

# **Die Rolle des Transkriptionsfaktors TRPS1 in der Skelettentwicklung**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
der  
Fakultät für Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
**Stephanie Gkalympoudis**  
aus Lüdenscheid

Januar 2011

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Vortkamp

3. Gutachter: ---

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. D. Hering

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2011

*für Marina  
& Markus*

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Genregulation .....	1
1.2 Chondrogenese und Ossifikation .....	2
1.3 Die Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrome .....	6
1.4 Der Transkriptionsfaktor TRPS1 .....	8
1.4.1 <i>Trps1</i> -Expressionsmuster und <i>Trps1</i> -defiziente Mäuse .....	10
1.4.2 Potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors TRPS1 .....	12
1.4.2.1 <i>HSPG2</i> .....	12
1.4.2.2 <i>EXTL2</i> .....	13
1.4.2.3 <i>MATN4</i> .....	13
1.4.2.4 <i>LAPTM4B</i> .....	14
1.4.2.5 <i>EMP3</i> .....	14
1.4.3 Zielgene des Transkriptionsfaktors TRPS1 .....	15
1.4.3.1 <i>RUNX2</i> .....	15
1.4.3.2 <i>STAT3</i> .....	15
1.4.3.3 <i>PTH LH</i> .....	16
1.4.3.4 Osteocalcin .....	16
1.5 Zielsetzung .....	17
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Material .....	19
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Standardlösungen .....	19
2.1.3 Medien .....	19
2.1.3.1 Medien und Agenzien für die Kultivierung von Bakterien .....	19
2.1.3.2 Medien und Agenzien für die Kultivierung von Zellen .....	20
2.1.4 Mikroorganismen und Zelllinien .....	21
2.1.4.1 Bakterienstamm .....	21
2.1.4.2 Zelllinien und Primärkulturen .....	21
2.1.5 Enzyme .....	22
2.1.6 Größenstandards .....	22
2.1.7 Oligonukleotide .....	22
2.1.8 Vektoren .....	23
2.1.9 Antikörper .....	23
2.1.10 DNA .....	24
2.1.11 RNA / cDNA .....	24
2.1.12 Protein .....	24
2.1.13 Online-Datenbanken und Software .....	25
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	26
2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA .....	26

2.2.1.2	Präparation von Plasmid-DNA .....	27
2.2.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Fibroblastenzellen .....	28
2.2.1.4	DNase I-Behandlung von RNA .....	29
2.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung .....	29
2.2.1.6	Polymerasekettenreaktion (PCR, nach Mullis <i>et al.</i> 1986).....	29
2.2.1.7	Reverse Transkription von RNA (RT) .....	30
2.2.1.8	Amplifikation von cDNA-Enden (5'-RACE) .....	31
2.2.1.9	Aufreinigung von DNA .....	31
2.2.1.10	Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.2.1.11	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	32
2.2.1.12	Sequenzierung von DNA (nach Sanger <i>et al.</i> 1977).....	32
2.2.1.13	Restriktionsendonukleaseverdau .....	33
2.2.1.14	Ligation .....	33
2.2.1.15	<i>In vitro</i> Mutagenese .....	34
2.2.1.16	Quantitative Primer Extension Analyse allelischer Transkriptverhältnisse .....	34
2.2.1.17	Mikrosatellitenanalyse.....	35
2.2.1.18	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).....	36
2.2.2	Bakterien .....	36
2.2.2.1	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	36
2.2.2.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	37
2.2.3	Zellkultur.....	37
2.2.3.1	Auftauen von kryokonservierten Zellen.....	38
2.2.3.2	Passagieren von Zellen .....	38
2.2.3.3	Differenzieren von Zellen .....	38
2.2.3.4	Transiente Transfektion von Säugerzellen .....	39
2.2.3.5	Luciferase-Reportergen-Assay .....	39
2.2.3.6	Kryokonservierung von Zellen .....	40
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden .....	41
2.2.4.1	<i>In vitro</i> Translation von Proteinen .....	41
2.2.4.2	Gesamtproteinextraktion aus ATDC5-Zellen .....	41
2.2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung (nach Bradford 1976).....	42
2.2.4.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, nach Laemmli 1970) .....	42
2.2.4.5	Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot) .....	43
2.2.4.6	Chromatinimmunpräzipitationen .....	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>47</b>
3.1	Proteinbiochemische Analyse von chondrogen differenzierten ATDC5- Zellen (Zeitverlauf) .....	47
3.2	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) .....	49
3.3	Funktionelle Promotorstudien von potentiellen TRPS1-Zielgenen.....	55
3.4	Untersuchungen zum Pathomechanismus bei Patienten mit TRPS und ungeklärter Pathogenese .....	57
3.4.1	Untersuchungen zum Pathomechanismus bei einer Patientin mit TRPS II .....	57
3.4.1.1	Molekulargenetische Analysen bei einer Patientin mit TRPS II .....	58
3.4.1.2	Kartierung der Deletion auf Chromosom 8q .....	60
3.4.1.3	Quantitative Analyse der allelischen Transkription .....	63
3.4.1.4	Identifikation alternativer <i>TRPS1</i> -Transkripte .....	64
3.4.1.5	Funktionelle Analyse einer potentiellen alternativen Promotorregion ....	68

3.4.2 Untersuchungen zum Pathomechanismus bei einer Patientin mit TRPS I	72
3.4.2.1 Molekulargenetische Analysen bei einer Patientin mit TRPS I	72
3.4.2.2 Quantitative Analyse der allelischen Transkription	74
<b>4. Diskussion</b>	<b>76</b>
4.1 Proteinbiochemische Analyse von chondrogen differenzierten ATDC5-Zellen (Zeitverlauf)	76
4.2 Identifikation und Verifizierung von TRPS1-Zielgenen per Chromatin-immunpräzipitation (ChIP)	78
4.3 Identifikation und Verifizierung von TRPS1-Zielgenen durch funktionelle Promotorstudien	80
4.4 Untersuchungen zum Pathomechanismus bei Patienten mit TRPS und ungeklärter Pathogenese	84
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>91</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elemente, Nukleotide und Aminosäuren wurden nach den internationalen Regeln abgekürzt. Sonstige allgemein gebräuchliche Abkürzungen sind ebenfalls nicht gesondert aufgeführt.

