.

- Polychronopoulos, S., M. Verykokakis, M. N. Yazicioglu, M. Sakarellos-Daitsiotis, M. H. Cobb *et al.*, 2006 The transcriptional ETS2 repressor factor associates with active and inactive Erks through distinct FFX motifs. *J Biol Chem* 281: 25601-25611.
- Ponnala, R., P. Ranganath, U. R. Dutta, V. K. Pidugu and A. B. Dalal, 2012 Phenotypic and molecular characterization of partial trisomy 2q resulting from insertion-duplication in chromosome 18q: a case report and review of literature. *Cytogenet Genome Res* 136: 229-234.
- Pulleyn, L. J., W. Reardon, D. Wilkes, P. Rutland, B. M. Jones *et al.*, 1996 Spectrum of craniosynostosis phenotypes associated with novel mutations at the fibroblast growth factor receptor 2 locus. *Eur J Hum Genet* 4: 283-291.
- Qu, H., H. Liu, Y. Jin, Z. Cui and G. Han, 2018 HUWE1 upregulation has tumor suppressive effect in human prostate cancer cell lines through c-Myc. *Biomed Pharmacother* 106: 309-315.
- Quarto, N., and M. T. Longaker, 2005 The zebrafish (*Danio rerio*): a model system for cranial suture patterning. *Cells Tissues Organs* 181: 109-118.
- Rasmussen, S. A., M. M. Yazdy, S. L. Carmichael, D. J. Jamieson, M. A. Canfield *et al.*, 2007 Maternal thyroid disease as a risk factor for craniosynostosis. *Obstet Gynecol* 110: 369-377.
- Razzaque, M. S., D. W. Soegiarto, D. Chang, F. Long and B. Lanske, 2005 Conditional deletion of Indian hedgehog from collagen type 2 α 1-expressing cells results in abnormal endochondral bone formation. *J Pathol* 207: 453-461.
- Reinhold, M. I., and M. C. Naski, 2007 Direct interactions of Runx2 and canonical Wnt signaling induce FGF18. *J Biol Chem* 282: 3653-3663.
- Rice, D. P., 2008 *Craniofacial Sutures. Development, Disease and Treatment*. S. Karger AG, Basel, Switzerland.
- Rice, D. P., T. Aberg, Y. Chan, Z. Tang, P. J. Kettunen *et al.*, 2000 Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* 127: 1845-1855.
- Rice, D. P., E. C. Connor, J. M. Veltmaat, E. Lana-Elola, L. Veistinen *et al.*, 2010 Gli3Xt-J/Xt-J mice exhibit lambdoid suture craniosynostosis which results from altered osteoprogenitor proliferation and differentiation. *Hum Mol Genet* 19: 3457-3467.
- Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das *et al.*, 2015 Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17: 405-424.
- Richman, J., and P. J. Mitchell, 1996 Craniofacial development: knockout mice take one on the chin. *Curr Biol* 6: 364-367.
- Richtsmeier, J. T., and K. Flaherty, 2013 Hand in glove: brain and skull in development and dysmorphogenesis. *Acta Neuropathol* 125: 469-489.
- Ridgway, E. B., and H. L. Weiner, 2004 Skull deformities. *Pediatr Clin North Am* 51: 359-387.
- Rodda, S. J., and A. P. McMahon, 2006 Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 133: 3231-3244.
- Rodewald, A., M. Zankl, E. O. Gley and K. D. Zang, 1980 Partial trisomy 5q: three different phenotypes depending on different duplication segments. *Hum Genet* 55: 191-198.
- Roy, W. A., R. J. Iorio and G. A. Meyer, 1981 Craniosynostosis in vitamin D-resistant rickets. A mouse model. *J Neurosurg* 55: 265-271.
- Rutkovskiy, A., K. O. Stenslokken and I. J. Vaage, 2016 Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res* 22: 95-106.
- Sanchez-Lara, P. A., S. L. Carmichael, J. M. Graham, Jr., E. J. Lammer, G. M. Shaw *et al.*, 2010 Fetal constraint as a potential risk factor for craniosynostosis. *Am J Med Genet A* 152a: 394-400.
- Sanger, F., and A. R. Coulson, 1975 A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 441-448.
- Sarabipour, S., and K. Hristova, 2013 FGFR3 transmembrane domain interactions persist in the presence of its extracellular domain. *Biophys J* 105: 165-171.

- Satokata, I., L. Ma, H. Ohshima, M. Bei, I. Woo *et al.*, 2000 Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24: 391-395.
- Schimmenti, L. A., R. R. Higgins, N. J. Mendelsohn, T. M. Casey, J. Steinberger *et al.*, 1995 Monosomy 9p24-->pter and trisomy 5q31-->qter: case report and review of two cases. *Am J Med Genet* 57: 52-56.
- Scott, R. H., C. Meaney, L. Jenkins, A. Calder and J. A. Hurst, 2014 The postnatal features of bent bone dysplasia-FGFR2 type. *Clin Dysmorphol* 23: 8-11.
- Sekine, K., H. Ohuchi, M. Fujiwara, M. Yamasaki, T. Yoshizawa *et al.*, 1999 Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* 21: 138-141.
- Semenov, M., K. Tamai and X. He, 2005 SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 280: 26770-26775.
- Sharma, V. P., A. L. Fenwick, M. S. Brockop, S. J. McGowan, J. A. Goos *et al.*, 2013 Mutations in TCF12, encoding a basic helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nat Genet* 45: 304-307.
- Shen, A. L., K. A. O'Leary and C. B. Kasper, 2002 Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J Biol Chem* 277: 6536-6541.
- Shen, B., A. Wei, S. Whittaker, L. A. Williams, H. Tao *et al.*, 2010 The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem* 109: 406-416.
- Shen, K., S. M. Krakora, M. Cunningham, M. Singh, X. Wang *et al.*, 2009 Medical treatment of craniosynostosis: recombinant Noggin inhibits coronal suture closure in the rat craniosynostosis model. *Orthod Craniofac Res* 12: 254-262.
- Shi, S., S. Lin, B. Chen and Y. Zhou, 2017 Isolated chromosome 8p23.2pter deletion: Novel evidence for developmental delay, intellectual disability, microcephaly and neurobehavioral disorders. *Mol Med Rep* 16: 6837-6845.
- Shiihara, T., M. Kato, T. Kimura, K. Hayasaka, S. Yamamori *et al.*, 2004 Craniosynostosis with extra copy of MSX2 in a patient with partial 5q-trisomy. *Am J Med Genet A* 128a: 214-216.
- Shirakabe, K., K. Terasawa, K. Miyama, H. Shibuya and E. Nishida, 2001 Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells* 6: 851-856.
- Shukla, V., X. Coumoul, R. H. Wang, H. S. Kim and C. X. Deng, 2007 RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. *Nat Genet* 39: 1145-1150.
- Simpson, E. R., M. S. Mahendroo, G. D. Means, M. W. Kilgore, M. M. Hinshelwood *et al.*, 1994 Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15: 342-355.
- Slavotinek, A. M., D. Boles and F. Lacbawan, 2003 A female infant with duplication of chromosome 2q33 to 2q37.3. *Clin Dysmorphol* 12: 251-256.
- Sobreira, N., F. Schiettecatte, D. Valle and A. Hamosh, 2015 GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat* 36: 928-930.
- Solinas-Toldo, S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner *et al.*, 1997 Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20: 399-407.
- Sperber, G. H., S. M. Sperber and G. D. Guttmann, 2010 *Craniofacial Embryogenetics and Development*. People's Medical Publishing House-USA, Shelton, CT.
- St-Jacques, B., M. Hammerschmidt and A. P. McMahon, 1999 Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13: 2072-2086.
- Stein, G. S., J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. Van Wijnen and M. Montecino, 1996 Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev* 76: 593-629.

- Stevens, J. R., G. A. Miranda-Carboni, M. A. Singer, S. M. Brugger, K. M. Lyons *et al.*, 2010 Wnt10b deficiency results in age-dependent loss of bone mass and progressive reduction of mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Res* 25: 2138-2147.
- Stichelbout, M., A. Dieux-Coeslier, E. Clouqueur, C. Collet and F. Petit, 2016 A new case of bent bone dysplasia--FGFR2 type and review of the literature. *Am J Med Genet A* 170: 785-789.
- Stuart, G. W., J. V. McMurray and M. Westerfield, 1988 Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103: 403-412.
- Su, P., H. Ding, D. Huang, Y. Zhou, W. Huang *et al.*, 2011 A 4.6 kb genomic duplication on 20p12.2-12.3 is associated with brachydactyly type A2 in a Chinese family. *J Med Genet* 48: 312-316.
- Sue Masters, B., and C. C. Marohnic, 2006 Cytochromes P450--a family of proteins and scientists--understanding their relationships. *Drug Metab Rev* 38: 209-225.
- Takada, I., M. Mihara, M. Suzawa, F. Ohtake, S. Kobayashi *et al.*, 2007 A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 9: 1273-1285.
- Taneyhill, L. A., 2008 To adhere or not to adhere: the role of Cadherins in neural crest development. *Cell Adh Migr* 2: 223-230.
- Tanimoto, Y., M. Yokozeki, K. Hiura, K. Matsumoto, H. Nakanishi *et al.*, 2004 A soluble form of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) with S252W mutation acts as an efficient inhibitor for the enhanced osteoblastic differentiation caused by FGFR2 activation in Apert syndrome. *J Biol Chem* 279: 45926-45934.
- Taylor, J. C., H. C. Martin, S. Lise, J. Broxholme, J. B. Cazier *et al.*, 2015 Factors influencing success of clinical genome sequencing across a broad spectrum of disorders. *Nat Genet* 47: 717-726.
- Temiyasathit, S., and C. R. Jacobs, 2010 Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction. *Ann N Y Acad Sci* 1192: 422-428.
- Thomas, G. P., A. O. Wilkie, P. G. Richards and S. A. Wall, 2005 FGFR3 P250R mutation increases the risk of reoperation in apparent 'nonsyndromic' coronal craniosynostosis. *J Craniofac Surg* 16: 347-352; discussion 353-344.
- Timberlake, A. T., J. Choi, S. Zaidi, Q. Lu, C. Nelson-Williams *et al.*, 2016 Two locus inheritance of non-syndromic midline craniosynostosis via rare SMAD6 and common BMP2 alleles. *Elife* 5.
- Timberlake, A. T., C. G. Furey, J. Choi, C. Nelson-Williams, E. Loring *et al.*, 2017 De novo mutations in inhibitors of Wnt, BMP, and Ras/ERK signaling pathways in non-syndromic midline craniosynostosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E7341-e7347.
- Timsah, Z., Z. Ahmed, C. C. Lin, F. A. Melo, L. J. Stagg *et al.*, 2014 Competition between Grb2 and Plcgamma1 for FGFR2 regulates basal phospholipase activity and invasion. *Nat Struct Mol Biol* 21: 180-188.
- Ting, M. C., N. L. Wu, P. G. Roybal, J. Sun, L. Liu *et al.*, 2009 EphA4 as an effector of Twist1 in the guidance of osteogenic precursor cells during calvarial bone growth and in craniosynostosis. *Development* 136: 855-864.
- Torii, S., M. Kusakabe, T. Yamamoto, M. Maekawa and E. Nishida, 2004 Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* 7: 33-44.
- Towler, D. A., S. J. Rutledge and G. A. Rodan, 1994 Msx-2/Hox 8.1: a transcriptional regulator of the rat osteocalcin promoter. *Mol Endocrinol* 8: 1484-1493.
- Tu, X., K. S. Joeng and F. Long, 2012 Indian hedgehog requires additional effectors besides Runx2 to induce osteoblast differentiation. *Dev Biol* 362: 76-82.
- Twigg, S. R., D. Lloyd, D. Jenkins, N. E. Elcioglu, C. D. Cooper *et al.*, 2012 Mutations in multidomain protein MEGF8 identify a Carpenter syndrome subtype associated with defective lateralization. *Am J Hum Genet* 91: 897-905.
- Twigg, S. R., E. Vorgia, S. J. McGowan, I. Peraki, A. L. Fenwick *et al.*, 2013 Reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis in humans and mice and links ERK1/2 signaling to regulation of osteogenesis. *Nat Genet* 45: 308-313.

