

Funktionelle Charakterisierung des Transkriptionsfaktors AP-2E als Kandidatengen für Neurokristopathien

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Jeshurun Chiaran Kalanithy

aus Olpe

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Heiko Martin Reutter
2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Geyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.09.2025

Aus dem Institut für Humangenetik und Institut für Neuroanatomie

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Deutsche Zusammenfassung	8
1.1	Einleitung	8
1.2	Material und Methoden	10
1.3	Ergebnisse	15
1.4	Diskussion	20
1.5	Zusammenfassung	22
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	23
2.	Veröffentlichung	27
3.	Erklärung zum Eigenanteil	28
4.	Danksagung	29
5.	Publikationsverzeichnis	30

Abkürzungsverzeichnis

Cas9	CRISPR-associated protein 9
CRIPSR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPF	Days post fertilisation, Tage nach Fertilisation
E3i3 MO	Exon 3 – Intron 3 Morpholino (Versuchstiergruppe)
EUROCAT	European surveillance of congenital anomalies, Europäische Studie zur Überwachung kongenitaler Fehlbildungen
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
KD	Knockdown
KO	Knockout
MO	Morpholino
MRT	Magnetresonanztomographie
<i>NGN1</i>	Neurogenin 1 (Genname)
RNA	Ribonukleinsäure
<i>SOX10</i>	SRY-related high mobility group box (Genname)
SSW	Schwangerschaftswoche
<i>TFAP2E</i>	Transcription factor activating protein 2 epsilon (Genname)
TB MO	Translation blocking Morpholino (Versuchstiergruppe)
<i>tfap2e</i> ^{+/-} KO ^{CRISPR}	<i>tfap2e</i> heterozygoter CRISPR knockout (Versuchstiergruppe)

tfap2e^{-/-} KO^{CRISPR}

tfap2e homozygoter CRISPR knockout (Versuchstiergruppe)

TOP

Termination of pregnancy, ärztlich durchgeführter Schwangerschaftsabbruch

ZNS

Zentrales Nervensystem

Nomenklatur

TFAP2E

Humanes Protein

TFAP2E

Humanes Gen

Tfap2e

Zebrafisch Protein

tfap2e

Zebrafisch Gen

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Angeborene Fehlbildungen des zentralen Nervensystems (ZNS) umfassen strukturelle Veränderungen des Gehirns und des Rückenmarks. Populationsbasierte, multizentrische beobachtende Erhebungen im Rahmen der EUROCAT-Studie erfassten für ZNS-Fehlbildungen im Geburtszeitraum 2005-2022 eine Prävalenz von 0,27 % in der europäischen Gesamtbevölkerung. Die Prävalenz bei Lebendgeburten betrug 0,13 %, die Hälfte (50,7 %) aller betroffenen Schwangerschaften wurden ärztlich abgebrochen (termination of pregnancy, TOP). Den größten Anteil der Fehlbildungen des ZNS machen Neuralrohrdefekte aus (38,9 %), gefolgt von Hydrozephalus (20,4 %) und schwerer Mikrozephalie (9,9 %) (Morris et al., 2019).

Eine weitere Unterform der ZNS-Fehlbildungen sind die sog. Neurokristopathien. Unter diesem Begriff werden Erkrankungen subsumiert, deren Pathogenese auf eine Fehlfunktion von Neuralleistenzellen zurückzuführen sind. Diese Neuralleistenzellen bilden eine Population multipotenter Zellen mit Ursprung am Rande der Neuralplatte. Durch ihr hohes Migrationspotential bilden sie die Grundlage vieler verschiedener Gewebetypen wie neuronale Glia, sensorische Neurone, Pigmentzellen, Knorpelzellen, glatte Muskelzellen und Zellen des kardialen Ausflusstrakts. Bei dem Auftreten von ZNS-Fehlbildungen gemeinsam mit heterogenen Fehlbildungen anderer Gewebetypen sollte daher an Neurokristopathien gedacht werden. Hierzu zählen Syndrome mit heterogenen Phänotypen, wie das CHARGE-Syndrom, das DiGeorge-Syndrom, der Morbus Hirschsprung, das PCWH-Syndrom oder das Branchio-oculo-faziale Syndrom (Mayor and Theveneau, 2013; York und McCauley, 2020).

Bei der Entstehung der ZNS-Fehlbildungen sind sowohl nicht-genetische als auch genetische Faktoren zu berücksichtigen: Zu ersteren zählen neben metabolischen Faktoren (insbesondere Mangel an Folsäure, Vitamin B12) und infektiösen Ursachen (u.a. Zytomegalievirus, Rubellavirus) auch weitere Umweltfaktoren. Genetische Ursachen erklären bisher etwa 36 % der ZNS-Fehlbildungen, hierzu zählen chromosomale Aberrationen (z.B. Patau-Syndrom), Strukturvarianten (Deletions- und

Duplikationssyndrome) und monogene Syndrome (Akula et al., 2023, Srivastata et al. 2019, Dworschak et al., 2021). Durch Fortschritte in der Identifikation bislang unbekannter genetischer Faktoren wird dieser Anteil noch erwartbar steigen. (Sakamoto et al., 2022). Die zunehmende Verfügbarkeit der Exom- und Genom-Sequenzierung im klinischen Alltag ermöglicht die Identifizierung genetischer Variationen in einer Vielzahl bekannter Krankheitsgene, aber auch in Genen, die bislang nicht mit humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden, sowie in Genen mit unbekannter Funktion. In den letzten beiden Fällen bleibt die Bedeutung der genetischen Varianten für den Phänotyp zunächst unklar. Die weitere Aufarbeitung der Expression und Funktion dieser Gene sowie der Einfluss der genetischen Varianten auf die korrekte Proteinfunktion mittels funktioneller Modelle ist essenziell zur Beurteilung der Pathogenität der Varianten.

Die vorliegende Studie basiert auf den Ergebnissen einer Trio-Exom-Analyse einer Familie mit einem betroffenen Fetus (Family D, Figure 4a). Dieser Fetus präsentierte sich im pränatalen Ultraschall der 31. Schwangerschaftswoche (SSW) mit einer Mikrolissenzephalie, einer Hypoplasie des Kleinhirns, fusionierten Seitenventrikeln, erweiterten äußeren Liquorräumen und einer Retrognathie. In der Magnetresonanztomographie (MRT) bestätigte sich dieser Befund, weiterhin stellten sich, charakteristisch für eine Mikrolissenzephalie, hypoplastische Basalganglien und ein ausgedünnter Hirnstamm dar (Table 1, Figure 4b-e). Die klinische Routinediagnostik umfasste neben dieser bildgebenden Verfahren eine maternale Infektionsserologie sowie eine fetale Blutentnahme zur Bestimmung des fetalen Blutbildes und einer Karyotypisierung. Diese Untersuchungen erbrachten einen unauffälligen Befund mit einem regelrechten, weiblichen Chromosomensatz (46, XX). Aufgrund der Schwere der Fehlbildungen erfolgte der ärztlich durchgeführte Schwangerschaftsabbruch. Im Rahmen einer Studie zur Detektion genetischer Ursachen angeborener Fehlbildungen erfolgte eine ES aus fetalem sowie elterlichem Blut.