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm ( $10^{-6}$ Gramm)
µl	Mikroliter ( $10^{-6}$ Liter)
aa	Aminosäure/n ("amino acid/s")
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AK	Antikörper
ATCC	Amerikanisches Bioressourcenzentrum ("American Type Culture Collection")
Bla	Beta-Lactamase-Gen
BLAST	Programme zur Analyse biologischer Sequenzdaten ("Basic Local Alignment Search Tool")
BMP	eine Gruppe von Wachstumsfaktoren ("Bone Morphogenetic Proteins")
bp	Basenpaar/e
BP	Bruchpunkt
BSA	Rinderserumalbumin ("Bovine Serum Albumine")
cDNA	Komplementäre/Kopie-DNA ("complementary DNA")
cen	Centromer
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
cm	Zentimeter ( $10^{-2}$ Meter)
CMV	Cytomegalievirus
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
CpG-Insel	CG-reiche Region im Promotorbereich von Genen
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphat
del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix ("Extracellular Matrix")
ECR	Evolutionär konservierte Region ("Evolutionary Conserved Region")
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Experiment zum Nachweis von Nukleinsäure-Protein-Interaktionen ("Electrophoretic Mobility Shift Assay")

EST	cDNA-Nukleotidsequenzen ("Expressed Sequence Tag")
EtOH	Ethanol
FBS	Fötale Kälberserum (" <i>Fetal Bovine Serum</i> ")
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase ("Horseradish Peroxidase")
HSV-TK	Thymidinkinase (TK) des Herpes-Simplex-Virus (HSV)
IgG	Immunglobulin G
Ihh	Ligand eines Signaltransduktionsweges ("Indian Hedgehog")
kb	Kilobase/n (10 <sup>3</sup> Basenpaare)
kDa	Kilodalton (10 <sup>3</sup> Dalton)
l	Liter
LB	Komplexes Nährmedium zur Bakterienkultivierung ("Lysogeny Broth")
M	mol/l
M	Marker
mA	Milli-Ampere
Mb	Megabase/n (10 <sup>6</sup> Basenpaare)
MKE	Multiple kartilaginäre Exostosen
min	Minute
ml	Milliliter (10 <sup>-3</sup> Liter)
MLPA	Kopienzahlanalyse ("Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification")
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ("messenger"-RNA)
mut	Mutiert/Mutation
NCBI	Informationsplattform ("National Center for Biotechnology Information")
ng	Nanogramm (10 <sup>-9</sup> Gramm)
NK	Negativkontrolle
NLS	Kernlokalisierungssignal/-sequenz ("Nuclear Localization Signal")
NP	Normalperson
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte (bei 600 nm)
ORF	Offener Leserahmen ("Open Reading Frame")
p	kurzer Arm eines Chromosoms ( <i>petit</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ("Phosphate Buffered Saline")
PCR	Polymerasekettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction")
Pen	Penicillin
pg	Pikogramm (10 <sup>-12</sup> Gramm)
pH	-log [H <sup>+</sup> ]
q	langer Arm eines Chromosoms ( <i>queue</i> )



qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
R	IUPAC-Code: Guanin-Rest oder Adenin-Rest
RACE	Amplifikation von cDNA-Enden ("Rapid Amplification of cDNA Ends")
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rotations/rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat ("Sodium Dodecyl Sulfate")
sec	Sekunde
Seq	Sequenz/Sequenzierung
shRNA	sekundärstrukturbildende Ribonukleinsäure ("short hairpin")
SNP	Einzelbasenaustausch ("Single Nucleotide Polymorphism")
SRO	Kleinster überlappende Deletionsbereich ("Smallest Region of deletion Overlap")
STR	Mikrosatelliten-DNA ("Short Tandem Repeat")
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box bindendes Protein ("TATA binding protein")
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ("Tris Buffered Saline")
TE	Tris-EDTA-Puffer
tel	Telomer
TF	Transkriptionsfaktor
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur ("Temperature of melting")
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Polyoxyethylen-(9,10)p-t-octylphenol
TRPS I	Tricho-Rhino-Phalangeales Syndrom Typ I
TRPS II	Tricho-Rhino-Phalangeales Syndrom Typ II
TRPS III	Tricho-Rhino-Phalangeales Syndrom Typ III
Trps1	Muriner Zinkfingertranskriptionsfaktor
TRPS1	Humaner Zinkfingertranskriptionsfaktor
U	Unit
UCSC	Informationsplattform ("University of California Santa Cruz")
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteil pro Volumen ("volume/volume")
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen ("weight/volume")
wobble	Mischung von verschiedenen Basen an einer Position
wt	Wildtypisch/Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
Y	IUPAC-Code: Cytosin-Rest oder Thymin-Rest