- Twigg, S. R., and A. O. Wilkie, 2015 A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 97: 359-377.
- Ulsamer, A., M. J. Ortuno, S. Ruiz, A. R. Susperregui, N. Osses *et al.*, 2008 BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38. *J Biol Chem* 283: 3816-3826.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth *et al.*, 2012 Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40: e115.
- Van Der Burgt, C. J., G. F. Merckx, A. H. Janssen, J. C. Mulder, R. F. Suijkerbuijk *et al.*, 1992 Partial trisomy for 5q and monosomy for 12p in a liveborn child as a result of a complex five breakpoint chromosome rearrangement in a parent. *J Med Genet* 29: 739-741.
- Vandewalle, J., M. Langen, M. Zschatzsch, B. Nijhof, J. M. Kramer *et al.*, 2013 Ubiquitin ligase HUWE1 regulates axon branching through the Wnt/beta-catenin pathway in a *Drosophila* model for intellectual disability. *PLoS One* 8: e81791.
- Vasquez-Velasquez, A. I., H. A. Garcia-Castillo, M. G. Gonzalez-Mercado, I. P. Davalos, G. Raca *et al.*, 2011 Duplication 5q and deletion 9p due to a t(5;9)(q34;p23) in 2 cousins with features of Hunter-McAlpine syndrome and hypothyroidism. *Cytogenet Genome Res* 132: 233-238.
- Vaughan, L., C. T. Tan, A. Chapman, D. Nonaka, N. A. Mack *et al.*, 2015 HUWE1 ubiquitylates and degrades the RAC activator TIAM1 promoting cell-cell adhesion disassembly, migration, and invasion. *Cell Rep* 10: 88-102.
- Vega-Hernandez, M., A. Kovacs, S. De Langhe and D. M. Ornitz, 2011 FGF10/FGFR2b signaling is essential for cardiac fibroblast development and growth of the myocardium. *Development* 138: 3331-3340.
- Volckaert, T., and S. P. De Langhe, 2015 Wnt and FGF mediated epithelial-mesenchymal crosstalk during lung development. *Dev Dyn* 244: 342-366.
- Walters-Sen, L. C., K. Windemuth, K. Angione, J. Nandhlal and J. M. Milunsky, 2015 Familial transmission of 5p13.2 duplication due to maternal der(X)ins(X;5). *Eur J Med Genet* 58: 305-309.
- Wang, D., C. L. Claus, G. Vaccarelli, M. Braunstein, T. M. Schmitt *et al.*, 2006 The basic helix-loop-helix transcription factor HEBA1 is expressed in pro-T cells and enhances the generation of T cell precursors. *J Immunol* 177: 109-119.
- Wang, H. U., and D. J. Anderson, 1997 Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* 18: 383-396.
- Wang, L., Y. Huang, K. Pan, X. Jiang and C. Liu, 2010 Osteogenic responses to different concentrations/ratios of BMP-2 and bFGF in bone formation. *Ann Biomed Eng* 38: 77-87.
- Wang, M., H. Jin, D. Tang, S. Huang, M. J. Zuscik *et al.*, 2011 Smad1 plays an essential role in bone development and postnatal bone formation. *Osteoarthritis Cartilage* 19: 751-762.
- Wang, P. I., J. R. Marcus, H. E. Fuchs and S. Mukundan, Jr., 2007a Craniosynostosis Secondary to Rickets: Manifestations on Computed Tomography. *Radiol Case Rep* 2: 43.
- Wang, X., C. H. Goh and B. Li, 2007b p38 mitogen-activated protein kinase regulates osteoblast differentiation through osterix. *Endocrinology* 148: 1629-1637.
- Wang, Y., Y. P. Li, C. Paulson, J. Z. Shao, X. Zhang *et al.*, 2014 Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 19: 379-407.
- Warman, M. L., J. B. Mulliken, P. G. Hayward and U. Muller, 1993 Newly recognized autosomal dominant disorder with craniosynostosis. *Am J Med Genet* 46: 444-449.
- Warren, S. M., L. J. Brunet, R. M. Harland, A. N. Economides and M. T. Longaker, 2003 The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion. *Nature* 422: 625-629.
- Westerfield, M., 1995 *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene, OR.
- Wijgerde, M., S. Karp, J. McMahon and A. P. McMahon, 2005 Noggin antagonism of BMP4 signaling controls development of the axial skeleton in the mouse. *Dev Biol* 286: 149-157.

- Wilkie, A. O., J. C. Byren, J. A. Hurst, J. Jayamohan, D. Johnson *et al.*, 2010 Prevalence and complications of single-gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics* 126: e391-400.
- Wilkie, A. O., Z. Tang, N. Elanko, S. Walsh, S. R. Twigg *et al.*, 2000 Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene *MSX2* causes defects in skull ossification. *Nat Genet* 24: 387-390.
- Wilkie, A. O. M., D. Johnson and S. A. Wall, 2017 Clinical genetics of craniosynostosis. *Curr Opin Pediatr* 29: 622-628.
- Will, A. J., G. Cova, M. Osterwalder, W. L. Chan, L. Wittler *et al.*, 2017 Composition and dosage of a multipartite enhancer cluster control developmental expression of *Ihh* (Indian hedgehog). *Nat Genet* 49: 1539-1545.
- Wojciechowski, J., A. Lai, M. Kondo and Y. Zhuang, 2007 E2A and HEB are required to block thymocyte proliferation prior to pre-TCR expression. *J Immunol* 178: 5717-5726.
- Wu, M., G. Chen and Y. P. Li, 2016 TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 4: 16009.
- Wu, X. B., Y. Li, A. Schneider, W. Yu, G. Rajendren *et al.*, 2003 Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in *noggin*-overexpressing mice. *J Clin Invest* 112: 924-934.
- Wu, Y., T. Ji, J. Wang, J. Xiao, H. Wang *et al.*, 2010 Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. *BMC Med Genet* 11: 72.
- Wuyts, W., W. Reardon, S. Preis, T. Homfray, A. Rasore-Quartino *et al.*, 2000 Identification of mutations in the *MSX2* homeobox gene in families affected with foramina parietalia permagna. *Hum Mol Genet* 9: 1251-1255.
- Wysocka, B., I. Brozek, J. Wierzba, I. Kardas, A. Wozniak *et al.*, 2002 Partial trisomy of distal 5q and partial monosomy of Xp as a result of mating between two translocation carriers: a female with a balanced translocation t(X;5)(p11;q31) and a male with a der(13;14)(q10;q10)--a case report and a family study. *Ann Genet* 45: 143-146.
- Xiao, G., D. Jiang, C. Ge, Z. Zhao, Y. Lai *et al.*, 2005 Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and *Runx2/Cbfa1* stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem* 280: 30689-30696.
- Xiao, G., D. Jiang, R. Gopalakrishnan and R. T. Franceschi, 2002 Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, *Cbfa1/Runx2*. *J Biol Chem* 277: 36181-36187.
- Yamaguchi, T. P., A. Bradley, A. P. McMahon and S. Jones, 1999 A *Wnt5a* pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126: 1211-1223.
- Yang, L., S. Gu, W. Ye, Y. Song and Y. Chen, 2016 Augmented Indian hedgehog signaling in cranial neural crest cells leads to craniofacial abnormalities and dysplastic temporomandibular joint in mice. *Cell Tissue Res* 364: 105-115.
- Yang, X., K. Matsuda, P. Bialek, S. Jacquot, H. C. Masuoka *et al.*, 2004 ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117: 387-398.
- Yang, Y., L. Topol, H. Lee and J. Wu, 2003 *Wnt5a* and *Wnt5b* exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 130: 1003-1015.
- Yoon, W. J., Y. D. Cho, W. J. Kim, H. S. Bae, R. Islam *et al.*, 2014 Prolyl isomerase Pin1-mediated conformational change and subnuclear focal accumulation of *Runx2* are crucial for fibroblast growth factor 2 (FGF2)-induced osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 289: 8828-8838.
- Yoshida, C. A., T. Furuichi, T. Fujita, R. Fukuyama, N. Kanatani *et al.*, 2002 Core-binding factor beta interacts with *Runx2* and is required for skeletal development. *Nat Genet* 32: 633-638.
- Yoshida, T., L. A. Phylactou, J. B. Uney, I. Ishikawa, K. Eto *et al.*, 2005 *Twist* is required for establishment of the mouse coronal suture. *J Anat* 206: 437-444.

