

The human genome is organised in topologically associating domains, or TADs, which are considered to be insulated regulatory units containing genes and associated cis-regulatory regions. TADs are delimited by boundaries, which isolate each TAD from their neighbours. Human structural variations (SVs), such as inversions, deletions, or duplications have been shown to cause a large variety of diseases. However, the effect of SVs interfering with TADs and boundary integrity had yet to be studied in detail prior to our investigation.

Here, we studied the pathomechanism of such rearrangements affecting the *WNT6/IHH/EPHA4/PAX3* locus, a region associated with congenital human limb malformation. Until now the modelling of these rearrangements in mice was time consuming, due to the laborious nature of previous genome targeting technologies. Here, we developed a fast method to obtain mouse models with the desired SV within 10 weeks by using the CRISPR/Cas9 technology. Megabase-wide genetic rearrangements were produced in mouse embryonic stem cells, which were subsequently used to produce transgenic animals via morula aggregation.

To study the outcome of rearrangements affecting TAD integrity, limb buds from mouse mutants were analysed using 4C-seq. In three different disease models, we detected ectopic interactions between a normally insulated set of enhancers and three different genes respectively. The gain of interactions resulted in the ectopic expression of the three genes in distal limbs. These effects were only observed in rearrangements disrupting associated boundary elements containing CTCF binding sites. This study shows the role of TADs as a gene regulation unit, and produces a framework for interpreting structural variations pathogenicity.

Das menschliche Genom ist unterteilt in topologisch assoziierte Domänen oder sogenannte TADs, die als isolierte, regulatorische Einheiten angesehen werden. TADs sind durch Sequenzen von mehreren hundert Basenpaaren Länge separiert, die daher als Grenzen bezeichnet werden. Der dieser Grenzfunktion zu Grunde liegende Mechanismus ist allerdings noch kaum untersucht. Was man aber weiß ist, dass zwei aufeinanderfolgenden Grenzen in physischen Kontakt stehen. Dieser Grenzkontakt verhindert, dass Gene und die dazugehörigen *cis*-regulatorischen Elemente in einer TAD in den Einfluss von regulatorischen Elementen benachbarter TADs geraten.

Es wurde gezeigt, dass humane strukturelle Variationen, wie Inversionen, Deletionen oder Duplikationen zu einer großen Anzahl von Erkrankungen führen. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung struktureller Variationen und ihre Auswirkungen auf die regulatorische Integrität von TADs, sowie ihre pathogene Rolle in humanen vererbaren Erkrankungen. Die hierfür ausgewählten strukturellen Variationen sind allesamt mit angeborenen Gliedmaßenfehlbildungen assoziiert und betreffen den *WNT6/IHH/EPHA4/PAX3* Locus. Für die Untersuchung der verantwortlichen Entwicklungsdefekte wurden Mausmodelle generiert, die eine Nachbildung der äquivalenten humanen Mutationen im Genom tragen. Mithilfe der CRISPR/Cas9 - Technologie wurden erstmals megabasen-große genetische Variationen in murinen embryonalen Stammzellen generiert um anschließend transgene Tiere zu erhalten. Um die Konsequenzen der strukturellen Variationen auf die Integrität von TADs zu untersuchen, wurden die Extremitätenknospen der Mausmutanten einer 4C-seq Analyse unterzogen, bei der sich alle genomischen Kontakte und damit die Grenzregionen von TADs detektieren lassen.