1.1.1 Fragestellung und Zielsetzung

Auf Grundlage der Exom-Analyse der DNA der oben genannten Familie (Family D) identifizierten wir eine *de novo* Variante im Gen *TFAP2E* (*Transcription factor activating protein 2 epsilon*), welche in Datenbanken gesunder Kontrollen nicht beobachtet wurde (novel). Bisher wurde diesem Gen keine Bedeutung in der Entstehung von humanen

Fehlbildungen zugeschrieben. Seine Funktion als Transkriptionsfaktor in Neuralleistenzellen ist hingegen gut vorbeschrieben (Hong et al., 2014, van Otterloo et al., 2010).

Diese Dissertation hat zum Ziel, die Rolle von *TFAP2E* im Kontext von Neurokristopathien zu untersuchen. Hierzu erfolgte eine Re-Analyse von *TFAP2E* in ES-Datensätzen von Individuen mit Auffälligkeiten des ZNS, gefolgt von weiteren *in silico* Analysen der detektierten Varianten. Parallel erfolgte eine funktionelle Charakterisierung von *tfap2e* im Zebrafisch-Modell mittels verschiedener genetischer Manipulationen zur Beurteilung seiner embryologischen Funktion in der Entstehung von Neurokristopathien.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Exom-Sequenzierung in humanen Individuen

Der Fötus D-II:1 ist Teil einer Kohorte von 250 betroffenen Feten mit angeborenen ZNS-Fehlbildungen. In den untersuchten Feten wurde aus Nabelschnurblut DNA extrahiert und anschließend eine ES durchgeführt, um neue Kandidatenvarianten für ZNS-Fehlbildungen zu identifizieren. Die Exom-Daten wurden im Cologne Center of Genomics generiert und anschließend zur Analyse in der varbank2-pipeline zur Verfügung gestellt (<https://varbank.ccg.uni-koeln.de/varbank2/>). Ich filterte zunächst nach Varianten, die in bestehender Literatur und öffentlich zugänglichen Datenbanken als krankheitsverursachend vorbeschrieben wurden. Berücksichtigt wurden der bekannte Vererbungsmechanismus der entsprechenden Gene sowie die als pathogen bekannten Variationen (missense, nonsense oder frameshift Mutationen). Zusätzlich suchte ich nach loss-of-function (LoF) Varianten in Genen, die für die korrekte ZNS-Entwicklung notwendig sind. Diese Untersuchungen zeigten keine plausible genetische Erklärung, sodass ich im nächsten Schritt nach seltenen (Allelfrequenz <0.0001 in der öffentlich zugänglichen Datenbank gnomAD v2.1.1) oder *de novo* Varianten im Exom des Fetus gefiltert habe.

Hierdurch identifizierte ich eine zuvor nicht vorbeschriebene *de novo* missense Mutation in *TFAP2E* c.682C>T. Ich verglich die Konservierung dieser Position mit Orthologen von

TFAP2E in anderen Vertebraten (ben Chorin et al., 2020) und zog weitere *in silico* Vorhersageprogramme wie CADD (Combined Annotation Dependent Depletion, Rentzsch et al., 2021) zur Bewertung dieser Variante hinzu (Table 2).

In unserer Kohorte konnte ich keine weiteren Individuen mit Kandidaten-Varianten in *TFAP2E* identifizieren. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. J.R. Lupski (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA) untersuchte ich die Exom-Datensätze einer amerikanischen Kohorte von pädiatrischen Individuen mit neurologischen Entwicklungsstörungen nach *TFAP2E* Varianten. Bei diesen Individuen hatte die klinische Auswertung der Exom-Sequenzierungen zuvor keine Diagnose ergeben. Unter Anwendung der oben genannten Filterkriterien konnte ich vier weitere Individuen mit heterozygoten missense Varianten in *TFAP2E* und Hirnfehlbildungen und kraniofazialen Fehlbildungen identifizieren (Figure 4a, Table 1). In einer dieser Familien (Family B) gab es vier weitere ähnlich betroffene Familienmitglieder aus zwei Generationen. Zwei dieser betroffenen Familienmitglieder (B-I:2 und B-II:4) stellten uns DNA-Proben zur Verfügung, in denen ich mittels Sanger-Sequenzierung die *TFAP2E* Variante des Kindes B-III:1 wiederfand und somit die Vererbung der Variante in der Familie bestätigen konnte (Figure 4a).

Die detaillierten klinischen Fallbeschreibungen der untersuchten Individuen sind in der Supplementary Data 1 der Publikation beschrieben.

1.2.2 *In silico* Untersuchung der Auswirkung der missense Varianten auf die Proteinstruktur von *TFAP2E*

Zur besseren Beurteilung des Einflusses der in den betroffenen Individuen festgestellten Varianten auf das Protein *TFAP2E* führten unsere Kooperationspartner unter Leitung von Prof. Tikam Chand Dakal (Department of Biotechnology, Mohanlal Sukhadia University, Udaipur, Rajasthan, India) *in silico* Proteinmodellierungen der variantenbedingten Strukturveränderungen in *TFAP2E* durch (Table 3, Figure 4f, Supplementary Data 2). Hierzu wurde der RaptorX Web Server (<http://raptorx.uchicago.edu/ContactMap>) verwendet, welcher fünf mögliche Strukturveränderungen einer Variante vorhersagt. Anhand des geringsten mittleren Abweichungsquadrats (root mean squar deviation, RMSD) entschieden wir uns für die konservativste Vorhersage, die wir anschließend mit

der Chimera Software v.1.1.4 (Pettersen et al., 2004) modellierten (Figure 4e, Supplementary Data 1, Supplementary Data 9). Ergänzt habe ich diese Analyse durch ein *in silico* Vorhersageprogramm zur Einschätzung der Intoleranz bestimmter Proteinstrukturen für Variationen (Metadome Tolerance landscape, Wiel et al., 2019). Dieses Programm prognostiziert anhand bekannter Daten ähnlicher Proteine, wie tolerant eine bestimmte Proteinregion für Strukturveränderungen ist.

1.2.3 *In vivo* Untersuchung von *tfap2e* im Zebrafisch Modell

Um die Rolle von *TFAP2E* in der Entwicklung des ZNS sowie die Ursächlichkeit der *TFAP2E* Varianten für Hirn- und Kieferfehlbildungen weiter zu erforschen, führten wir im Zebrafisch (*Danio rerio*) funktionelle Untersuchungen durch. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der kodierenden Sequenz des menschlichen und tierischen Proteins *TFAP2E*/*Tfap2e* (Supplementary Data S3) eignet sich der Zebrafisch besonders gut als Modellorganismus. Im Allgemeinen bietet der Zebrafisch als Vertebratenmodell durch die *ex utero* Entwicklung seiner Nachzucht, der chemisch induzierbaren anhaltenden Transparenz in frühen Stadien sowie der einfachen genetischen Manipulation ideale Voraussetzungen zur *in vivo* Untersuchung embryologischer Anlagestörungen.