- Yu, H., P. M. Smallwood, Y. Wang, R. Vidaltamayo, R. Reed *et al.*, 2010 Frizzled 1 and frizzled 2 genes function in palate, ventricular septum and neural tube closure: general implications for tissue fusion processes. *Development* 137: 3707-3717.
- Yu, K., J. Xu, Z. Liu, D. Susic, J. Shao *et al.*, 2003 Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development* 130: 3063-3074.
- Yu, S., L. M. Yerges-Armstrong, Y. Chu, J. M. Zmuda and Y. Zhang, 2015 AP2 suppresses osteoblast differentiation and mineralization through down-regulation of Frizzled-1. *Biochem J* 465: 395-404.
- Yu, S., L. M. Yerges-Armstrong, Y. Chu, J. M. Zmuda and Y. Zhang, 2016 Transcriptional Regulation of Frizzled-1 in Human Osteoblasts by Sp1. *PLoS One* 11: e0163277.
- Yu, S., K. Zhu, Y. Lai, Z. Zhao, J. Fan *et al.*, 2013 atf4 promotes beta-catenin expression and osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Biol Sci* 9: 256-266.
- Zhang, Y., A. L. Kuipers, L. M. Yerges-Armstrong, C. S. Nestlerode, Z. Jin *et al.*, 2010 Functional and association analysis of frizzled 1 (FZD1) promoter haplotypes with femoral neck geometry. *Bone* 46: 1131-1137.
- Zhang, Z., D. Alpert, R. Francis, B. Chatterjee, Q. Yu *et al.*, 2009 Massively parallel sequencing identifies the gene *Megf8* with ENU-induced mutation causing heterotaxy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3219-3224.
- Zhao, X., D. A. D., W. K. Lim, M. Brahmachary, M. S. Carro *et al.*, 2009 The N-Myc-DLL3 cascade is suppressed by the ubiquitin ligase *Huwe1* to inhibit proliferation and promote neurogenesis in the developing brain. *Dev Cell* 17: 210-221.
- Zhao, X., J. I. Heng, D. Guardavaccaro, R. Jiang, M. Pagano *et al.*, 2008 The HECT-domain ubiquitin ligase *Huwe1* controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. *Nat Cell Biol* 10: 643-653.
- Zhou, M., R. L. Sutliff, R. J. Paul, J. N. Lorenz, J. B. Hoying *et al.*, 1998 Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat Med* 4: 201-207.
- Zhou, Y. X., X. Xu, L. Chen, C. Li, S. G. Brodie *et al.*, 2000 A Pro250Arg substitution in mouse *Fgfr1* causes increased expression of *Cbfa1* and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Mol Genet* 9: 2001-2008.
- Zhu, X., S. Petrovski, P. Xie, E. K. Ruzzo, Y. F. Lu *et al.*, 2015 Whole-exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios. *Genet Med* 17: 774-781.

DANKSAGUNG

Ein GROSSES UND HERZLICHES DANKESCHÖN an PROF. DR. EVA KLOPOCKI! Danke, dass du mir die Chance gegeben hast das spannende Feld der Humangenetik kennenzulernen! Danke für dein Vertrauen in mich und die Bereitstellung des außerordentlich interessanten Themas. Vielen Dank für deine großartige Unterstützung und gleichzeitig den Freiraum eigenverantwortlich arbeiten zu können!

Ein HERZLICHES DANKESCHÖN an PROF. DR. FRANZ JAKOB und PROF. DR. CHRISTIAN STIGLOHER für die Begleitung meiner Doktorarbeit im Rahmen des Promotionskomitees! Danke, dass Sie sich die Zeit für die alljährlichen Treffen genommen und mit konstruktiven Ratschlägen zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ausdrücklich danken möchte ich PROF. DR. FRANZ JAKOB auch für die Übernahme des Zweitgutachtens!

VIELEN DANK an alle ÄRZTE, die Patienten für die Kraniosynostose Kohorte rekrutiert haben und damit die Arbeit in diesem Umfang ermöglicht haben. Besonders danken möchte ich in diesem Zusammenhang OA PD DR. TILMANN SCHWEITZER von der Pädiatrischen Neurochirurgie der Universitätsklinik Würzburg (Direktor Neurochirurgische Klinik: Prof. Dr. Ralf-Ingo Ernestus) für die gute Zusammenarbeit!

VIELEN LIEBEN DANK an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Klopocki! Ein RIESIGES DANKESCHÖN besonders an DANIEL, ISABELL, RABEA UND SABINE für die schöne Zeit mit euch! Danke für eure fachliche, und ganz besonders Danke für eure emotionale Unterstützung! Dankeschön für schöne Laborausflüge, für leckeren Kuchen und laute Labormusik! Ich war immer sehr gerne ein Teil dieses wunderbaren Teams!

Ein HERZLICHES DANKESCHÖN an das gesamte HUMANGENETIK INSTITUT für die freundliche Aufnahme, tolle Zusammenarbeit und hilfsbereite Unterstützung während der gesamten Zeit! Ein GANZ BESONDERES DANKESCHÖN geht hierbei an CHRISTIN, ISABELL, JULIA, KERSTIN UND TIMO! Danke für die freundschaftliche Atmosphäre, die fachlichen Diskussionen sowie für Wrapwoch, Dönerstag und Osterbrunch! Es war mir eine Ehre euch zu Kollegen zu haben!

Meinen ELTERN möchte ich GANZ BESONDERS danken. DANKESCHÖN für eure Motivation, euer Vertrauen in mich und eure bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen! VIELEN LIEBEN DANK an meine Brüder SEBASTIAN und FLORIAN, dass ihr euch die Zeit genommen habt meine Dissertation Korrektur zu lesen!

OLIVER – MEIN HELD, BESTER FREUND & EHEMANN – DANKE! Danke für ALLES trifft es eigentlich am besten! DANKE für deine Liebe, deinen Optimismus, deine Unterstützung, deine gute Laune, dein Verständnis und dein Glaube an mich!

CURRICULUM VITAE

PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

PUBLIKATIONEN

Use of targeted high-throughput sequencing for genetic classification of platelet disorders in patients with bleeding diathesis.

Andres O, König EM, Knöfler R., Streif W, Althaus K, Bakchoul T, Bugert P, Eber S, Kunstmann E, Meyer O, Strauß G, Wiegering V, Manukjan G, Klopocki E, Schulze H
Thrombosis and Haemostasis-Thieme Medical Publishers, Submitted

Interstitial deletion of 5q22.2-23.1 including *APC* and *TSSK1B* in a patient with adenomatous polyposis and asthenoteratozoospermia.

Kadiyska T, Tourtourikov I, Petrov A, Chavoushian A, Antalavicheva M, König EM, Klopocki E, Vessela N, Stanislavov R.
Molecular Syndromology; Submitted

Recessive grey platelet-like syndrome with unaffected erythropoiesis in the absence of the splice isoform *GFI1B*-p37.

Schulze H, Schlagenhaut A, Manukjan G, Beham-Schmid C, Andres O, Klopocki E, König EM, Haidl H, Panzer S, Althaus K, Muntean WE, Schwinger W, Urban C, Greinacher A, Bakchoul T, Seidel MG.
Haematologica. 2017 Sep;102(9):e375-e378. doi: 10.3324/haematol.2017.167957.

A novel two-nucleotide deletion in *HPS6* affects mepacrine uptake and platelet dense granule secretion in a family with Hermansky-Pudlak syndrome.

Andres O, Wiegering V, König EM, Schneider AL, Semeniak D, Stritt S, Klopocki E, Schulze H.
Pediatr Blood Cancer. 2017 May;64(5). doi: 10.1002/pbc.26320.

Craniosynostosis associated with Partial Monosomy 2q37.3 and Partial Trisomy 5q35 including *MSX2*.

König EM, Engmann L, Kress W, Quattländer A, Schweitzer A, E. Klopocki
J Rare Dis Diagn Ther. 2015 doi:10.21767/2380-7245.100013

U1snRNP-mediated suppression of polyadenylation in conjunction with the RNA structure controls poly(A) site selection in foamy viruses.

Schrom EM, Moschall R, Hartl MJ, Weitner H, Fecher D, Langemeier J, Bohne J, Wöhrle BM, Bodem J.
Retrovirology. 2013 May 29;10:55. doi: 10.1186/1742-4690-10-55.

Regulation of retroviral polyadenylation.

Schrom EM, Moschall R, Schuch A, Bodem J.
Adv Virus Res. 2013;85:1-24. doi: 10.1016/B978-0-12-408116-1.00001-X

A complex immunodeficiency is based on U1 snRNP-mediated poly(A) site suppression.

Langemeier J, Schrom EM, Rabner A, Radtke M, Zychlinski D, Saborowski A, Bohne G, Mandel-Gutfreund Y, Bodem J, Klein C, Bohne J.
EMBO J. 2012 Oct 17;31(20):4035-44. doi: 10.1038/emboj.2012.252.

Construction of a high titer infectious HIV-1 subtype C proviral clone from South Africa.

Jacobs GB, Bock S, Schuch A, Moschall R, Schrom EM, Zahn J, Reuter C, Preiser W, Rethwilm A, Engelbrecht S, Kerkau T, Bodem J.
Viruses. 2012 Sep;4(9):1830-43. doi: 10.3390/v4091830.