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Chondrogenese und endochondrale Ossifikation (Wülling und Vortkamp 2010)	<b>4</b>
<b>Abb. 2:</b>	Interaktion von Transkriptionsregulatoren während (A) der mesenchymalen Kondensation und (B) verschiedener Stadien der Chondrozytendifferenzierung (Wülling und Vortkamp 2010)	<b>5</b>
<b>Abb. 3:</b>	Gesichtszüge zweier Brüder mit einem Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrom Typ I (nach Lüdecke und Horsthemke 2008)	<b>7</b>
<b>Abb. 4:</b>	Charakteristische Abnormalitäten des Handskeletts beim TRPS (nach Kaiser 2003, Lüdecke und Horsthemke 2008)	<b>7</b>
<b>Abb. 5:</b>	Vergleich zwischen dem humanen <i>TRPS1</i> -Gen und seinem murinen Ortholog	<b>8</b>
<b>Abb. 6:</b>	Schematische Darstellung des TRPS1-Proteins (nach Lüdecke und Horsthemke 2008)	<b>9</b>
<b>Abb. 7:</b>	Whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung mit einer <i>Trps1</i> -spezifischen Sonde (Kunath <i>et al.</i> 2002)	<b>11</b>
<b>Abb. 8:</b>	Western-Blot Analyse der <i>Trps1</i> -Expression während der chondrogenen Differenzierung von ATDC5-Zellen	<b>48</b>
<b>Abb. 9:</b>	Analyse des gescherten Chromatins nach Anwendung des Bioruptors und Shearing Moduls des Red ChIP Kits (beides Diagenode)	<b>49</b>
<b>Abb. 10:</b>	PCR-basierte ChIP-Anreicherungsanalyse	<b>54</b>
<b>Abb. 11:</b>	Untersuchung von putativen Zielgenen auf ihre Regulation durch TRPS1	<b>56</b>
<b>Abb. 12:</b>	Skelettaler Phänotyp der Patientin im Alter von 13 Jahren	<b>58</b>
<b>Abb. 13:</b>	Arraybasierte Identifikation einer ca. 4 Mb großen Deletion auf Chromosom 8 unserer Patientin mit TRPS II	<b>59</b>
<b>Abb. 14:</b>	Analyse des Mikrosatelliten <i>D8S592</i>	<b>59</b>
<b>Abb. 15:</b>	Bruchpunktregion der Deletion bei unserer Patientin mit TRPS II	<b>60</b>
<b>Abb. 16:</b>	Chromosomale Organisation der Deletion unserer Patientin mit TRPS II	<b>62</b>
<b>Abb. 17:</b>	Sequenzierung von SNP <i>rs800899</i> enthaltender genomischer DNA	<b>63</b>
<b>Abb. 18:</b>	Ergebnisse der SNaPshot Experimente	<b>64</b>
<b>Abb. 19:</b>	Übersicht über bekannte <i>TRPS1</i> -Transkripte gemäß Ensembl ( <a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a> )	<b>65</b>
<b>Abb. 20:</b>	Alternatives Spleißen beim <i>TRPS1</i> -Gen	<b>66</b>
<b>Abb. 21:</b>	Evolutionäre Konservierung des potentiellen alternativen <i>TRPS1</i> Promotors	<b>67</b>
<b>Abb. 22:</b>	Ausschnitt aus der alternativen <i>TRPS1</i> -Promotorregion	<b>68</b>
<b>Abb. 23:</b>	<i>In silico</i> -Analyse der klonierten <i>TRPS1</i> -Promotorbereiche mittels UCSC Genome Browser	<b>69</b>
<b>Abb. 24:</b>	Ergebnisse von Reporter-gen-Assays mit <i>TRPS1</i> -Promotorkonstrukten	<b>71</b>
<b>Abb. 25:</b>	MLPA-Analyse an genomischer DNA der o.g. Patientin und dessen Eltern	<b>73</b>
<b>Abb. 26:</b>	qPCR-Analyse bzgl. des Exons 3 von <i>TRPS1</i> (UPL-Sonde 34)	<b>74</b>
<b>Abb. 27:</b>	Sequenzierung des seltenen Polymorphismus in Exon 5 des <i>TRPS1</i> -Gens	<b>75</b>
<b>Abb. 28:</b>	Ergebnisse der SNaPshot Experimente bzgl. der Patientin mit TRPS I	<b>75</b>
<b>Abb. 29:</b>	Schematische Darstellung der Expressionsprofile der Gene <i>Trps1</i> , <i>Gli3</i> , <i>Runx2</i> und <i>Matn4</i> im Verlauf der chondrogenen Differenzierung von ATDC5-Zellen	<b>77</b>

---

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b>	Genomische Organisation des <i>TRPS1</i> -Gens (Genbank Accession NM_014112, GI: 90652850)	<b>66</b>
<b>Tab. 2:</b>	Oligonukleotide für die Sequenzierung von Plasmiden	<b>102</b>
<b>Tab. 3:</b>	Oligonukleotide für den Integritätstest von RNA-Proben	<b>102</b>
<b>Tab. 4:</b>	Oligonukleotide für die PCR-basierten Anreicherungstests nach Chromatinimmunpräzipitation	<b>102</b>
<b>Tab. 5:</b>	Oligonukleotide für die Klonierung potentieller <i>TRPS1</i> -Zielgenpromotoren	<b>103</b>
<b>Tab. 6:</b>	Oligonukleotide für die Bruchpunktkartierung	<b>103</b>
<b>Tab. 7:</b>	Oligonukleotide für die quantitative Analyse der allelischen Transkription	<b>103</b>
<b>Tab. 8:</b>	Oligonukleotide für die RT-PCR bzgl. alternativer <i>TRPS1</i> -Transkripte	<b>104</b>
<b>Tab. 9:</b>	Oligonukleotide für die Klonierung der <i>TRPS1</i> -Promotorkonstrukte	<b>104</b>
<b>Tab. 10:</b>	Oligonukleotide für die <i>in vitro</i> -Mutagenese	<b>104</b>
<b>Tab. 11:</b>	Oligonukleotide für die quantitative PCR	<b>104</b>
<b>Tab. 12:</b>	Im Rahmen dieser Arbeit generierte und genutzte Plasmide	<b>105</b>
<b>Tab. 13:</b>	Chromosomale Lokalisation klonierter potentieller Promotorregionen im menschlichen Genom (NCBI36/hg18)	<b>106</b>
<b>Tab. 14:</b>	Chromosomale Lokalisation der Promotorregionen, die auf Anreicherung mittels <i>TRPS1</i> -ChIP getestet wurden, im murinen Genom (NCBI36/mm8)	<b>106</b>