Die untersuchten Zebrafische entstammen den transgenen Linien *Tg(3.1ngn1:GFP)* und *Tg(sox10:mRFP)* sowie der Wildtyp Linie AB/TL und wurden in Einklang mit nationalen Richtlinien aufgezogen und gehalten. Nachkommen wurden mittels natürlicher Laiche gewonnen, die Aufzucht erfolgte in 28°C warmen Wasser in Tageszyklen von 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit.

Ziel der im Folgenden erläuterten Untersuchungen im Zebrafischmodell ist es, mit verschiedenen Manipulationen auf genomischer Ebene und Proteinebene die korrekte Funktion von *Tfap2e* einzuschränken und anhand morphologischer Analysen der Zebrafischlarven die Auswirkung auf die ZNS-Entwicklung zu beurteilen.

1.2.4 *In vivo* knockdown von *Tfap2e* im Zebrafisch

In einem ersten Schritt untersuchten wir das Zebrafisch-Gens *tfap2e* basierend auf knockdown Experimenten im Zebrafischmodell mittels Morpholinos® (MO) (Genetools, LLC). Hierbei handelt es sich um Antisense-Oligonukleotide, mit einer komplementär zur

gewünschten Zielregion entworfenen Basensequenz und einem Nuklease-resistenten Nukleotid-Rückgrat. Ich verwendete einen „translation blocking morpholino“ (TB MO, van Otterloo et al., 2010), welcher an das Start-Codon von *tfap2e* bindet und somit die Formation des ribosomalen Initiationskomplexes und folglich die Translation der mRNA verhindert. In einem parallelen Ansatz verwendete ich einen „splice blocking morpholino“ an der Bindestelle zwischen Exon 3 und Intron 3 (e3i3 MO, van Otterloo et al., 2010), welcher die korrekte Bindung des Splicosomes an die prä-mRNA verhindert und hierdurch zu einer Exklusion des Exon 3 aus der mRNA führt (Figure 1C). Dieses sogenannte „Exon-Skipping“ führt in diesem Fall zu einer Verschiebung des Leserasters und daraus folgend zu einem verfrühten Stopp-Codon. Die Verwendung von zwei MOs mit unterschiedlicher Zielregion und unterschiedlichem Wirkmechanismus hatte zum Ziel, die Spezifität des MO-Effekts besser beurteilen zu können. Die MOs injizierte ich im Ein- bis Zweizellstadium befruchteter Eier in den Dottersack.

1.2.5 *In vivo* Überexpression von *tfap2e* im Zebrafisch

Weiterhin induzierte ich die Überexpression von *tfap2e* im Zebrafisch durch Injektion humaner oder Zebrafisch-mRNA im Ein- oder Zweizellstadium. Hierzu transkribierte ich die mRNA *in vitro* mit dem mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Ultra Transcription Kit (ThermoFisher Invitrogen™, Katalog Nr. AM1340) aus einem pCMV-Sport6.1-basierten Vektor mit cDNA des humanen bzw. Zebrafisch Ortholog *TFAP2E/tfap2e*. Anschließend erfolgte das polyA-Tailing der mRNA und die Injektion der mRNA analog zu der MO-Injektion. Neben diesem Überexpressionsversuch koinjizierten wir die mRNA auch gemeinsam mit den MOs im Sinne eines Phänotyp-Rescue-Versuchs.

1.2.6 CRISPR/Cas9 vermittelter *tfap2e* knockout (KO) im Zebrafisch

Als weitere Methode, um die Funktion von *tfap2e* im Zebrafisch zu untersuchen, benutzten wir eine kommerziell erworbene Zebrafischlinie, in der mittels CRISPR/Cas9 das Gen *tfap2e* gezielt ausgeschaltet wurde. Bei CRISPR/Cas9 handelt es sich vereinfacht um eine sogenannte „Genschere“ aus zwei Komponenten: Eine RNA-Sequenz (guide RNA), die u.a. eine komplementäre Sequenz zu einem Abschnitt des Zielgens beinhaltet, in diesem Fall *tfap2e*. Hierdurch kann die guide RNA zielgenau an *tfap2e* binden. Ein anderer Abschnitt dieser guide RNA enthält eine Erkennungssequenz für die zweite

Komponente, das Cas9-Protein (CRISPR-associated protein). Das Cas9-Protein führt nun an der Bindungsstelle der guide RNA und *tfap2e* zu einem Doppelstrangbruch der DNA. Die zelleigenen DNA-Reperaturmechanismen dieses Bruchs können im Anschluss zu einer Mutation führen, die ein funktionsloses Allel herbeiführt, dies wird als KO bezeichnet. Wir untersuchten sowohl heterozygote KO (*tfap2e*^{+/-} KO^{CRISPR}) als auch homozygote KO-Larven (*tfap2e*^{-/-} KO^{CRISPR}), deren Genotypen ich mittels PCR und anschließendem Restriktionsverdau ermittelt habe (Supplementary Data 14).

Den Effekt dieser verschiedenen Manipulationen von *tfap2e* auf Gen- und Proteinebene evaluierten wir mithilfe eines Western Blots zur Bestimmung der Proteinkonzentration des Tfap2e und einer internen Kontrolle, der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh). Weiterhin führte ich in den e3i3 MO-injizierten Zebrafischlarven eine rt-PCR mit dem Ziel des Nachweises des Exonskippings des Exon 3 durch: Hierzu wurde die RNA der Zebrafische extrahiert, mithilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend die Region um das Exon 3 mittels PCR amplifiziert und sequenziert (Supplementary Data 7).

1.2.7 *In vivo* Mikroskopie des zentralen Nervensystems und Neuralleistenzellen nach *tfap2e* Depletion

Um den Einfluss der Manipulation von Tfap2e auf das Verhalten von Neuralleistenzellen zu untersuchen, nutzte ich zwei verschiedene transgene Zebrafischreporterlinien: *Tg(3.1ngn1:GFP)* und *Tg(sox10:mRFP)*, welche unter dem Promotor *ngn1* bzw. *sox10* ein grün bzw. rot fluoreszierendes Protein exprimieren. Hierdurch konnte ich das Gehirn (Figure 3), Spinalganglien und ihre Vorläuferzellen im Rückenmark (Figure 2a) und Knorpelzellen des Kiefers (Figure 2) darstellen. Mittels einer Alcian Blau Knorpelfärbung (Walker und Kimmel, 2007) konnte ich außerdem den Knorpel des Kiefers anfärben (Figure 2). Die Phänotypen untersuchte ich an Tag 2-3 nach Fertilisation (days post fertilisation, dpf). Um einen Hydrozephalus-Phänotypen zu detektieren, habe ich außerdem das rot fluoreszierende Sulforhodamine 101 intraventrikulär an 2 dpf injiziert (Lowery und Sive, 2005). Das anschließende *in vivo*-Imaging führte ich hauptsächlich an einem 2-Photonen-Laser-Scanning Mikroskop mit verstellbarem TiSa-Laser (Häberlein et al. 2022), einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop oder einem Fluoreszenz-Stereo-Mikroskop durch. Zur genaueren Darstellung der strukturellen Veränderungen habe ich

außerdem mit der IMARIS Software (Version 9.5.1., Oxford Instruments plc) eine 3D-Modellierung der z-stack-Aufnahmen des Zebrafisch-Gehirns erstellt, um hierdurch eine genaue Evaluierung einer Mikroenzephalie und eines Hydrozephalus vornehmen zu können (Supplementary Data 10-12).