PUBLIKATIONEN IN VORBEREITUNG

***MSX2* nucleotide variant and chromosomal rearrangements in 5q are associated with Craniosynostosis**

König EM, Platzer K, Schweitzer T, Klopocki E

***TCF12* mutations in coronal craniosynostosis – spectrum and frequency**

Köblitz I, **König EM**, Graul-Neumann LM, Tzschach A, Collmann H, Schweitzer T, Kress W, Klopocki E

Novel Pathogenic Variants in Craniosynostosis Genes Identified by NGS

König EM, Platzer K, Spier I, Spranger S, Tzschach A, Zirn B, Schweitzer T, Kress W, Klopocki E

KONGRESSBEITRÄGE

03/2018 *MSX2* nucleotide variant and chromosomal rearrangements in 5q are associated with Craniosynostosis

E.-M. König, K. Platzer, T. Schweitzer, E. Klopocki
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Münster, Deutschland

10/2017 Novel Pathogenic Variants in Craniosynostosis Genes Identified by NGS

E.-M. König, K. Platzer, I. Spier, S. Spranger, A. Tzschach, B. Zirn, T. Schweitzer, W. Kress, E. Klopocki
Posterpräsentation, Jahrestagung der *American Society of Human Genetics* (ASHG), Orlando, Florida

03/2016 Targeted NGS for analysis of craniosynostosis identifies a novel mutation in *MEGF8*
aktualisiert

E.-M. König, S. Spranger, A. Tzschach, A. Dufke, I. Spier, T. Schweitzer, W. Kress, E. Klopocki
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Lübeck, Deutschland

06/2015 Targeted NGS for analysis of craniosynostosis identifies a novel mutation in *MEGF8*

E.-M. König, S. Spranger, T. Schweitzer, W. Kress, E. Klopocki
Posterpräsentation, Jahrestagung der *European Society of Human Genetics* (ESHG), Glasgow, UK

03/2014 Partial trisomy 5p associated with sagittal craniosynostosis

E.-M. Schrom, L. Engmann, T. Schweitzer, W. Kress, E. Klopocki
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Essen, Deutschland

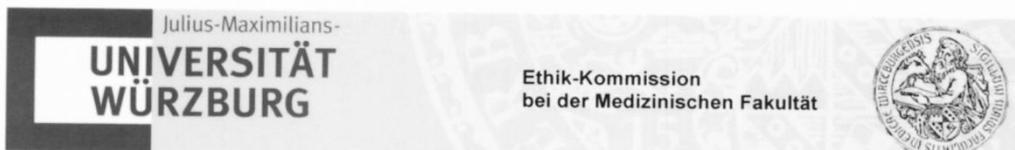
ANHANG

A) Primersequenzen

Name	Sequenz 5'-3'
hu_cDNA_TCF12_Ex10_fwd1	ATGGGACCCACAATTCTTCT
hu_cDNA_TCF12_Ex10_fwd2	GACCCACAATTCTTCTGACCTT
hu_cDNA_TCF12_Ex10_fwd2	GACCCACAATTCTTCTGACCTT
hu_cDNA_TCF12_Ex11_fwd	AGTTATCCTCCACACTCAGTTT
hu_cDNA_TCF12_Ex11_fwd	AGTTATCCTCCACACTCAGTTT
hu_cDNA_TCF12_Ex11_rev	CTAGAATGCTGTCTGATCCATT
hu_cDNA_TCF12_Ex11_rev	CTAGAATGCTGTCTGATCCATT
hu_cDNA_TCF12_Ex12_rev	TGTCTGTGAGCTTCCAGCAG
hu_cDNA_TCF12_Ex12_rev	TGTCTGTGAGCTTCCAGCAG
hu_cDNA_TCF12_Ex7_fwd	CAAGATCTGGGGCTTGGGAG
hu_cDNA_TCF12_Ex7_fwd	CAAGATCTGGGGCTTGGGAG
hu_gDNA_BMP2_Ex1_fwd	TCCAGGGGTGGGCTAAGAG
hu_gDNA_BMP2_Ex1_rev	CCAAGATGGCGAACTCACATC
hu_gDNA_ERF_Ex2_fwd	GTCGTAATTCATCTGGGGCT
hu_gDNA_ERF_Ex2_rev	CTGACCCCAGGCCACTCCCT
hu_gDNA_FGFR2_Ex9_fwd	CGCACATGGAAGCTCACAGAA
hu_gDNA_FGFR2_Ex9_rev	GGTTGTGCTATGATGCGTCA
hu_gDNA_FGFR3_Ex7_fwd	GCAGTGGCGGTGGTGGTGA
hu_gDNA_FGFR3_Ex7_rev	CTTGAGCACGGTAACGTAGG
hu_gDNA_HUWE1_Ex6_fwd	GAAAAGGCAAAGCAAAGGTG
hu_gDNA_HUWE1_Ex6_rev	GGTGGGACGTGAACTTGTCT
hu_gDNA_MEGF8_Ex30_fwd	GGTTCGGGAAGTCAGGAAG
hu_gDNA_MEGF8_Ex30_rev	GGCATGTCCTGGTGTTCAGA
hu_gDNA_MEGF8_Ex39_fwd	AGAGGTGGGGTCTTGAAC
hu_gDNA_MEGF8_Ex39_rev1	TACTTGGTGCCTTCCCGTC
hu_gDNA_MEGF8_Ex39_rev2	TCATCCTCTCCTGACTGGGG
hu_gDNA_MEGF8_Ex5_fwd	TTTGTGCCCTGTCTGTCTCA
hu_gDNA_MEGF8_Ex5_rev	GCAACAGGAGACACATGGAA
hu_gDNA_MSX2_Ex2_fwd	GAGGCCCGAAAGGAAAAA
hu_gDNA_MSX2_Ex2_rev	ACAGGTGGTACATGCCATATC
hu_gDNA_POR_Ex9_fwd	CTGGGAGAGCCCTTGATGTA
hu_gDNA_POR_Ex9_rev	TTGCTTGGGATCCTGTAACC
hu_gDNA_PTCH1_Ex20_fwd	CCAGCAACCTGATCTTGTGA
hu_gDNA_PTCH1_Ex20_rev	ACGAGGTGCTGCAATCTACC
hu_gDNA_SMAD6_Ex1_1_fwd	CCCCTTCGACGACAGGCT
hu_gDNA_SMAD6_Ex1_1_rev	CGAGTACGTGACGGTTTTGAG
hu_gDNA_SMAD6_Ex1_2_fwd	TGCTGTCTCTTTTCGGAGCG
hu_gDNA_SMAD6_Ex1_2_rev	CAGAGAGAAGGGCACGGAAG
hu_gDNA_SMAD6_Ex2_1_fwd	TGTTGAGGGGATTTGGGCAG
hu_gDNA_SMAD6_Ex2_1_rev	TTTACAGCAACCAGTCCGG
hu_gDNA_SMAD6_Ex3_fwd	AAGTTGGGAGGGACATGCTG
hu_gDNA_SMAD6_Ex3_rev	GCAACCTTCCCATCCAAGGA
hu_gDNA_SMAD6_Ex4_fwd	CTTACCCAGCTCCCACTGTG
hu_gDNA_SMAD6_Ex4_rev	CTGTGTCTCTGGGCATCGG
hu_gDNA_TWIST1_fwd	GTCTCCGGCCCTGCTGAG
hu_gDNA_TWIST1_rev	CCCGCTCTTCTCCTCTGC
hu_MEGF8_Ex5_BamHI_rev	ATTGGATCCGCAACAGGAGACACATGGAA
hu_MEGF8_Ex5_XhoI_fwd	ATTCTCGAGATGGGGCGAGTATCTGGGATC
hu_TCF12_Ex10_BamHI_rev	ATTGGGATCCTGATAACAGGTCAAAAAGAGCA
hu_TCF12_Ex10_XhoI_fwd	ATTGCTCGAGAGTGGAGTCATTGCTGACACA

Name	Sequenz 5'-3'
hu_TCF12_Ex13_BamHI_rev	ATTGGATCCTCAAGACTAGGCTGGGCAAC
hu_TCF12_Ex13_XhoI_fwd	ATTCTCGAGTTGGCAAAAATGTGGTTGAT
hu_TCF12_M13_Ex10_fwd	TGTAAAACGACGGCCAGTTGGAGGGTACCCCTTGAATTTT
hu_TCF12_M13_Ex10_rev	CAGGAAACAGCTATGACCTTGGTGAAACTGAGTGTGGAGG
hu_TCF12_M13_Ex13_fwd	TGTAAAACGACGGCCAGTTCTGAAGTCTTAGGGGTGACAACCT
hu_TCF12_M13_Ex13_rev	CAGGAAACAGCTATGACCTCTTCATTCCAATTGCCTGG
hu_TCF12_M13_Ex19_fwd	TGTAAAACGACGGCCAGTTCACATTTTGTGTAGCAAGGTGC
hu_TCF12_M13_Ex19_rev	CAGGAAACAGCTATGACCTCTCCAAGCAGAGCAACTG
M13_fwd	GTA AACGACGGCCAG
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC
qPCR_7q_A_fwd	GCAACGGGAATTTGCTCGAA
qPCR_7q_A_rev	GCCAGCTGATGAAGTCGTTT
qPCR_7q_B_fwd	TCACGGTGCTTACGTACCTG
qPCR_7q_B_rev	CGTGTAACAGCCGGACAAGA
qPCR_7q_C_fwd	TATTCTCTTTGGCTCGGCGT
qPCR_7q_C_rev	TGCACTAATACCAGCTGCCT
qPCR_7q_D_fwd	GGTGTAAAGCGGTGGTGGTTA
qPCR_7q_D_rev	TGGGTCTGAGAGAAGGTGCT
qPCR_7q_E_fwd	GCTGAAGACTCGGGCAAAGT
qPCR_7q_E_rev	GACTTCCAAGCTCCGTTCCA
qPCR_ALB_Ex12_fwd	TGTTGCATGAGAAAACGCCA
qPCR_ALB_Ex12_rev	GTCGCCTGTTACCAAGGAT
qPCR_cDNA_GAPDH_Ex7/8_fwd	TGCACCACCAACTGCTTAGC
qPCR_cDNA_GAPDH_Ex7/8_rev	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
qPCR_cDNA_MEGF8_Ex12A_fwd	GCACTTGCTCACCTTTCAGC
qPCR_cDNA_MEGF8_Ex12A_rev	TGTTAGGGTGATGGTTCGTGC
qPCR_cDNA_MEGF8_Ex30_fwd	GGGCAAAGCGAGATCGTATG
qPCR_cDNA_MEGF8_Ex30_rev	CATGACCCAGGCTGCTCC
qPCR_cDNA_MEGF8_Ex8/9_fwd	CAATGGGTGTCAGGAGCTGA
qPCR_cDNA_MEGF8_Ex8/9_rev	ATGTGAGTACCGACCACTGG
qPCR_cDNA_RPLP0_fwd	GAACACCATGATGCGCAAGG
qPCR_cDNA_RPLP0_rev	CCCGGATATGAGGCAGCA
qPCR_F8_Ex8_fwd	GCCAAGAAGCATCCTAAAACCTTG
qPCR_F8_Ex8_rev	GGCGAGGACTAAGGGAGCAT
qPCR_TCF12_A_fwd	TGAGCTCTCAGGACTTACAGTT
qPCR_TCF12_A_rev	GCTGGCAACCTAACAGGAGA
qPCR_TCF12_B_fwd	TTGGCATGATCTGGAGCTGA
qPCR_TCF12_B_rev	ACGTCAGTCATGTAGCCTCAC
qPCR_TCF12_C_fwd	CATCGGGAAGACTCTGTCACT
qPCR_TCF12_C_rev	TGGTTCAGGTCTGTGCTTGA
qPCR_TCF12_D_fwd	AGGAAGCCTCACAAATTAGTAA
qPCR_TCF12_D_rev	TTTCCACATGCGCTGGAAT
qPCR_TCF12_E_fwd	AGCTCCTGTTGCCTCACATC
qPCR_TCF12_E_rev	TGCCACTGCACACCTATGAG
SA2	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC
SD6	TCTGAGTCACCTGGACAACC
zf_actin_fwd	CCAACAACGTCCTTTCTGGT
zf_actin_rev	GAGGGACCTGCCTCATCATA
zf_fgf10a_BamHI_fwd	TTCAGGTACCATGTGCAAATGGAAAGTGACTAA
zf_fgf10a_XhoI_rev	TTCTACTCGAGCTACACGATAGGAATGGGGAGA
zf_fgf10a_utr_fwd	AGGAAAGGTTGGACACATGG
zf_fgf10a_utr_rev	ATTCCGATGGTAGGATGCTG
zf_fgfr2_ribo_fwd	TCAGACTCCAGCTCCTCCAT
zf_fgfr2_ribo_rev	TCCCACATTTAAAACCCCAA
zf_huwe1_ribo_fwd	GGAAGAAGCTCGTTGTCTGG
zf_huwe1_ribo_rev	CTTCTGCTCTTTGGCAGCTT