## 1. Einleitung

Die Ursachen einer Vielzahl von genetisch bedingten Erkrankungen beim Menschen sind nur unzureichend aufgeklärt. Um Einsicht in die Pathogenese zu erhalten, müssen die molekularen Mechanismen, die bedeutenden Entwicklungsprozessen zugrunde liegen, aufgeklärt werden. Ein wichtiger Punkt ist hierbei die Identifizierung und Charakterisierung von Genen oder ganzer Netzwerke, die an solchen Prozessen beteiligt sind. Um beispielsweise das Verständnis von Fehlern bei der Genese des Skeletts zu verbessern, ist es deshalb interessant, die Regulationsnetzwerke und Signalkaskaden zu identifizieren, die an der Chondrogenese und Ossifikation beteiligt sind. Genen eine bestimmte Funktion zuzuordnen oder eine Korrelation zu anderen Genen herzustellen, ist deshalb nicht nur aus entwicklungsbiologischer, sondern auch aus medizinischer Sicht von großer Bedeutung.

### 1.1 Genregulation

Die Funktion einer Zelle wird über die differentielle Expression eines Sets von Genen reguliert, das spezifisch für den Zell-/Gewebetyp oder das Entwicklungsstadium ist. Störungen in einem solchen Expressionsprofil führen nicht selten zu einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust eines Zell-/Gewebetyps und somit zu Anomalien in komplexen Organismen. Solche resultieren, sofern sie mit der Lebensfähigkeit vereinbar sind, in den verschiedensten, zum Teil sehr vielschichtigen Erkrankungen. Insofern ist die Kenntnis über die Regulationsmechanismen einer Zelle von immenser Bedeutung.

Eine Zelle kann die Genexpression auf verschiedenen Ebenen regulieren; auf transkriptioneller, auf posttranskriptioneller, auf translationaler und auf posttranslationaler Ebene. Gängige Mechanismen sind hierbei alternatives Spleißen, Stabilisierung/Destabilisierung der mRNA oder des Proteins, sowie die nachträgliche Modifikation des Genproduktes. Einer der wichtigsten Regulationsmechanismen ist aber die Kontrolle der Transkription. Hier spielen, neben der Zugänglichkeit des Locus innerhalb des Chromatins und seinem epigenetischen Status, die Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle (Hager *et al.* 2006, Latchman 1990). Diese trans-Elemente kommen ubiquitär, zelltyp- oder zellzyklusspezifisch vor und

wirken, meist in größeren Multiproteinkomplexen, als Aktivatoren oder Repressoren auf die Expression eines Gens ein. Sie bestehen meist aus verschiedenen Modulen, einer DNA-bindenden, einer regulationsvermittelnden Domäne und evtl. weiteren Domänen. Es kann allerdings auch vorkommen, dass die beiden entscheidenden Domänen in verschiedenen Polypeptiden codiert sind und über eine Proteinbindedomäne in jedem dieser Polypeptide zu einer entsprechenden Quartärstruktur zusammentreten müssen. Dies vervielfacht die Regulationsvariabilität abermals. Es ist sogar möglich, dass bestimmte Transkriptionsfaktoren kontextabhängig entweder aktivierend oder reprimierend wirken können (Sauer und Jäckle 1993, Ruiz i Altaba 1999). Die DNA-bindenden Domänen (häufig Zinkfingerdomänen) erkennen spezifische DNA-Sequenzen im Genom, sogenannte cis-Elemente. Manche Regulatoren, besonders Repressoren, vermitteln ihre Wirkung allerdings auch gänzlich ohne eine Bindung zu DNA-Sequenzen einzugehen.

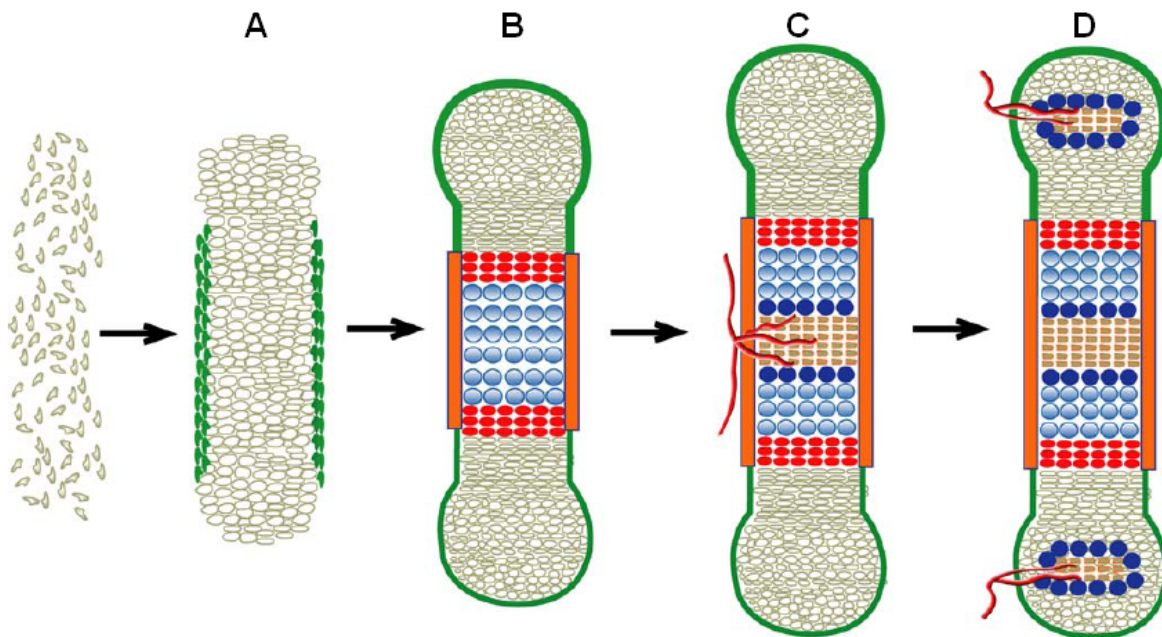
## **1.2 Chondrogenese und Ossifikation**