1.2.8 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test, zweifacher oder einfacher Varianzanalyse (two-way/one-way ANOVA) mit Tukey's Mehrfachvergleich und Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Überlebensraten wurden mittels Kaplan-Meier-Überlebensanalyse und Mantel-Cox-Test analysiert. Für die Auswertungen wurde GraphPad Prism V9.0.0 verwendet.

1.2.9 Ethikvotum

Sämtliche Untersuchungen an Menschen erfolgten auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und nach Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn (IRB Lfd. Nr. 208/08). Sämtliche durchgeführten Untersuchungen an Tieren sind in Einklang mit der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere und dem nationalen Tierschutzgesetz (§11). Nationale Gesetzgebung exkludiert die experimentellen Untersuchungen am Zebrafisch im Larvenstadium bis 5 dpf von der Notwendigkeit eines Ethikvotums.

1.3 Ergebnisse

Insgesamt identifizierte ich in den oben genannten Kohorten sieben betroffene Individuen aus fünf Familien mit ultra-seltenen oder novel, monoallelischen Varianten in *TFAP2E*. Dabei handelte es sich in allen Fällen um missense Varianten, die zum Teil in konservierten, funktionellen Regionen des Proteins liegen (C-II:1, D-II:1, E-II:1; Figure 1A). Für die anderen zwei missense Varianten (A-II:1, Family B) war eine Konservierung nicht unmittelbar ersichtlich (Table 2).

Davon zeigten fünf Individuen Auffälligkeiten im ZNS und bei vier Individuen lag ein Hydrozephalus vor. Weitere beobachtete Phänotypen des ZNS umfassen

Neuralrohrdefekte, Holoprosenzephalien und Gyrierungsstörungen (Tab. 1, Abb.1). Bei zwei von fünf Individuen zeigte sich eine neurologische Entwicklungsverzögerung (A-II:1, C-II:1), bei einem Individuum wurde intrauterin eine TOP durchgeführt (D-II:1), ein Individuum ist kurz nach Geburt verstorben (E-II:1). Alle Individuen zeigten kraniofaziale Auffälligkeiten. Sechs der sieben untersuchten Individuen präsentierten sich mit Kieferfehlbildungen. Bemerkenswerterweise zeigte sich in der Familie B eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte in allen drei untersuchten Individuen B-I:2, B-II:4, B-III:1. Weitere beobachtete Phänotypen sind in Tabelle 1 der Publikation aufgelistet, eine detaillierte Beschreibung der klinischen Kasuistik ist im Supplementary Data 1 beschrieben.

Tabelle 1: Diagnostizierte Phänotypen der untersuchten humanen Individuen mit monoallelischen Varianten in *TFAP2E* (Abgeleitet von Table 1 der Originalpublikation).

	Phänotyp	A-II:1	B-I:2	B-II:4	B-III:1	C-II:1	D-II:1	E-II:1
	Hydrozephalus	+			+		+	+
ZNS	Chiari II Malformation	+						
	Agenesie Corpus Callosum	+						
	Myelomeningocele	+						
	Thalamusläsion					+		
	Mikrolissenzephalie						+	
	Hypoplastisches Zerebellum						+	
	Hypoplastische Basalganglien						+	
	Dünner Hirnstamm						+	
	Alobare Holoprosenzephalie							+
Neurologische Auffälligkeiten	Intelligenzminderung	+				+	n/a	n/a
	Hypotonie	+					n/a	n/a
	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom					+	n/a	n/a
Kiefer-Auffälligkeiten	Retro-/Mikrognathie	+			+		+	
	Lippen-Kiefer-Gaumenspalte		+	+	+			+

Die Modellierungen der dreidimensionalen Struktur des *TFAP2E* auf Grundlage der Referenzsequenz sowie den jeweiligen Varianten der untersuchten Individuen zeigte,

dass benachbarte Proteinregionen durch Polaritätsveränderungen beeinträchtigt werden (Supplementary Data 5-6). Diese benachbarten Proteinregionen habe ich mittels der Metadome Protein Tolerance Landscape weiter untersucht: Hierbei zeigte sich eine hohe Intoleranz, was auf eine Funktionseinschränkung des Proteins hinweisen kann (Figure 1G) (Ashenberg et al., 2013; Lal et al., 2020).

Um die embryologische Funktion von *TFAP2E* zu analysieren und eine Kausalität zwischen den humangenetischen *TFAP2E* Varianten und den beobachteten Phänotypen zu etablieren, untersuchte ich die embryologische Funktion von *tfap2e* im Zebrafisch.

Das Zebrafischprotein Tfap2e zeigt eine Homologie von 77 % im Vergleich zum humanen TFAP2E (Supplementary Data 10). Ich untersuchte zunächst den Expressionszeitpunkt von Tfap2e. Vorherige Studien haben bereits die Transkription von *tfap2e* mRNA vor 1 dpf gezeigt. Auf Proteinebene konnte ich darstellen, dass von 0 - 2 dpf eine sehr geringe Proteinexpression stattfindet. Zwischen 2 - 3 dpf zeigt sich hingegen ein deutlicher Anstieg der Tfap2e Proteinexpression.

Im nächsten Schritt veränderte ich in Zebrafisch-Larven mit verschiedenen Methoden die Expression von Tfap2e. Zum einen schalteten wir auf genomischer Ebene mittels CRISPR/Cas9 das *tfap2e* Gen aus (*tfap2e*^{-/-} KO^{CRISPR}). In einer anderen Gruppe beeinflussten wir auf der Ebene der prä-mRNA das korrekte Splicing und verursachten dadurch ein verkürztes Tfap2e Protein (e3i3 MO). In einer weiteren Gruppe unterdrückten wir die Translation der *tfap2e* mRNA (TB MO). Außerdem führten wir durch Injektion von humaner *TFAP2E* mRNA oder Zebrafisch *tfap2e* mRNA eine Überexpression durch. Ausgenommen der *tfap2e*^{-/-} KO^{CRISPR} Gruppe zeigte sich in allen Gruppen eine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen (Supplementary Data 14, Figure 2F). Ein Phänotyp-Rescue-Versuch in der MO-Gruppe zeigte keine Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit. Interessanterweise konnten wir für den TB MO zeigen, dass sich einhergehend mit der zunehmenden Tfap2e Expression nach 3 dpf ein vermehrtes Versterben der Larven zeigt (Figure 2F).