B) Ethikvotum



Ethik-Kommission • Versbacher Str. 9 • 97078 Würzburg

Prof. Dr. rer. nat. Eva Klopocki
Lehrstuhl für Humangenetik
Institut für Humangenetik
Biozentrum/Am Hubland
97074 Würzburg

Ethik-Kommission
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Versbacher Str. 9
97078 Würzburg

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. M. Stolberg
Geschäftsführer: Dr. R. Wölfel
Sekretariat: S. Schmidt/M. Hutter/A. Geiger
Bitte beachten! Telefon 0049 (0)931 31 48315
Telefax 0049 (0)931 31 87520
ethikkommission@uni-wuerzburg.de
www.ethik-kommission.medizin.uni-wuerzburg.de

Würzburg, 30.08.2013/hu

Unser Zeichen: **89/13** (bitte bei Schriftwechsel angeben)

Beratung nach § 15 Berufsordnung für Ärzte in Bayern

Titel: Pathogenese kraniofazialer Malformationen -Array-CGH Screening.
Antragsteller: Prof. Dr. rer. nat. Eva Klopocki, Lehrstuhl für Humangenetik, Institut für Humangenetik, Biozentrum/Am Hubland, 97074 Würzburg

Sehr geehrte Frau Prof. Klopocki,

in der Sitzung der Ethik-Kommission am 16.04.2013 wurde die o. g. Studie auf der Basis der Unterlagen in Anlage 1 beraten. Zusätzliche Informationen und revidierte Unterlagen wurden nachgefordert und lagen am 29.07.2013 vor.

Seitens der Ethik-Kommission bestehen nunmehr keine ethischen/rechtlichen Bedenken gegen die Durchführung der Studie.

Die Ethik-Kommission erlaubt sich folgende Anmerkungen:

- Weiterhin finden sich Fachtermini in der Patienteninformation, die für Laien schwer- bis unverständlich sein dürften.
- Es sollte klar dargelegt werden, dass bei einem Widerruf Daten gelöscht (oder anonymisiert) und Proben vernichtet werden, sofern der Teilnehmer nicht ausdrücklich einer Weiterverwendung zustimmt.

Werden der Ethik-Kommission überarbeitete Unterlagen vorgelegt, so bitten wir darauf zu achten, dass mit den geänderten Unterlagen eine Version vorgelegt wird, aus der alle Änderungen (Streichungen/Änderungen/Ergänzungen) klar hervorgehen. Bitte nutzen Sie nach Möglichkeit die in gängigen Textbearbeitungsprogrammen verfügbare Funktion 'Änderungen nachverfolgen'. Es genügt die Vorlage in elektronischer Form.

Allgemeine Hinweise:

Sie werden um Beachtung folgender Punkte gebeten:

- Ihrem Antrag entsprechend vorzugehen. Änderungen hierzu sind der Ethik-Kommission zur erneuten Prüfung vorzulegen.
- Die Deklaration des Weltärztebundes in der aktuellen Version hinsichtlich der ethischen und rechtlichen Aspekte biomedizinischer Forschung am Menschen zu beachten.
- Ethik-Kommission das Studienende anzuzeigen und einen Kurzbericht über das Ergebnis der Studie vorzulegen.

Entsprechend der ausschließlich beratenden Funktion der Ethik-Kommission betrifft unser Votum nur die ethische Beurteilung des Projektes. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Sponsor, bei der Leiterin/dem Leiter der Studie und bei den durchführenden Untersucherinnen/Untersuchern.

Die Ethik-Kommission wünscht Ihnen für Ihr Vorhaben viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Ausgefertigt im Auftrag



Prof. Dr. med. Dr. phil. Michael Stolberg
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Dr. med. Reinhard Wölfel
Geschäftsführer der Ethik-Kommission

Anlage 1

Antrag vom 25.03.2013
1_Ethikantrag_FACE_TP4b.doc
2_Studienprotokoll_Teilprojekt_WÜ.docx
2a_FACE_Vorhabensbeschreibung_SP4_Würzburg.doc
3_Patienteninformation_FACE.doc
4_Einverstaendniserklaerung.doc
5_Einverstaendniserklaerung_Fotos.doc

revidierte Unterlagen; Eingang 29.07.2013
Ethikantrag_FACE_TP4b.doc
Studienprotokoll_Teilprojekt_WÜ_07-2013.docx
FACE_Vorhabensbeschreibung_SP4_Würzburg.doc
Patienteninformation_FACE_07-2013.doc
Patienteninformation_FACE_Eltern_07-2013.doc
Patienteninformation_FACE_Jugendliche_07-2013.doc
Patienteninformation_FACE_Kinder_07-2013.doc
Einwilligungsklaerung_07-2013.doc
Einwilligungserklaerung_Fotos_07-2013.doc
Ethikantrag_FACE_Unterschriften.pdf

C) Genliste Kraniosynostose Panel

Tabelle C.1: Kraniosynostose Panel Version 1 (Illumina *Nextera Rapid Capture Kit*)

Gen	Transkript (RefSeq)	OMIM #	Gen	Transkript (RefSeq)	OMIM #
<i>ALX4</i>	NM_021926.3	605420	<i>IL11RA</i>	NM_001142784	600939
<i>BMP2</i>	NM_001200	112261	<i>JAG1</i>	NM_000214	601920
BMP2 Enhancer		112261	<i>LBX1</i>	NM_006562	604255
<i>BMP4</i>	NM_001202	112262	<i>MEGF8</i>	NM_001271938	604267
<i>BMPR1B</i>	NM_001203	603248	<i>MSX2</i>	NM_002449.4	123101
<i>CYP26A1</i>	NM_019885	602239	<i>NOG</i>	NM_005450	602991
<i>EFNA1</i>	NM_004428	191164	<i>PITX1</i>	NM_002653	602149
<i>EFNA2</i>	NM_001405.3	602756	<i>POR</i>	NM_000941	124015
<i>EFNA3</i>	NM_004952	601381	<i>PTCH1</i>	NM_000264	601309
<i>EFNA4</i>	NM_005227	601380	<i>PTCH2</i>	NM_003738	603673
<i>EFNB1</i>	NM_004429.4	300035	<i>PTHLH</i>	NM_198964	168470
<i>ERF</i>	NM_006494	611888	<i>RAB23</i>	NM_183227.2	606144
<i>ERK1</i>	NM_002746	601795	<i>RALDH1</i>	NM_000689	100640
<i>ERK2</i>	NM_002745	176948	<i>RALDH2</i>	NM_003888	603687
<i>ESCO2</i>	NM_001017420	609353	<i>RALDH3</i>	NM_000693	600463
<i>FBN1</i>	NM_000138.4	134797	<i>RARA</i>	NM_00964	180240
<i>FGF10</i>	NM_004465.1	602115	<i>RBP4</i>	NM_006744	180250
<i>FGF18</i>	NM_003862	603726	<i>RECQL4</i>	NM_004260.3	603780
<i>FGF2</i>	NM_002006	134920	<i>ROR2</i>	NM_004560	602337
<i>FGF22</i>	NM_020637	605831	<i>RUNX2</i>	NM_001024630	600211
<i>FGF3</i>	NM_005247	164950	<i>RXRA</i>	NM_002957	180245
<i>FGF4</i>	NM_020996	164980	<i>SHH</i>	NM_000193	600725
<i>FGF6</i>	NM_020996	134921	<i>SKI</i>	NM_003036	164780
<i>FGF8</i>	NM_033163	600483	<i>SMO</i>	NM_005631	601500
<i>FGF9</i>	NM_002010	600921	<i>SOX9</i>	NM_000346	608160
<i>FGFR1</i>	NM_023110.2	136350	<i>TBX3</i>	NM_016569	601621
<i>FGFR2</i>	NM_000141.4	176943	<i>TBX5</i>	NM_000192	601620
<i>FGFR3</i>	NM_000142.4	134934	<i>TCF12</i>	NM_207037.1	600480
<i>FREM1</i>	NM_144966	608944	<i>TGFBR1</i>	NM_004612.2	190181
<i>GDF5</i>	NM_000557	601146	<i>TGFBR2</i>	NM_003242.5	610168
<i>GDF6</i>	NM_001001557	601147	<i>TP63</i>	NM_001114978	603273
<i>GLI3</i>	NM_000168.5	165240	<i>TWIST1</i>	NM_000474.3	601622
<i>IHH</i>	NM_002181	600726	ZRS		605522
IHH Regulator	chr2:219974365-219965112				

Tabelle C.2: Kraniosynostose Panel Version 2 (Agilent SureSelect^{QXT} Kit)