Die Bildung von Knochengewebe während des Wachstums wird als Ossifikation bezeichnet (Sobotta und Welsch 2006). Sie erfolgt entweder aus Bindegewebe (desmal) oder aus Knorpelgewebe (chondral). Bei der desmalen Ossifikation wird das Knochengewebe direkt aus dem Mesenchym gebildet. Hierbei differenzieren Mesenchymzellen zu Osteoblasten, die für die Bildung der Knochengrundsubstanz verantwortlich sind, aus denen im Zuge der Mineralisierung Osteozyten entstehen. Durch desmale Ossifikation gebildete Knochen nennt man Bindegewebs-, Deck- oder Belegknochen. Zu ihnen zählen die Knochen des Schädeldaches und des Gesichtsschädels, sowie das Schlüsselbein. Die chondrale Ossifikation zeichnet sich dadurch aus, dass aus dem Mesenchym zunächst knorpelige Skelettelemente, das Primordialskelett, gebildet werden. Die anschließende Verknöcherung erfolgt entweder von innen (endochondral) oder von außen (perichondral). Auf diese Weise wird das gesamte axiale und appendikuläre Skelett gebildet. Bei der endochondralen Ossifikation gelangen, im Zuge des Einwachsens von Blutgefäßen, Mesenchymzellen in das Knorpelgewebe, die dann zu Chondroklasten (für den Abbau von Knorpelgewebe) und Osteoblasten (für die Bildung von Knochengewebe) differenzieren (s. Abb. 1). Durch die Abspaltung von Osteoblasten aus dem

Perichondrium erfolgt die perichondrale Ossifikation, die am Mittelschaft (Diaphyse) der langen Röhrenknochen stattfindet. In beiden Fällen nennt man die Punkte, von denen die Verknöcherung ausgeht, Ossifikationszentren. Kurze und platte Knochen wachsen durch äußere Anlagerung von Knochensubstanz. Auf diese Weise erfolgt auch das Dickenwachstum der langen Knochen. Das Längenwachstum der Röhrenknochen erfolgt dagegen interstitiell in dem komplexen System der Epiphysenfuge, dem Bereich zwischen dem perichondral entstandenen Mittelstück (Diaphyse) und dem endochondral entstandenen Endstück (Epiphyse).

Bei dem Knorpelgewebe des knorpelig präformierten Skeletts (Ersatzknochen) und der Epiphysenfuge handelt es sich um die hyaline Form, in dessen Extrazellulärer Matrix collagene Fasern liegen. Während der Chondrogenese differenzieren zunächst mesenchymale Zellen zu Chondroblasten (Kondensation, s. Abb. 1 A). Um die Kondensation herum befindet sich das Perichondrium, das zum Knorpelwachstum beiträgt und dessen Wachstumsrate reguliert (Zou *et al.* 1997). Die Chondroblasten proliferieren und sezernieren die Extrazelluläre Matrix. Das Wachstum des Knorpels geschieht somit sowohl durch Zellproliferation als auch durch Anhäufung von Interzellulärschubstanz. Diese enthält bis zu 70 % Wasser und ist arm an Gefäßen und Nerven. Ihre Hauptbestandteile sind Typ II Collagen und Proteoglykane (hauptsächlich Aggrecan). Die Proteoglykane sind polyanionisch und ziehen deshalb Natriumkationen an, welche wiederum den Wassereinstrom induzieren. Die sich aus den Chondroblasten entwickelnden Chondrozyten rücken dadurch in kleinen Gruppen auseinander. In einem definierten Entwicklungsstadium werden die zentralen Chondrozyten hypertroph, stellen die Proliferation ein, vervielfachen ihr Volumen und produzieren eine kalzifizierende Matrix, die vornehmlich aus Typ X Collagen besteht (s. Abb. 1 B). Zu diesem Zeitpunkt ist nicht nur die Bildung von Interzellulärschubstanz für das Wachstum des Knorpels verantwortlich. Auch die Volumenvergrößerung der hypertrophen Chondrozyten trägt maßgeblich zur Verlängerung des Knorpellements bei. Letztlich werden die Chondrozyten apoptotisch (Horton *et al.* 1998). Gleichzeitig entwickelt sich das Perichondrium zum Periost und es kommt zur Invasion von Blutgefäßen, Chondroklasten und Osteoblasten (s. Abb. 1 C). Der Aufbau trabekulären Knochens beginnt (primäres Ossifikationszentrum). Die endochondrale Ossifikation schreitet beiderseits in Richtung Diaphysenenden voran, wo schließlich zwei sekundäre Ossifikationszentren entstehen (s. Abb. 1 D). In den Wachstumsfugen sorgt ein