Lichtmikroskopisch zeigten sich phänotypisch in allen untersuchten Gruppen eine reduzierte Pigmentierung, eine Mikrozephalie und eine Skoliose. Diese Phänotypen zeigten, abhängig von der Methode der genetischen Manipulation, eine Penetranz von 25

- 75 %. Die höchste Penetranz zeigte sich in der TB MO Gruppe. Zur genaueren funktionellen Charakterisierung untersuchte ich das ZNS der Zebrafische anhand von fluoreszierenden neuronalen Zebrafisch-Reporterlinien. Hierbei zeigten sich in allen untersuchten Gruppen ein Hydrozephalus als führendes Merkmal ($p < 0,0001$; Figure 4A-E, Supplementary Data 14). Interessanterweise spiegelt der Hydrozephalus auch den humanen Phänotypen wider. Darüber hinaus führte ich eine 3D-Modellierung der Zebrafisch-Gehirne durch. Dadurch konnte ich zeigen, dass im Rahmen der gestörten *Tfap2e* Expression eine Reduktion des Hirnvolumens, also einer Mikroenzephalie, verursacht wurde ($p < 0,0001$; Abb.1, Supplementary Data 13).

Des Weiteren untersuchte ich gezielt Neuralleisten-spezifisches Gewebe anhand von *ngn1*- und *sox10*-Reporterlinien (Okeke et al. 2022; Stegmann et al. 2024). Ich konnte zeigen, dass es durch die unterdrückte Expression von *tfap2e* im Rückenmark sowohl zu einer signifikanten Reduktion von Spinalganglien als auch deren Axone gekommen ist ($p < 0,0001$; Figure 3F-G). Zusätzlich untersuchte ich die Kieferentwicklung und konnte feststellen, dass es zu einer Störung *sox10*-exprimierender Zellen und dadurch zu schweren Kieferdeformitäten kommt (Abb.1, Figure 3A-E). Die Länge des Unterkiefers reduzierte sich im Schnitt um 40 % (Figure 3C-E).

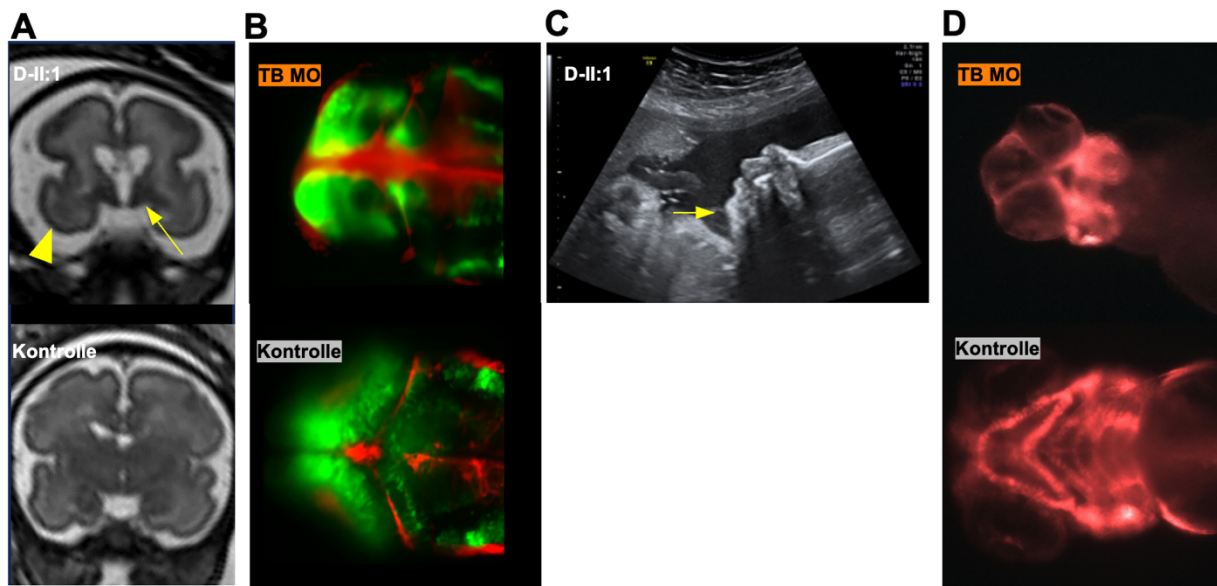


Abbildung 1: Darstellung der TFAP2E-assoziierten Phänotypen im Menschen und Zebrafisch, adaptiert nach Figures 1, 3 und 4 der Originalpublikation

A: Fetales MRT des Individuums D-II:1 im Vergleich zu einer altersentsprechenden Kontrolle. Es zeigt sich eine Mikrolissenzephalie (gelber Pfeilkopf) sowie hypotrophe Basalganglien (gelber Pfeil).

B: Dorsale Ansicht von 2 Tage alten Zebrafischlarvengehirnen der *Tg(3.1ngn1:GFP)* Zebrafischreporterlinie. Ngn1-exprimierende Zellen fluoreszieren grün. Zur Darstellung der Liquorräume wurde rot fluoreszierendes Sulforhodamin intraventrikulär injiziert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich in der TB MO Gruppe eine Reduktion des Hirnvolumens sowie erweiterte innere Liquorräume.

C: Pränataler Ultraschall des Individuums D-II:1. Es zeigt sich eine Mikrognathie (gelber Pfeil).

D: Ventrale Ansicht der kraniofazialen Region von 3 Tage alten Zebrafischlarven der *Tg(sox10:mRFP)* Zebrafischreporterlinie. Sox10-exprimierende Zellen fluoreszieren rot. Es zeigt sich eine deutliche Hypoplasie in der TB MO Gruppe im Vergleich zu Kontrollen.

1.4 Diskussion

TFAP2E wird in dieser Studie erstmals im Kontext einer angeborenen Fehlbildung beschrieben. Die bisherige Datenlage hinsichtlich der embryologischen Funktion von *TFAP2E* ist nur gering und beschränkt sich auf Expressionsanalysen im Zebrafisch und Krallenfrosch (van Otterloo et al., 2010; Hong et al., 2014). Diese Studien setzten *tfap2e* in Verbindung mit korrekter Differenzierung pigmentbildender Zellen sowie mit der korrekten Anlage der Neuralplatte. Ich konnte erstmals zeigen, welche Auswirkung die Depletion von *tfap2e* auf das sich aus der Neuralplatte entwickelte Nervensystem des Zebrafischs hat. Hierzu veranschaulichen die durch mich erstellten dreidimensionalen Modellierungen der Zebrafischgehirne die strukturellen Veränderungen des ZNS nach Depletion von *tfap2e* (Supplementary Videos 1-3): Es zeigte sich sowohl ein Hydrozephalus als auch eine Mikrozephalie aller untersuchter Versuchs-Gruppen im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle. Die Ausprägung des Phänotyps unterschied sich jedoch zwischen den Gruppen: In der *tfap2e*^{-/-} KO^{CRISPR} Gruppe zeigte sich ein deutlich milderer Phänotyp als in den MO-Gruppen. Bei Manipulation auf genomischer Ebene ist dies jedoch ein häufig beobachtetes Phänomen, da durch die hieraus resultierende funktionslose mRNA genomische Kompensationsmechanismen aktiviert werden können (Rossi et al., 2015). Bei Blockierung des korrekten Splicings (e3i3 MO) oder der Translation (TB MO) entfällt die Möglichkeit dieses Kompensationsmechanismus, wodurch es zu einer stärkeren Expression des Phänotyps kommen kann. Andererseits sind bei MO-Experimenten unspezifische Dysregulationen wie z.B. pro-apoptotische Mechanismen beschrieben (Cunningham et al., 2020; Lai et al. 2019; Robu et al., 2007). Aufgrund dessen sind beide Methoden in Kombination bzw. im Vergleich zur validen Beurteilung des *tfap2e*-spezifischen Effekts notwendig. Ergänzend sollte bei MO-Einsatz versucht werden, den provozierten Phänotyp mittels Injektion von Wildtyp mRNA umzukehren (Phänotyp Rescue). Dies zeigte sich in diesem Fall jedoch erfolglos. Wir stellten die Hypothese auf, dass die enge zeitliche Regulation von *tfap2e* mit geringen Expressionsspiegeln an 0-2 dpf und einer signifikanten Hochregulation der Expression an 3 dpf nicht durch eine kumulative mRNA-Injektion im 1- oder 2-Zellsatidium widerzuspiegeln ist. Mit dieser Hypothese vereinbar zeigte sich zum einen die mittels Western Blot nachgewiesene dynamische Expression von Tfpap2e (Figure 2A). Außerdem