Gen	Transkript (RefSeq)	OMIM #	Gen	Transkript (RefSeq)	OMIM #
<i>ALPL</i>	NM_000478.4	146300	<i>HUWE1</i>	NM_031407	300697
<i>ALX4</i>	NM_021926.3	605420	<i>IFT122</i>	NM_052985	606045
<i>ASXL1</i>	NM_015338	612990	<i>IFT43</i>	NM_052873	614068
<i>AXIN2</i>	NM_004655	604025	<i>IHH</i>	NM_002181	600726
<i>BMP2</i>	NM_001200	112261	IHH Regulator	chr2:219974365-219965112	
BMP2 Enhancer		112261	<i>IL11RA</i>	NM_001142784	600939
<i>BMP4</i>	NM_001202	112262	<i>JAG1</i>	NM_000214	601920
<i>BMPR1B</i>	NM_001203	603248	<i>LBX1</i>	NM_006562	604255
<i>CDC45</i>	NM_001178010	603465	<i>MEGF8</i>	NM_001271938	604267
<i>CYP26B1</i>	NM_019885	605207	<i>MSX2</i>	NM_002449.4	123101
<i>EFNA2</i>	NM_001405.3	602756	<i>NOG</i>	NM_005450	602991
<i>EFNA4</i>	NM_005227	601380	<i>PDGFR-A</i>	NM_006206	173490
<i>EFNB1</i>	NM_004429.4	300035	<i>PITX1</i>	NM_002653	602149
<i>EphA4</i>	NM_004438.3	602188	<i>POR</i>	NM_000941	124015
<i>ERF</i>	NM_006494	611888	<i>PTCH1</i>	NM_000264	601309
<i>ESCO2</i>	NM_001017420	609353	<i>PTCH2</i>	NM_003738	603673
<i>FBN1</i>	NM_000138.4	134797	<i>PTHLH</i>	NM_198964	168470
<i>FGF10</i>	NM_004465.1	602115	<i>RAB23</i>	NM_183227.2	606144
<i>FGF18</i>	NM_003862	603726	<i>RECQL4</i>	NM_004260.3	603780
<i>FGF2</i>	NM_002006	134920	<i>ROR2</i>	NM_004560	602337
<i>FGF22</i>	NM_020637	605831	<i>RUNX2</i>	NM_001024630	600211
<i>FGF3</i>	NM_005247	164950	<i>SHH</i>	NM_000193	600725
<i>FGF4</i>	NM_020996	164980	<i>SKI</i>	NM_003036	164780
<i>FGF6</i>	NM_020996	134921	<i>SOX9</i>	NM_000346	608160
<i>FGF8</i>	NM_033163	600483	<i>TBX3</i>	NM_016569	601621
<i>FGF9</i>	NM_002010	600921	<i>TBX5</i>	NM_000192	601620
<i>FGFR1</i>	NM_023110.2	136350	<i>TCF12</i>	NM_207037.1	600480
<i>FGFR2</i>	NM_000141.4	176943	<i>TGFBR1</i>	NM_004612.2	190181
<i>FGFR3</i>	NM_000142.4	134934	<i>TGFBR2</i>	NM_003242.5	610168
<i>FLNA</i>	NM_001110556	300017	<i>TP63</i>	NM_001114978	603273
<i>FREM1</i>	NM_144966	608944	<i>TWIST1</i>	NM_000474.3	601622
<i>GDF5</i>	NM_000557	601146	<i>WDR19</i>	NM_025132	608151
<i>GDF6</i>	NM_001001557	601147	<i>WDR35</i>	NM_001006657	613602
<i>GLI3</i>	NM_000168.5	165240	<i>ZIC1</i>	NM_003412	600470
<i>HOXD13</i>	NM_000523	142989	ZRS		605522

D) Auflistung Bereiche mit lückenhafter Abdeckung**Tabelle D.1:** lückenhaft abgedeckte Bereiche der Patienten CRA_6, 14, 18, 19, 29, 34, 43, 48, 49, 56, 64 und 80 [hg19]

Patient CRA_6							
Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
1	2160180	2161199	<i>SKI</i>	9	94712123	94712295	<i>ROR2</i>
1	45308507	45308629	<i>PTCH2</i>	9	98270417	98270668	<i>PTCH1</i>
1	155051392	155051570	<i>EFNA3</i>	9	98278700	98278880	<i>PTCH1</i>
2	219924849	219925214	<i>IHH</i>	10	94833666	94833905	<i>CYP26A1</i>
2	219965137	219974340	<i>NHEJ1</i>	10	102987001	102987572	<i>LBX1</i>
4	123747905	123748532	<i>FGF2</i>	11	44331121	44331637	<i>ALX4</i>
5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	12	115109620	115110132	<i>TBX3</i>
6	45390288	45390719	<i>RUNX2</i>	12	115111944	115112665	<i>TBX3</i>
7	19156310	19156969	<i>TWIST1</i>	19	639900	640164	<i>FGF22</i>
7	42003902	42006264	<i>GLI3</i>	19	643384	643629	<i>FGF22</i>
7	128828967	128829348	<i>SMO</i>	19	42752591	42753915	<i>ERF</i>
7	155595568	155596445	<i>SHH</i>	20	6808104	6866049	Enhancer <i>BMP2</i>
8	97156765	97157777	<i>GDF6</i>				
Patient CRA_14							
Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
4	123747892	123748549	<i>FGF2</i>	9	101867446	101867625	<i>TGFBR1</i>
7	19156309	19157030	<i>TWIST1</i>	10	103535600	103535779	<i>FGF8</i>
9	98270420	98270659	<i>PTCH1</i>	19	1286118	1286357	<i>EFNA2</i>
Patient CRA_18							
Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
1	2160180	2161199	<i>SKI</i>	9	98270417	98270668	<i>PTCH1</i>
2	219924849	219925214	<i>IHH</i>	9	98278700	98278880	<i>PTCH1</i>
2	219965137	219974340	<i>NHEJ1</i>	10	94833666	94833905	<i>CYP26A1</i>
4	123747905	123748532	<i>FGF2</i>	10	102987001	102987572	<i>LBX1</i>
5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	10	102988222	102988597	<i>LBX1</i>
5	174151637	174152066	<i>MSX2</i>	10	103530060	103530401	<i>FGF8</i>
6	45390288	45390719	<i>RUNX2</i>	11	44286378	44286758	<i>ALX4</i>
7	19156310	19156969	<i>TWIST1</i>	11	44331121	44331637	<i>ALX4</i>
7	42003902	42006264	<i>GLI3</i>	12	115109620	115110132	<i>TBX3</i>
7	128828967	128829348	<i>SMO</i>	12	115111944	115112665	<i>TBX3</i>
7	155595568	155596445	<i>SHH</i>	17	54671559	54672308	<i>NOG</i>
8	38287174	38287491	<i>FGFR1</i>	17	70119658	70120553	<i>SOX9</i>
8	97156765	97157777	<i>GDF6</i>	19	643384	643629	<i>FGF22</i>
9	94712123	94712295	<i>ROR2</i>	19	42752591	42753915	<i>ERF</i>
9	98211325	98211630	<i>PTCH1</i>				
Patient CRA_19							
Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
1	2160180	2161199	<i>SKI</i>	9	94712123	94712295	<i>ROR2</i>
1	2237990	2238229	<i>SKI</i>	9	98270417	98270668	<i>PTCH1</i>
1	45292134	45292465	<i>PTCH2</i>	9	98278700	98278880	<i>PTCH1</i>
1	45308507	45308629	<i>PTCH2</i>	9	137218380	137218545	<i>RXRA</i>
1	155051392	155051570	<i>EFNA3</i>	10	94833666	94833905	<i>CYP26A1</i>
2	219924849	219925214	<i>IHH</i>	10	102987001	102987572	<i>LBX1</i>
2	219965137	219974340	<i>NHEJ1</i>	10	102988222	102988597	<i>LBX1</i>
4	123747905	123748532	<i>FGF2</i>	10	103530060	103530401	<i>FGF8</i>

5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	11	44286378	44286758	<i>ALX4</i>
5	174151637	174152066	<i>MSX2</i>	11	44331121	44331637	<i>ALX4</i>
6	45390288	45390719	<i>RUNX2</i>	12	115109620	115110132	<i>TBX3</i>
7	19156310	19156969	<i>TWIST1</i>	12	115111944	115112665	<i>TBX3</i>
7	42003902	42006264	<i>GLI3</i>	12	115120591	115121030	<i>TBX3</i>
7	128828967	128829348	<i>SMO</i>	17	54671559	54672308	<i>NOG</i>
7	155595568	155596445	<i>SHH</i>	17	70119658	70120553	<i>SOX9</i>
8	38287174	38287491	<i>FGFR1</i>	19	643384	643629	<i>FGF22</i>
8	97156765	97157777	<i>GDF6</i>	19	42752591	42753915	<i>ERF</i>
9	94495378	94495743	<i>ROR2</i>	22	22221586	22221755	<i>MAPK1</i>

Patient CRA_29

Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
1	2160180	2161199	<i>SKI</i>	10	94833666	94833905	<i>CYP26A1</i>
2	219924849	219925214	<i>IHH</i>	10	102987001	102987572	<i>LBX1</i>
4	123747905	123748532	<i>FGF2</i>	10	102988222	102988597	<i>LBX1</i>
5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	10	103530060	103530401	<i>FGF8</i>
5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	11	44331121	44331637	<i>ALX4</i>
7	19156310	19156969	<i>TWIST1</i>	12	115109620	115110132	<i>TBX3</i>
7	42003902	42006264	<i>GLI3</i>	12	115111944	115112665	<i>TBX3</i>
7	128828967	128829348	<i>SMO</i>	17	54671559	54672308	<i>NOG</i>
7	155595568	155596445	<i>SHH</i>	17	70119658	70120553	<i>SOX9</i>
8	97156765	97157777	<i>GDF6</i>	19	643384	643629	<i>FGF22</i>
9	94712123	94712295	<i>ROR2</i>	19	42752591	42753915	<i>ERF</i>
9	98270417	98270668	<i>PTCH1</i>	20	6808104	6866049	Enhancer
9	98278700	98278880	<i>PTCH1</i>				<i>BMP2</i>

Patient CRA_34

Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
1	2160180	2161199	<i>SKI</i>	9	98270417	98270668	<i>PTCH1</i>
2	219924849	219925214	<i>IHH</i>	9	98278700	98278880	<i>PTCH1</i>
2	219965137	219974340	<i>NHEJ1</i>	10	94833666	94833905	<i>CYP26A1</i>
4	123747905	123748532	<i>FGF2</i>	10	102987001	102987572	<i>LBX1</i>
5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	10	102988222	102988597	<i>LBX1</i>
5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	10	103530060	103530401	<i>FGF8</i>
7	19156310	19156969	<i>TWIST1</i>	11	44331121	44331637	<i>ALX4</i>
7	42003902	42006264	<i>GLI3</i>	12	115109620	115110132	<i>TBX3</i>
7	128828967	128829348	<i>SMO</i>	12	115111944	115112665	<i>TBX3</i>
7	155595568	155596445	<i>SHH</i>	17	70119658	70120553	<i>SOX9</i>
8	38287174	38287491	<i>FGFR1</i>	19	643384	643629	<i>FGF22</i>
8	97156765	97157777	<i>GDF6</i>	19	42752591	42753915	<i>ERF</i>
9	94712123	94712295	<i>ROR2</i>	20	6808104	6866049	Enhancer
							<i>BMP2</i>