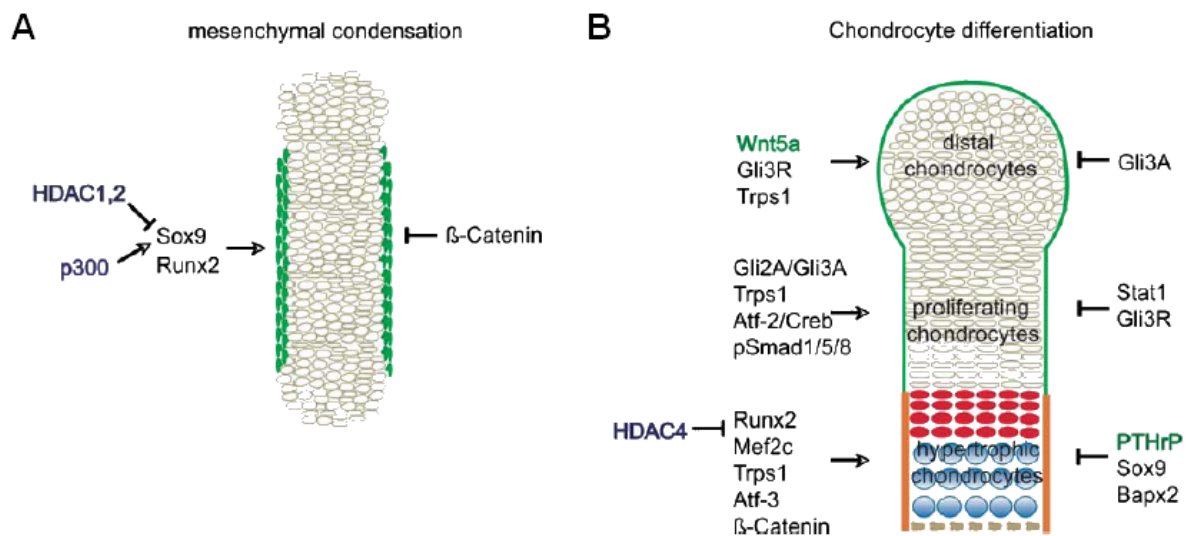
empfindlich koordinierter Ablauf von Chondroblastendifferenzierung, Hypertrophierung und Apoptose für das Voranschreiten des Längenwachstums, bis die endgültige Länge des Knochens erreicht ist. Mit dem Wachstumsabschluss wachsen Dia- und Epiphysen knöchern zusammen, so dass die Epiphysenfuge verschwindet. Die Grenze ist aber häufig noch als Fugenlinie (*Linea physealis*) zu erkennen.



**Abb. 1: Chondrogenese und endochondrale Ossifikation (Wülling und Vortkamp 2010).** (A) Kondensation. Mesenchymale Zellen differenzieren zu proliferierenden Chondroblasten (grau), umgeben von Perichondrium (grün). (B) Differenzierung von Chondrozyten-Subpopulationen. Bildung von prähypertrophen (rot) und hypertrophen (blau) Chondrozyten, umgeben von Periost (orange). (C) Invasion. Im Zentrum des Skelettelements wird die Ossifikation initiiert. (D) Bildung sekundärer Ossifikationszentren im Bereich der distalen Chondroblasten.

Die Chondrogenese und endochondrale Ossifikation umfasst diverse Proliferations- und Differenzierungsprozesse. Während dieser komplexen Prozesse laufen charakteristische genetische Programme ab, die durch verschiedenste Transkriptionsfaktoren reguliert werden (s. Abb. 2). So ist SOX9 essentiell für die Chondrozytendifferenzierung und Knorpelentwicklung (Bi *et al.* 1999). Mutationen im SOX9-Gen führen zu dem Kleinwuchssyndrom CD (Campomele Dysplasie; Foster *et al.* 1994, Wagner *et al.* 1994). Unterdessen stellt der Transkriptionsfaktor CBFA1/RUNX2 einen wichtigen Regulator der Osteoblastendifferenzierung dar (Otto

*et al.* 1997, Komori *et al.* 1997, Stricker *et al.* 2002), so dass Haploinsuffizienz für CBFA1/RUNX2 zu CCD (Cleidocraniale Dysplasie; Mundlos *et al.* 1997) führt.



**Abb. 2: Interaktion von Transkriptionsregulatoren während (A) der mesenchymalen Kondensation und (B) verschiedener Stadien der Chondrozytendifferenzierung (Wülling und Vortkamp 2010).**

Die Koordination des Knochenwachstums, aber auch der Knochenerneuerung, wird über etliche komplexe Signalwege kontrolliert (de Crombrugge *et al.* 2001, Kronenberg 2003, vgl. Abb. 2). Einer der wichtigsten ist die *Ihh*/PTHrP-Signalkaskade (Lanske *et al.* 1996). Indian hedgehog (*Ihh*) wird durch Runx2 aktiviert (Yoshida *et al.* 2004). Es reguliert die Chondrozytendifferenzierung zum einen über Proliferationsaktivierung (St-Jacques *et al.* 1999), zum anderen durch eine negative Rückkopplung mit PTHrP (Parathyroid hormone related peptide; Vortkamp *et al.* 1996). PTHrP ist ein Inhibitor der Chondrozytendifferenzierung und wird von *Ihh* positiv reguliert (Vortkamp *et al.* 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Trps1*-Defizienz zu einer Hochregulation von PTHrP und somit zur Vergrößerung der Proliferationszone in der Knorpelplatte führt (Nishioka *et al.* 2008).