zeigte sich ein dosis-abhängiger Phänotyp bei kumulativ niedriger oder höherer mRNA-Dosierung, beispielsweise in der TB MO + mRNA-Gruppe (Figure 2E).

Neben diesen erstmals beschriebenen Auffälligkeiten des ZNS konnte ich auch einen *tfap2e*-abhängigen Phänotyp in Neuralleistenzellen beobachten. *Sox10* exprimierende Knorpelzellen zeigten in der Kieferregion eine eingeschränkte Funktion mit schweren Kieferfehlbildungen (Figure 3A). *Ngn1*-positive Spinalganglien (dorsal root ganglia, DRG), welche aus einer Subpopulation von Neuralleistenzellen entstehen, sind von einem *tfap2e* KD in ähnlicher Weise betroffen wie durch einen *sox10* KD (Carney et al., 2006). *Tfap2e* scheint daher in dieses Regulationsnetzwerk mit eingebunden zu sein und in ähnlicher Weise Auswirkungen wie *sox10* auf *ngn1*-exprimierende Zellen zu haben (Figure 3F-G). Die Hierarchie und die genaue Interaktion zwischen diesen 3 Transkriptionsfaktoren muss in künftigen Studien jedoch weiter untersucht werden.

Die in dieser Studie untersuchten humanen Individuen zeigen einen Phänotyp, den wir im Zebrafischmodell nach *tfap2e* Depletion sehr ähnlich reproduzieren konnten. Die embryologische Funktion und meine funktionellen Beobachtungen zu *tfap2e* legen nahe, dass es sich bei dem humanen Phänotyp um eine Neurokristopathie handelt. Die hier untersuchten Individuen präsentieren sich in einem phänotypischen Spektrum, dass mit dieser Hypothese vereinbar ist: Hierzu gehören die in Tabelle 1 genannten kraniofazialen Auffälligkeiten, neurologische Entwicklungsverzögerungen sowie strukturelle ZNS-Fehlbildungen wie eine Myelomeningocele (Lombardo et al., 2018, Inoue et al., 2004). Weitere typische Phänotypen einer Neurokristopathie wie Pigmentierungsdefekte oder Hörstörungen wurden nicht in unserem Patientenkollektiv beobachtet (Pilon, 2021). Einschränkend muss jedoch bemerkt werden, dass zwei Individuen aufgrund von TOP bzw. frühem Versterben dahingehend nicht beurteilt werden konnten. Interessanterweise ist das Paralog *TFAP2A* ein bekanntes Krankheitsgen für das Branchio-oculo-faziale Syndrom, das ebenfalls den Neurokristopathien zugeordnet wird (Milunsky et al., 2008, Bennaceur et al., 2019). Die redundante Funktion der *TFAP2*-Paraloge ist mehrfach beschrieben und unterstützt daher unsere oben genannte Hypothese (Li und Cornell, 2007). Zukünftige Individuen, in denen ein *TFAP2E*-assoziiertes Syndrom vermutet wird, sollten daher auf phänotypische Merkmale im Spektrum der Neurokristopathien genau untersucht werden.

Die humangenetischen Daten zeigen insbesondere aufgrund der Segregation der Variante c.337C>A in der Multiplex-Familie B sowie der *de novo* Variante c.682C>T in Familie D auf eine krankheitsverursachende Rolle von *TFAP2E*. Die missense Varianten sind in konservierten Regionen oder in struktureller Lagebeziehung zu Regionen mit wenig Toleranz für Strukturveränderungen lokalisiert (Figure 1F-G und Supplementary Data 10). Dies ist als Hinweis auf eine Pathogenität der Varianten zu sehen (Assis und Kondrashov, 2014). Der zugrundeliegende Mechanismus der genetischen Varianten muss jedoch weiterhin untersucht werden. Populationsbasierte Daten zeigen eine Toleranz des Gens für Loss of function Varianten ($pLi=0$; www.gnomad.broadinstitute.org), sodass die im Zebrafisch beobachteten Effekte nach Depletion von *tfap2e* nur beschränkt auf den Menschen übertragbar scheinen (Ziegler et al., 2019). Transkriptionsfaktoren der AP-2 Familie (*TFAP2A-C*) bilden bekanntermaßen Homodimere miteinander oder Heterodimere mit anderen AP-2 Proteinen (Rothstein und Simoes-Costa, 2020). Zumindest für die im Individuum E-II:1 beobachtete Variante in der Dimerisierungsdomäne wäre eine Störung dieser Dimerisierung ein naheliegender Mechanismus. Ein dominant negativer Effekt wäre in diesem Fall denkbar. Eine abschließende Beurteilung der einzelnen Varianten ist jedoch nur mit weiterer funktioneller Aufarbeitung möglich. Möglicherweise sind dafür auch andere Modellsysteme notwendig, wie zum Beispiel humane Zellen oder Mausmodelle.

Es ist noch unklar, welche genomischen Ziele *TFAP2E* als Transkriptionsfaktor hat. Diese Untersuchungen sind noch notwendig, um *TFAP2E* abschließend als Krankheitsgen zu etablieren. Die Detektion *TFAP2E*-regulierter Gene und möglicher Bindungspartner könnten therapeutische Ziele für die Behandlung dieses mutmaßlich neuen Syndroms ergeben.