Patient CRA_43

Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
1	2160180	2161199	<i>SKI</i>	9	98270417	98270668	<i>PTCH1</i>
1	45292134	45292465	<i>PTCH2</i>	9	98278700	98278880	<i>PTCH1</i>
1	45308507	45308629	<i>PTCH2</i>	10	94833666	94833905	<i>CYP26A1</i>
2	219924849	219925214	<i>IHH</i>	10	102987001	102987572	<i>LBX1</i>
2	219965137	219974340	<i>NHEJ1</i>	10	102988222	102988597	<i>LBX1</i>
4	123747905	123748532	<i>FGF2</i>	10	103530060	103530401	<i>FGF8</i>
5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	11	44286378	44286758	<i>ALX4</i>

5	174151637	174152066	<i>MSX2</i>	11	44331121	44331637	<i>ALX4</i>
6	45390288	45390719	<i>RUNX2</i>	11	69588766	69588920	<i>FGF4</i>
7	19156310	19156969	<i>TWIST1</i>	12	115109620	115110132	<i>TBX3</i>
7	42003902	42006264	<i>GLI3</i>	12	115111944	115112665	<i>TBX3</i>
7	128828967	128829348	<i>SMO</i>	17	54671559	54672308	<i>NOG</i>
7	155595568	155596445	<i>SHH</i>	17	70119658	70120553	<i>SOX9</i>
8	38287174	38287491	<i>FGFR1</i>	19	643384	643629	<i>FGF22</i>
8	97156765	97157777	<i>GDF6</i>	19	42752591	42753915	<i>ERF</i>
9	94712123	94712295	<i>ROR2</i>	19	42856334	42856633	<i>MEGF8</i>
9	94495378	94495743	<i>ROR2</i>				

Patient CRA_48

Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
1	2160180	2161199	<i>SKI</i>	10	103530060	103530401	<i>FGF8</i>
1	45292134	45292465	<i>PTCH2</i>	10	103535600	103535682	<i>FGF8</i>
2	219924849	219925214	<i>IHH</i>	11	44286378	44286758	<i>ALX4</i>
2	219965137	219974340	<i>NHEJ1</i>	11	69588766	69588920	<i>FGF4</i>
5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	12	115109620	115110132	<i>TBX3</i>
5	174151637	174152066	<i>MSX2</i>	12	115111944	115112665	<i>TBX3</i>
6	45390288	45390719	<i>RUNX2</i>	12	115120591	115121030	<i>TBX3</i>
7	19156310	19156969	<i>TWIST1</i>	17	38512235	38512503	<i>RARA</i>
7	42003902	42006264	<i>GLI3</i>	17	54671559	54672308	<i>NOG</i>
7	128828967	128829348	<i>SMO</i>	17	70119658	70120553	<i>SOX9</i>
7	155595568	155596445	<i>SHH</i>	19	643209	643363	<i>FGF22</i>
8	38287174	38287491	<i>FGFR1</i>	19	643384	643629	<i>FGF22</i>
8	97156765	97157777	<i>GDF6</i>	19	1295518	1295882	<i>EFNA2</i>
9	94712123	94712295	<i>ROR2</i>	19	42752591	42753915	<i>ERF</i>
9	98209168	98209758	<i>PTCH1</i>	19	42856334	42856633	<i>MEGF8</i>
9	98270417	98270668	<i>PTCH1</i>	19	42872581	42872839	<i>MEGF8</i>
9	98278700	98278880	<i>PTCH1</i>	19	42879633	42880952	<i>MEGF8</i>
9	101867462	101867609	<i>TGFBR1</i>	20	6808104	6866049	Enhancer <i>BMP2</i>
10	94833666	94833905	<i>CYP26A1</i>	20	34021681	34022606	<i>GDF5</i>
10	102987001	102987572	<i>LBX1</i>	22	22221586	22221755	<i>MAPK1</i>
10	102988222	102988597	<i>LBX1</i>				

Patient CRA_49

Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
4	123747892	123748549	<i>FGF2</i>	10	103535600	103535779	<i>FGF8</i>
7	19156309	19157030	<i>TWIST1</i>	19	639913	640152	<i>FGF22</i>
8	97156753	97157777	<i>GDF6</i>	19	1286118	1286357	<i>EFNA2</i>
9	98270420	98270659	<i>PTCH1</i>	19	42874835	42875014	<i>MEGF8</i>
9	98278662	98278957	<i>PTCH1</i>	X	53652593	53653099	<i>HUWE1</i>
9	101867446	101867625	<i>TGFBR1</i>				

Patient CRA_56

Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
1	2160180	2161199	<i>SKI</i>	10	102988222	102988597	<i>LBX1</i>
1	45292134	45292465	<i>PTCH2</i>	10	103530060	103530401	<i>FGF8</i>
1	45308507	45308629	<i>PTCH2</i>	11	44286378	44286758	<i>ALX4</i>
2	219919903	219920612	<i>IHH</i>	11	44331121	44331637	<i>ALX4</i>
2	219924849	219925214	<i>IHH</i>	11	69588766	69588920	<i>FGF4</i>
2	219965137	219974340	<i>NHEJ1</i>	12	115109620	115110132	<i>TBX3</i>

5	134364443	134365036	<i>PITX1</i>	12	115111944	115112665	<i>TBX3</i>
5	174151637	174152066	<i>MSX2</i>	12	115118658	115118976	<i>TBX3</i>
6	45390288	45390719	<i>RUNX2</i>	17	54671559	54672308	<i>NOG</i>
7	19156310	19156969	<i>TWIST1</i>	17	70119658	70120553	<i>SOX9</i>
7	42003902	42006264	<i>GLI3</i>	19	643384	643629	<i>FGF22</i>
7	155595568	155596445	<i>SHH</i>	19	1295518	1295882	<i>EFNA2</i>
8	38287174	38287491	<i>FGFR1</i>	19	42752591	42753915	<i>ERF</i>
8	97156765	97157777	<i>GDF6</i>	19	42838133	42838390	<i>MEGF8</i>
9	94712123	94712295	<i>ROR2</i>	19	42854274	42854561	<i>MEGF8</i>
9	98209168	98209758	<i>PTCH1</i>	19	42856334	42856633	<i>MEGF8</i>
9	98270417	98270668	<i>PTCH1</i>	19	42872581	42872839	<i>MEGF8</i>
9	98278700	98278880	<i>PTCH1</i>	19	42879633	42880952	<i>MEGF8</i>
10	94833666	94833905	<i>CYP26A1</i>	20	6808104	6866049	Enhancer <i>BMP2</i>
10	102987001	102987572	<i>LBX1</i>	20	34021681	34022606	<i>GDF5</i>

Patient CRA_64

Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
4	123747892	123748549	<i>FGF2</i>	19	639913	640152	<i>FGF22</i>
7	19156309	19157030	<i>TWIST1</i>	19	1286118	1286357	<i>EFNA2</i>
9	101867446	101867625	<i>TGFBR1</i>	19	42874835	42875014	<i>MEGF8</i>
10	103535600	103535779	<i>FGF8</i>				

Patient CRA_80

Chr	Position Start	Position Ende	Gen	Chr	Position Start	Position Ende	Gen
4	123747892	123748549	<i>FGF2</i>	10	103535600	103535779	<i>FGF8</i>
7	19156309	19157030	<i>TWIST1</i>	19	1286118	1286357	<i>EFNA2</i>
9	98270420	98270659	<i>PTCH1</i>	19	42874835	42875014	<i>MEGF8</i>
9	98278662	98278957	<i>PTCH1</i>	20	30946517	30946696	<i>ASXL1</i>
9	101867446	101867625	<i>TGFBR1</i>				

E) DECIPHER Patienten mit überlappenden Aberrationen**Tabelle E.1:** DECIPHER Patienten mit überlappenden 15q21.3 Monosomien, die *TCF12* betreffen (zusätzliche chromosomale Aberrationen werden nicht aufgeführt; Stand Juli 2018)

DECIPHER ID	chr. Position [hg19]	Phänotyp
332881	15:49716395-60143976	-
965	15:49896865-60460116	Intelligenzminderung, Corpus callosum Hypoplasie, Koarktation der Aorta
256795	15:50183964-58519952	-
299906	15:51407592-64015525	globale Entwicklungsverzögerung
266272	15:51504485-63814786	Polydaktylie Füße, multiple Nierenzyten
250024	15:51735068-57724096	Hypertelorismus, Ptose, abfallende Lidspalten, tief-sitzende Ohren, Zahnfehlstellung, Situs inversus, Intelligenzminderung
284754	15:52851404-65115971	Hypermetropie, Strabismus, offener Mund, Plattfuß, neonatale Hypotonie, motorische Entwicklungsverzögerung
262196	15:54254351-60857397	Adipositas, Makrozephalie, Intelligenzminderung
271644	15:55951100-62484416	Intelligenzminderung
264303	15:56988880-61861510	Intelligenzminderung
262662	15:57024476-57543522	-
278460	15:56547697-60188065	-

Tabelle E.2: DECIPHER Patienten mit überlappenden 5p15.1-p12 Trisomien (zusätzliche chromosomale Aberrationen werden nicht aufgeführt; Stand Juli 2018)

DECIPHER ID	chr. Position [hg19]	Phänotyp
314621	5:1-42573850	-
269509	5:71704-35463036	siehe Datenbank
268568	5:25942-25196251	siehe Datenbank
285458	5:6262981-27692374	-
4119	5:7521238-43644925	siehe Datenbank
255566	5:14339427-28281053	siehe Datenbank
283397	5:22308449-34002057	-
314656	5:32230408-37392200	siehe Datenbank
255925	5:35589089-39328506	siehe Datenbank
317726	5:35861979-42250628	siehe Datenbank
1227	5:36240080-42862390	siehe Datenbank
FGF10 betroffen		
283637	5:38542259-54415610	-
305917	5:25801713-52322105	Epikanthus, verzögerte Sprachentwicklung, milde globale Entwicklungsverzögerung
288085	5:27103225-46202807	lange Zehen
337881	5:34611534-44873491	Intelligenzminderung