Die *Ihh*-Signalwirkung wird durch die Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie vermittelt (Marigo *et al.* 1996). Gli1 wirkt ausschließlich als Aktivator von *Ihh*-Zielgenen. Gli2 und Gli3 sind dagegen Aktivatoren, aus denen durch eine proteolytische Prozessierung auch verkürzte Repressorformen entstehen können (Ruiz i Altaba 1999). Diese posttranslationale Prozessierung ist negativ durch *Ihh*-Signale reguliert. Eines der GLI3-Zielgene ist *PTCH1* (Protein patched homolog 1; Agren *et al.* 2004),



das einen Rezeptor für sezernierte Hedgehog-Liganden codiert und wichtig für eine ordnungsgemäße Proliferation und Differenzierung in nahezu jedem Gewebe oder Organ während der Embryogenese ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Trps1 durch Interaktion mit der Aktivatorform von Gli3 die Größe der Zone distaler Chondrozyten in der Wachstumsfuge reguliert (Wülling *et al.* 2009). Gli3 ist sowohl mit dem Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom als auch mit dem Pallister–Hall Syndrom assoziiert (Vortkamp *et al.* 1991, Kang *et al.* 1997). In beiden Fällen ist die Chondrozytenreifung gestört, jedoch bei der ersten Erkrankung durch Haploinsuffizienz und bei der zweiten durch eine Funktionsgewinnmutation.

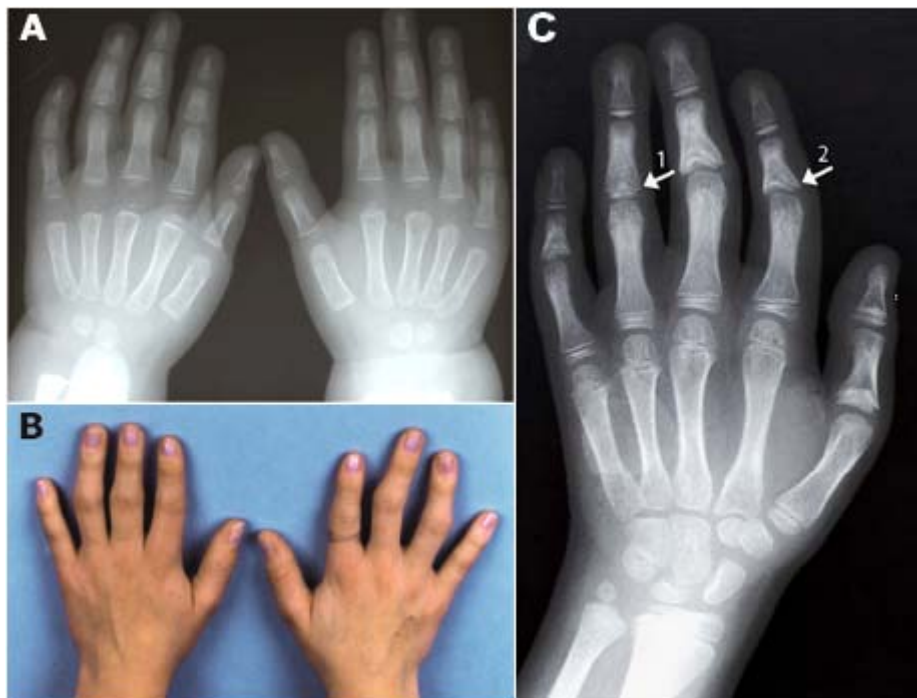
### 1.3 Die Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrome

Unter den Tricho-Rhino-Phalangealen Syndromen versteht man eine Gruppe autosomal-dominant und mit vollständiger Penetranz vererbter Dysmorphiesyndrome. Man unterscheidet drei Typen des Tricho-Rhino-Phalangealen Syndroms (Typ I [MIM #190350], Typ II [MIM #150230] und Typ III [MIM #190351]). Merkmale aller drei Typen sind charakteristische craniofaziale Dysmorphien und Skelettanomalien. Eine erste Beschreibung erfolgte bereits vor über 50 Jahren durch den Dermatologen Klingmüller (Klingmüller 1956). Der Radiologe Giedion führte zehn Jahre später den heute gebräuchlichen Namen ein (Giedion 1966). Zu den klinischen Hauptmerkmalen gehören spärliches, langsam wachsendes Kopfhaar, eine knollig verdickte Nasenspitze, ein hohes Philtrum, Epiphysendeformation (Zapfenepiphysen), Minderwuchs und Brachydaktylie. Die Patienten zeigen in der Wachstumsphase ein retardiertes Skeletalter, es kommt aber schließlich zu einem vorzeitigen Verschluss der Wachstumsfugen (Typ I [MIM #190350]). Einige typische Merkmale sind in Abb. 3 und 4 zusammengefasst. Später wurden Patienten beschrieben, die, zusätzlich zu den oben genannten Zeichen, multiple kartilaginäre Exostosen (vgl. 3.4.1) und mentale Retardierung aufwiesen (Hall *et al.* 1974), diese Erkrankung wurde Langer-Giedion-Syndrom genannt (TRPS Typ II, [MIM #150230]). Im Jahr 1986 schließlich beschrieben Niikawa und Kamei noch einen besonderen TRPS-Phänotyp mit extremer Brachydaktylie und extremer Wachstumsretardierung, den sie als TRPS Typ III [MIM #190351] bezeichneten.



**Abb. 3: Gesichtzüge zweier Brüder mit einem Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrom Typ I (nach Lüdecke und Horsthemke 2008).**

Schütteres Haupthaar, birnenförmige Nasen, lange flache Philtren, schmale Oberlippen und abstehende Ohren sind gut erkennbar.



**Abb. 4: Charakteristische Abnormalitäten des Handskeletts beim TRPS (nach Kaiser 2003, Lüdecke und Horsthemke 2008).**

(A) Handröntgenaufnahme eines ca. vier Jahre alten Jungen, der ein retardiertes Knochenalter (ca. 2 Jahre) und den Beginn der Zapfenepiphysenbildung zeigt. (B) Photo der Hände einer 14 Jahre alten TRPS-Patientin mit den charakteristischen Achsenabweichungen und Verdickungen der interphalangealen Gelenke. (C) Handröntgenaufnahme eines Patienten mit TRPS I. An den Mittelphalangen sind die typischen Zapfenepiphysen (durch Pfeile gekennzeichnet) erkennbar, 1: Epiphysendeformation, 2: Epiphysendeformation und damit verbundene Schiefstellung des Fingers.