1.5 Zusammenfassung

Die Ätiologie der Fehlbildungen des zentralen Nervensystems (ZNS) umfasst sowohl nicht-genetische als auch genetische Ursachen. Ziel der Arbeit war, *TFAP2E* als Kandidatengen für Neurokristopathien funktionell zu charakterisieren. Im Rahmen dieser

Studie konnte ich in 7 Individuen aus fünf Familien, monoallelische missense Varianten im Gen *TFAP2E* identifizieren. Dieses Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, dem bisher keine embryologische Funktion im Menschen zugeschrieben wurde. Die untersuchten Individuen zeigten Fehlbildungen aus dem Spektrum der Neurokristopathien: In 5/7 Individuen zeigten sich strukturelle Hirnfehlbildungen, in 6/7 Individuen zeigten sich Kieferfehlbildungen. Die genetischen Varianten sind in populationsbasierten Datenbanken als sehr selten oder nicht bekannt beschrieben. In den durchgeführten *in silico* Analysen zeigte sich mittels Proteinmodellierungen potenziell funktionseinschränkende Veränderungen der dreidimensionalen Struktur in konservierten Proteinregionen. Die embryologische Funktion von *tfap2e* sowie die Folgen der Depletion von *tfap2e* untersuchten wir in Zebrafischlarven mittels Morpholino knockdown, CRISPR-Cas9 knockout und Überexpressionsanalysen. Hierbei zeigte sich, dass die regelrechte Funktion von Neuralleistenzellen und neuronalen Zellpopulationen eingeschränkt wird und es hierdurch zu Fehlbildungen des ZNS und der kraniofazialen Strukturen kommt. Somit konnte der Phänotyp der untersuchten Individuen im Zebrafisch sehr nah repliziert werden. Diese Studie ist die erste Studie, die *TFAP2E* als mutmaßliches Krankheitsgen für Neurokristopathien beschreibt. Durch diese Studie können nun weitere Individuen mit monoallelischen Varianten in *TFAP2E* und ähnlichem Phänotyp identifiziert werden.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Ashenberg O, Gong LI, Bloom JD. Mutational effects on stability are largely conserved during protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(52):21071-6.

Assis R, Kondrashov AS. Conserved proteins are fragile. *Mol Biol Evol*. 2014; 31(2):419-24.

Ben Chorin A, Masrati G, Kessel A, Narunsky A, Sprinzak J, Lahav S, Ashkenazy H, Ben-Tal N. ConSurf-DB: An accessible repository for the evolutionary conservation patterns of the majority of PDB proteins. *Protein Sci*. 2020; 29(1):258-267.

Bennaceur S, Buisson T, Bertolus C, Couly G. Branchio-oculo-facial syndrome with cleft lip and bilateral dermal thymus. *Cleft Palate Craniofac J*. 1998;35(5):454-9.

Cunningham CM, Bellipanni G, Habas R, Balciunas D. Deletion of morpholino binding sites (DeMOBS) to assess specificity of morphant phenotypes. *Sci Rep.* 2020; 10(1):15366.

Dworschak GC, Punetha J, Kalanithy JC, ..., Reutter H. Biallelic and monoallelic variants in *PLXNA1* are implicated in a novel neurodevelopmental disorder with variable cerebral and eye anomalies. *Genet Med.* 2021; 23(9):1715-1725.

Häberlein F, Mingardo E, Merten N, ..., Gomeza J. Humanized zebrafish as a tractable tool for in vivo evaluation of pro-myelinating drugs. *Cell Chem Biol.* 2022; 29(10):1541-1555.e7.

Hong CS, Devotta A, Lee YH, Park BY, Saint-Jeannet JP. Transcription factor AP2 epsilon (*Tfap2e*) regulates neural crest specification in *Xenopus*. *Dev Neurobiol.* 2014; 74(9):894-906.

Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S, Wilson J, Reggin JD, Mancias P, Butler IJ, Wilkinson MF, Wegner M, Lupski JR. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet.* 2004; 36(4):361-9.

Lai JKH, Gagalova KK, Kuenne C, El-Brolosy MA, Stainier DYR. Induction of interferon-stimulated genes and cellular stress pathways by morpholinos in zebrafish. *Dev Biol.* 2019; 454(1):21-28.

Lal D, May P, Perez-Palma E, ..., Daly MJ. Gene family information facilitates variant interpretation and identification of disease-associated genes in neurodevelopmental disorders. *Genome Med.* 2020; 12(1):28.

Li W, Cornell RA. Redundant activities of *Tfap2a* and *Tfap2c* are required for neural crest induction and development of other non-neural ectoderm derivatives in zebrafish embryos. *Dev Biol.* 2007; 304(1):338-54.

Lowery LA, Sive H. Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the *nagie oko* and *snakehead/atp1a1a.1* gene products. *Development.* 2005; 132(9):2057-67.

Mayor R, Theveneau E. The neural crest. *Development*. 2013; 140(11):2247-51.

Milunsky JM, Maher TA, Zhao G, Roberts AE, Stalker HJ, Zori RT, Burch MN, Clemens M, Mulliken JB, Smith R, Lin AE. TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008; 82(5):1171-7.

Morris JK, Wellesley DG, Barisic I, ..., Garne E. Epidemiology of congenital cerebral anomalies in Europe: a multicentre, population-based EUROCAT study. *Arch Dis Child*. 2019; 104(12):1181-1187.

Okeke C, Paulding D, Riedel A, Paudel S, Phelan C, Teng CS, Barske L. Control of cranial ectomesenchyme fate by Nr2f nuclear receptors. *Development*. 2022; 149(23):dev201133.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004; 25(13):1605-12.

Pilon N. Treatment and Prevention of Neurocristopathies. *Trends Mol Med*. 2021; 27(5):451-468.

Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med*. 2021; 13(1):31.

Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, Ekker SC. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet*. 2007; 3(5):e78.

Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Stainier DY. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015 524(7564):230-3.

Rothstein M, Simoes-Costa M. Heterodimerization of TFAP2 pioneer factors drives epigenomic remodeling during neural crest specification. *Genome Res*. 2020; 30(1):35-48.

Sakamoto M, Fukuda H, Ohori S, ..., Matsumoto N. Large-scale discovery of novel neurodevelopmental disorder-related genes through a unified analysis of single-nucleotide and copy number variants. *Genome Med.* 2022; 14(1):40.

Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, ..., Miller DT; NDD Exome Scoping Review Work Group. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med.* 2019; 21(11):2413-2421.

Stegmann JD, Kalanithy JC, Dworschak GC, ..., Hilger AC. Bi-allelic variants in CELSR3 are implicated in central nervous system and urinary tract anomalies. *NPJ Genom Med.* 2024; 9(1):18.

Van Otterloo E, Li W, Bonde G, Day KM, Hsu MY, Cornell RA. Differentiation of zebrafish melanophores depends on transcription factors AP2 alpha and AP2 epsilon. *PLoS Genet.* 2010; 6(9):e1001122.

Walker MB, Kimmel CB. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech Histochem.* 2007; 82(1):23-8.

Wiel L, Baakman C, Gilissen D, Veltman JA, Vriend G, Gilissen C. MetaDome: Pathogenicity analysis of genetic variants through aggregation of homologous human protein domains. *Hum Mutat.* 2019; 40(8):1030-1038.

York JR, McCauley DW. The origin and evolution of vertebrate neural crest cells. *Open Biol.* 2020; 10(1):190285.

Ziegler A, Colin E, Goudenège D, Bonneau D. A snapshot of some pLI score pitfalls. *Hum Mutat.* 2019; 40(7):839-841.

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Kalanithy JC, Mingardo E, Stegmann JD, Dhakar R, Dakal TC, Rosenfeld JA, Tan WH, Coury SA, Woerner AC, Sebastian J, Levy PA, Fleming LR, Waffenschmidt L, Lindenberg TT, Yilmaz Ö, Channab K, Babra BK, Christ A, Eiberger B, Hölzel S, Vidic C, Häberlein F, Ishorst N, Rodriguez-Gatica JE, Pezeshkpoor B, Kupczyk PA, Vanakker OM, Loddo S, Novelli A, Dentici ML, Becker A, Thiele H, Posey JE, Lupski JR, Hilger AC, Reutter HM, Merz WM, Dworschak GC, Odermatt B. *TFAP2E* is implicated in central nervous system, orofacial and maxillofacial anomalies. *J Med Genet.* 2025 Jan 27;62(2):126-137.