Tabelle E.3: DECIPHER Patienten mit überlappenden 2q37.3-qter Monosomien (zusätzliche chromosomale Aberrationen sowie der Phänotyp werden nicht aufgeführt; Stand Juli 2018)

DECIPHER ID mit isolierten, partiellen 2q Monosomien
252472 // 301123 // 258634 // 333250 // 249331 // 331076 // 249751 // 254923 // 249934 // 273993 // 296349 // 278203 // 280666 // 261798 // 294708 // 294406 // 249494 // 263211 // 252496 // 324169 // 285991 // 305886 // 251241 // 250622 // 248458 // 290061 // 250317 // 277875 // 326587 // 333551 // 248705 // 262608 // 331574 // 282765
DECIPHER ID mit partiellen 2q Monosomien und zusätzlichen Aberrationen
292073 // 265197 // 283249 // 283212 // 255789 // 257099 // 257505 // 285992 // 248461 // 314714 // 255105 // 278624 // 257439 // 250715 // 296432 // 865 // 269574 // 327862 // 252280 // 1379 // 283821 // 340921 // 281648

Tabelle E.4: DECIPHER Patienten mit überlappenden 8p23.3-pter Monosomien (zusätzliche chromosomale Aberrationen sowie der Phänotyp werden nicht aufgeführt; Stand Juli 2018)

DECIPHER ID mit isolierten, partiellen 8p Monosomien
317196 // 269522 // 251426 // 328437 // 322108 // 277848 // 317193 // 288410 // 273410 // 314825 // 295087 // 269276 // 338954 // 303661 // 338097 // 294526 // 263448 // 266826 // 281204 // 280996 // 268285 // 254459 // 323665
DECIPHER ID mit partiellen 8p Monosomien und zusätzlichen Aberrationen
260186 // 283051 // 254627 // 276226 // 251470 // 251369 // 270537 // 288865 // 288139 // 331178 // 288140 // 288975 // 289112 // 249297 // 256909 // 254484 // 259621 // 252481 // 257200 // 257198 // 254962 // 253195 // 253194 // 299664 // 258847 // 271197 // 264850 // 256501 // 264516 // 254177 // 277536 // 4088 // 272067 // 271695 // 300689 // 281469 // 275084 // 274900 // 262600 // 326869 // 277938 // 285995 // 286143 // 285667 // 285797 // 286197 // 2841 // 337882

Tabelle E.5: DECIPHER Patienten mit überlappenden 5q34-qter Trisomien (zusätzliche chromosomale Aberrationen sowie der Phänotyp werden nicht aufgeführt; Patienten mit *MSX2* Zugewinn sind hervorgehoben; Stand Juli 2018)

DECIPHER ID mit isolierten, partiellen 5q Trisomien
278114 // 264221 // 331567 // 289877 // 252793 // 249567 // 248956 // 293742 // 338770 // 292632 // 300677 // 284463 // 319416 // 308800 // 285747 // 267309 // 315077 // 262602 // 336847 // 337182 // 306149 // 306459 // 303663 // 258658 // 258631 // 338708 // 300119 // 319580 // 306987 // 295585 // 284791 // 306529 // 296528 // 305306
DECIPHER ID mit partiellen 5q Trisomien und zusätzlichen Aberrationen
282073 // 273674 // 285499 // 280719 // 282379 // 284051 // 264214 // 274319 // 254931 // 289031 // 289790 // 253167 // 250838 // 256565 // 331005 // 264563 // 253147

Tabelle E.6: DECIPHER Patienten mit überlappenden 2q34-qter Trisomien (zusätzliche chromosomale Aberrationen sowie der Phänotyp werden nicht aufgeführt; Stand Juli 2018)

DECIPHER ID mit partiellen 2q Trisomien		
265082 // 294902 // 304173 // 331143 // 267729 // 262585 // 288203 // 326498 // 308661 // 1464 // 256295 // 1496 // 257099 // 296348 // 2024 // 267729 // 259590 // 252280 // 285957 // 285689 // 271370 // 274172 // 255106 // 327862 // 293310		
IHH betroffen		
DECIPHER ID	chr. Position [hg19]	Phänotyp
259205	2:209072197-220561675	Atopisches Ekzem, kognitive Beeinträchtigung, Genu valgum, Pterygium colli
282992	2:213255835-220275950	ADHS, Koordinationsstörung, verzögerte Sprachentwicklung, Zahnauffälligkeiten, Mikrognathie, Übergewicht
286233	2:95530631-243068396	-
260838	2:216527137-242783384	Glaukom, Intelligenzminderung
304173	2:219713606-221090946	Syndaktylie Finger I-II

Tabelle E.7: DECIPHER Patienten mit überlappenden 7q21.13-q21.3 Monosomien (zusätzliche chromosomale Aberrationen werden nicht aufgeführt; Stand Juli 2018)

DECIPHER ID	chr. Position [hg19]	Phänotyp
255823	7:93515492-94229044	-
289126	7:91558571-91777875	Autismus, verzögerte Sprachentwicklung
289274	7:91997684-97905676	Intelligenzminderung, Mikrognathie, Minderwuchs
273170	7:92443586-94215634	breite Stirn, Mikrozephalie, triangulares Gesicht, Klinodaktylie des Kleinfingers, Minderwuchs, Verstopfung, Hyperhidrose
257117	7:93633040-94931564	-
FZD1 betroffen		
DECIPHER ID	chr. Position [hg19]	Phänotyp
806	7:77803224-93290138	Minderwuchs, Anfälle, verzögerte Sprachentwicklung, Intelligenzminderung
289274	7:91997684-97905676	Minderwuchs, Mikrognathie, Intelligenzminderung
811	7:67230978-92831897	verzögerte Sprachentwicklung, Epilepsie, mukuläre Hypotonie, Intelligenzminderung, Verstopfung, Optikus Hypoplasie

854	7:65621477-101019060	Gaumenspalte, abfallende Lidspalten, Epikanthus, Hydrozephalus, Hypertelorismus, Mikrozephalie, Mikrognathie, Intelligenzminderung, Spalthand und -fuß, Herzdefekt, Inguinalhernie
855	7:81425451-98445563	Spaltfuß, Mikrozephalie Minderwuchs, Intelligenzminderung
315074	7:83037637-95217091	Intelligenzminderung
4100	7:85976320-94268253	Abnormale Genitalien, Haut und Oberlippe; Autismus, breiter Daumen, Epikanthus, Intelligenzminderung, verzögerte Sprachentwicklung, Mikrozephalie, tief-sitzende Ohren, Skoliose, kurzes Philtrum
321	-	-
306535	7:80270442-104087437	-
285920	7:86574084-94631377	Gaumenspalte, faziale Dysmorphien, Mikrozephalie, Herzdefekte, Lungenstenose
331982	-	-
251554	-	-

F) Auswertung *SMAD6* Sequenzierungsprojekt

Tabelle F.1: Aufführung der detektierten *SMAD6* Varianten von jedem Patienten (ohne Bewertung)

Patienten-ID	<i>SMAD6</i> Varianten	<i>BMP2</i> SNP	Patienten-ID	<i>SMAD6</i> Varianten	<i>BMP2</i> SNP
P01	-	✓	P49	c.253C>T, p.R85C c.711C>T, p.H237H c.875-22C>A	-
P02	c.264C>G, p.G88G, c.875-22C>A	✓	P50	c.120C>T, p.G40G	✓
P03	c.120C>T, p.G40G	✓	P51	c.875-22C>A	✓
P04	c.875-22C>A	-	P52	c.875-22C>A	✓
P05	-	✓	P53	c.875-22C>A	-
P06	c.120C>T, p.G40G c.802C>G, p.R268G c.875-22C>A	-	P54	c.875-22C>A	✓
P07	c.875-22C>A	✓	P55	c.120C>T, p.G40G c.875-22C>A	✓
P08	c.875-22C>A	-	P56	c.875-22C>A	✓
P09	-	✓	P57	c.875-22C>A	✓
P10	c.875-22C>A	-	P58	c.875-22C>A	-
P11	-	✓	P59	c.120C>T, p.G40G	✓
P12	c.120C>T, p.G40G	-	P60	-	-
P13	c.875-22C>A	✓	P61	-	-
P14	-	✓	P62	c.875-22C>A	✓
P15	c.875-22C>A	-	P63	-	✓
P16	c.120C>T, p.G40G c.465-471del, p.G156Vfs*23	✓	P64	-	✓
P17	c.875-22C>A	✓	P65	c.875-22C>A	✓
P18	c.875-22C>A	-	P66	c.120C>T, p.G40G c.875-22C>A	✓
P19	c.875-22C>A	-	P67	c.875-22C>A	✓
P20	-	✓	P68	c.875-22C>A	-
P21	c.875-22C>A	✓	P69	c.875-22C>A	-
P22	c.1-24insA, c.875-22C>A	✓	P70	c.875-22C>A	✓
P23	c.875-22C>A	✓	P71	-	-

P24	c.875-22C>A	✓	P72	c.253C>T, p.R85C	✓
P25	c.875-22C>A	✓	P73	c.253C>T, p.R85C	✓
P26	c.875-22C>A	✓	P74	c.875-22C>A	✓
P27	-	✓	P75	c.587A>G, p.E196G c.619C>T, p.L207L c.875-22C>A c.1173T>G, p.I391T	✓
P28	-	✓	P76	c.875-22C>A	✓
P29	c.875-22C>A	✓	P77	-	✓
P30	-	✓	P78	c.875-22C>A	-
P31	-	✓	P79	c.711C>T, p.H237H	-
P32	-	-	P80	-	✓
P33	-	✓	P81	-	✓
P34	-	-	P82	c.875-22C>A	✓
P35	c.875-22C>A	-	P83	c.875-22C>A	-
P36	-	-	P84	c.711C>T, p.H237H	✓
P37	c.120C>T, p.G40G	-	P85	c.875-22C>A	✓
P38	-	✓	P86	c.875-22C>A	✓
P39	c.120C>T, p.G40G	✓	P87	c.875-22C>A	✓
P40	-	✓	P88	c.875-22C>A	-
P41	-	✓	P89	-	✓
P42	c.875-22C>A	✓	P90	-	✓
P43	c.875-22C>A	✓	P91	c.875-22C>A	✓
P44	c.875-22C>A	✓	P92	-	-
P45	-	✓	P93	-	✓
P46	c.875-22C>A	✓	P94	-	✓
P47	-	-	P95	c.875-22C>A	✓
P48	c.875-22C>A	✓	P96	-	-

G) Vektorkarten