<https://doi.org/10.1136/jmg-2023-109799>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Humangenetik und im Institut für Neuroanatomie unter Betreuung von Prof. Dr. Heiko Reutter und Prof. Dr. Benjamin Odermatt durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Heiko Reutter und Prof. Dr. Benjamin Odermatt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Waltraut Merz, Dr. Gabriel Dworschak und mir. Sämtliche Daten wurden hauptsächlich durch mich mit Unterstützung der folgenden Co-Autoren erhoben: Dr. Enrico Mingardo, Dr. Jil Stegmann, Lea Waffenschmidt, Tobias Lindenberg, Öznur Yilmaz, Khadija Channab, Bimaljeet Babra, Andrea Christ, Dr. Britta Eiberger, Selina Hölzel, Dr. Clara Vidic, Dr. Felix Häberlein, Dr. Nina Ishorst, Dr. Juan Rodriguez-Gatica, Dr. Behnaz Pezeshkpoor, Prof. Albert Becker, Prof. Holger Thiele, , Dr. Gabriel Dworschak und Prof. Benjamin Odermatt.

Die Proteinmodellierungen wurden durch Dr. Ramgopal Dakar und Dr. Tikam Dakal durchgeführt und gemeinsam mit mir interpretiert.

Die Rekrutierung der untersuchten Patienten erfolgte durch Dr. Jill Rosenfeld, Dr. Wen-Hann Tan, Dr. Stephanie Coury, Dr. Audrey Woerner, Dr. Jessica Sebastian, Dr. Paul Levy, Dr. Leah Fleming, Dr. Patrick Kupczyk, Dr. Olivier Vanakker, Dr. Sara Loddo, Dr. Antonio Novelli, Dr. Maria Dentici, Prof. Jennifer Posey, Prof. James Lupski, Dr. Alina Hilger, Prof. Heiko Reutter und Prof. Waltraut Merz.

Die Auswertung der Daten erfolgte hauptsächlich durch mich gemeinsam mit Dr. Gabriel Dworschak, Prof. Benjamin Odermatt und Prof. Heiko Reutter.

Die Interpretation der Daten erfolgte hauptsächlich durch mich gemeinsam mit Prof. Jennifer Posey, Prof. James Lupski, Dr. Gabriel Dworschak, Prof. Benjamin Odermatt und Prof. Heiko Reutter.

Die Untersuchungen am Zebrafisch wurden hauptsächlich durch mich durchgeführt und durch die Zebrafisch Core Facility des Universitätsklinikum Bonn unterstützt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank an Prof. Dr. Heiko Reutter, Prof. Dr. Benjamin Odermatt und Dr. Gabriel Dworschak für die exzellente Betreuung meiner Promotionsarbeit. Ihnen verdanke ich, dass trotz des mühsamen Weges meine Faszination für die Forschung nachhaltig geweckt wurde. Sie werden mir in meinem weiteren Karriereweg stets ein Vorbild für respektvolle und freundschaftliche Zusammenarbeit sein.

Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie im humangenetischen und anatomischen Institut für die großartige Zusammenarbeit. Sie haben ein Arbeitsklima geschaffen, durch das jeder Arbeitstag mich mit Freude erfüllt hat. Im Besonderen möchte ich mich bei Dr. Alina Hilger, Dr. Enrico Mingardo, Dr. Luca Schierbaum, Dr. Ricarda Köllges, Dr. Jil Stegmann, Dr. Sophia Schneider, Tobias Lindenberg, Selina Hölzel und Öznur Yilmaz bedanken. Außerdem danke ich meinen Freundinnen und Freunden für ihre vielfältige Unterstützung.

Ich danke der BONFOR-Forschungskommission und dem Else-Kröner-Forschungskolleg für die finanzielle Förderung meiner Promotionsarbeit.

Außerdem möchte ich den Patientinnen und Patienten sowie ihren Familien für Ihre Unterstützung dieses Forschungsprojekts danken. Ich danke Prof. Waltraut Merz, dass sie unserer Arbeitsgruppe die mühsam gesammelten Patientenproben für unsere Forschung zur Verfügung stellt.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Rasalingam Kalanithy und Silvia Kalanithy, und meinem Bruder Jonathan Kalanithy für die beständige Unterstützung über Schule, Studium und Promotion hinweg. Ohne Ihren Rückhalt wäre mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen.

5. Publikationsverzeichnis (2020-02/2025):

Kalanithy JC*, Mingardo E, Stegmann JD, et al. TFAP2E is implicated in central nervous system, orofacial and maxillofacial anomalies. *J Med Genet.* 2025;62(2):126-137. Published 2025 Jan 27. doi:10.1136/jmg-2023-109799

Mingardo E, **Kalanithy JC**, Dworschak G, et al. EZH2 specifically regulates ISL1 during embryonic urinary tract formation. *Sci Rep.* 2024;14(1):22909. Published 2024 Oct 2. doi:10.1038/s41598-024-74303-w

Ishorst N, Hölzel S, Greve C, ...**Kalanithy JC**, et al. Role of ZFHX4 in orofacial clefting based on human genetic data and zebrafish models. *Eur J Hum Genet.* Published online December 19, 2024. doi:10.1038/s41431-024-01775-9

Stegmann JD*, **Kalanithy JC***, Dworschak GC, et al. Bi-allelic variants in CELSR3 are implicated in central nervous system and urinary tract anomalies. *NPJ Genom Med.* 2024;9(1):18. Published 2024 Mar 1. doi:10.1038/s41525-024-00398-9

Schneider S, Köllges R, Stegmann JD, ...**Kalanithy JC**, et al. Resequencing of VEGFR3 pathway genes implicate GJC2 and FLT4 in the formation of primary congenital chylothorax. *Am J Med Genet A.* 2022;188(5):1607-1611. doi:10.1002/ajmg.a.62643

Dworschak GC, Punetha J, **Kalanithy JC**, et al. Biallelic and monoallelic variants in PLXNA1 are implicated in a novel neurodevelopmental disorder with variable cerebral and eye anomalies. *Genet Med.* 2021;23(9):1715-1725. doi:10.1038/s41436-021-01196-9

Turan F, Yilmaz Ö, Schünemann L, ...**Kalanithy JC**, et al. Effect of modulating glutamate signaling on myelinating oligodendrocytes and their development-A study in the zebrafish model. *J Neurosci Res.* 2021;99(11):2774-2792. doi:10.1002/jnr.24940

Zhang R, Gehlen J, Kawalia A, ...**Kalanithy J**, et al. Human exome and mouse embryonic expression data implicate ZFHX3, TRPS1, and CHD7 in human esophageal atresia. *PLoS One.* 2020;15(6):e0234246. Published 2020 Jun 5. doi:10.1371/journal.pone.0234246