Heterozygote Punktmutationen in dem Gen *TRPS1*, Deletionen dieses Gens oder Translokationen und Inversionen, die das Gen zerreißen, führen zu den Tricho-Rhino-Phalangealen Syndromen I und III (Fryns und Van den Berghe 1986, Lüdecke *et al.* 1991, Hou *et al.* 1995, Sasaki *et al.* 1997, Momeni *et al.* 2000, Lüdecke *et al.* 2001, Hilton *et al.* 2002, Kaiser *et al.* 2004). Das TRPS Typ II ist dagegen ein Mikrodeletionssyndrom, das mindestens das Intervall von *TRPS1* bis *EXT1* auf dem langen Arm von Chromosom 8 überspannt. Das etwa 2 Mb von *TRPS1* entfernt liegende Gen *EXT1* konnte als hauptverantwortlich für die Ausbildung von multiplen kartilaginären Exostosen identifiziert werden (Ahn *et al.* 1995). Ein Beitrag der dazwischen liegenden Gene *EIF3H*, *UTP23*, *RAD21*, *C8orf85*, *SLC30A8* und *MED30* zum Phänotyp der Patienten konnte bisher nicht gezeigt werden. Auch eine Beteiligung weiterer flankierender Gene ist unklar.

#### 1.4 Der Transkriptionsfaktor TRPS1

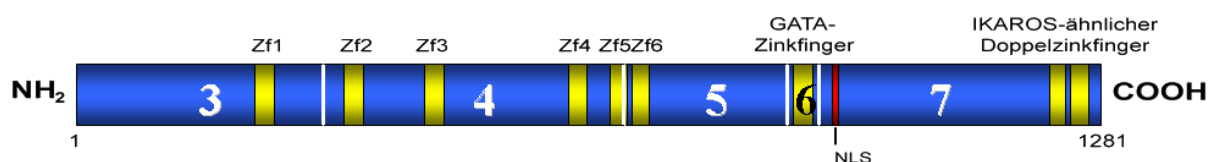
Das *TRPS1*-Gen, das durch positionale Klonierungsexperimente in der Region 8q24.1 identifiziert werden konnte, überspannt eine Region von ca. 260 kb und wird zentromerwärts transkribiert (Momeni *et al.* 2000). Mittels cDNA-Analysen und computergestützter DNA-Analysen konnten sieben Exons und ein offener Leserahmen (ORF) von 3843 bp ermittelt werden (s. Abb. 5). Dieser ORF überspannt die Exons drei bis sieben und codiert ein 1281 Aminosäuren langes Polypeptid mit einer theoretischen molekularen Masse von ca. 140 kDa (s. Abb. 6).



**Abb. 5: Vergleich zwischen dem humanen TRPS1-Gen und seinem murinen Ortholog.** Die blauen Boxen repräsentieren die Exons. Start- und Stopcodon, sowie konservierte Polyadenylierungssignale sind eingezeichnet.

TRPS1 weist eine einzigartige Kombination von neun putativen Zinkfingerdomänen vier verschiedener Typen auf (s. Abb. 6). Die Zinkfinger 1-6 gehören zum C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typ, während der siebte Zinkfinger der Gruppe der C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>-Zinkfinger angehört. Er weist eine große Ähnlichkeit zu DNA-bindenden GATA-Zinkfingern auf und es konnte gezeigt werden, dass dieser tatsächlich an die GATA-Konsensussequenz binden kann (Malik *et al.* 2001, Chang *et al.* 2002). Die beiden C-terminalen Zinkfinger acht und neun stellen zusammen einen Doppelzinkfinger vom IKAROS-Typ dar. Die Familie der IKAROS-Transkriptionsfaktoren bildet über dieses Zinkfingermotiv sowohl Homo- als auch Heterodimere (Sun *et al.* 1996). Für TRPS1 ist allerdings nur die Homodimerisierung gezeigt worden (McCarty *et al.* 2003). Das TRPS1-Protein beinhaltet ein Kernlokalisierungssignal, das C-terminal vom GATA-Zinkfinger gelegen ist (Kaiser *et al.* 2004).

Das murine *Trps1*-Gen ist auf Chromosom 15 lokalisiert und enthält nur 6 Exons, da ein Ortholog zum nicht-codierenden menschlichen Exon 2 fehlt (s. Abb. 5). Aminosäuresequenzvergleiche des humanen TRPS1 mit dem murinen Ortholog zeigten eine Übereinstimmung von 93 % (Malik *et al.* 2001). Auch in dem murinen Protein konnten alle neun Zinkfinger motive sowie das Kernlokalisierungssignal identifiziert werden (Momeni 2001). Diese evolutionäre Konservierung deutet darauf hin, dass dieses Protein eine für den Organismus bedeutende Funktion innehat.



**Abb. 6: Schematische Darstellung des TRPS1-Proteins (nach Lüdecke und Horsthemke 2008).**

Es sind die fünf codierenden Exons blau dargestellt, die Exongrenzen sind durch weiße Linien angezeigt. Die neun potentiellen Zinkfingerdomänen (Zf) sind gelb dargestellt. Das Kernlokalisierungssignal (NLS) wird durch eine rote Markierung repräsentiert.

Funktionelle Analysen haben gezeigt, dass TRPS1 eine reprimierende Wirkung auf GATA-induzierte Transkription hat, und dass diese durch den C-terminalen IKAROS-Doppelzinkfinger vermittelt wird (Malik *et al.* 2001). Hierzu ist ein intakter GATA-Zinkfinger im TRPS1-Protein essentiell.

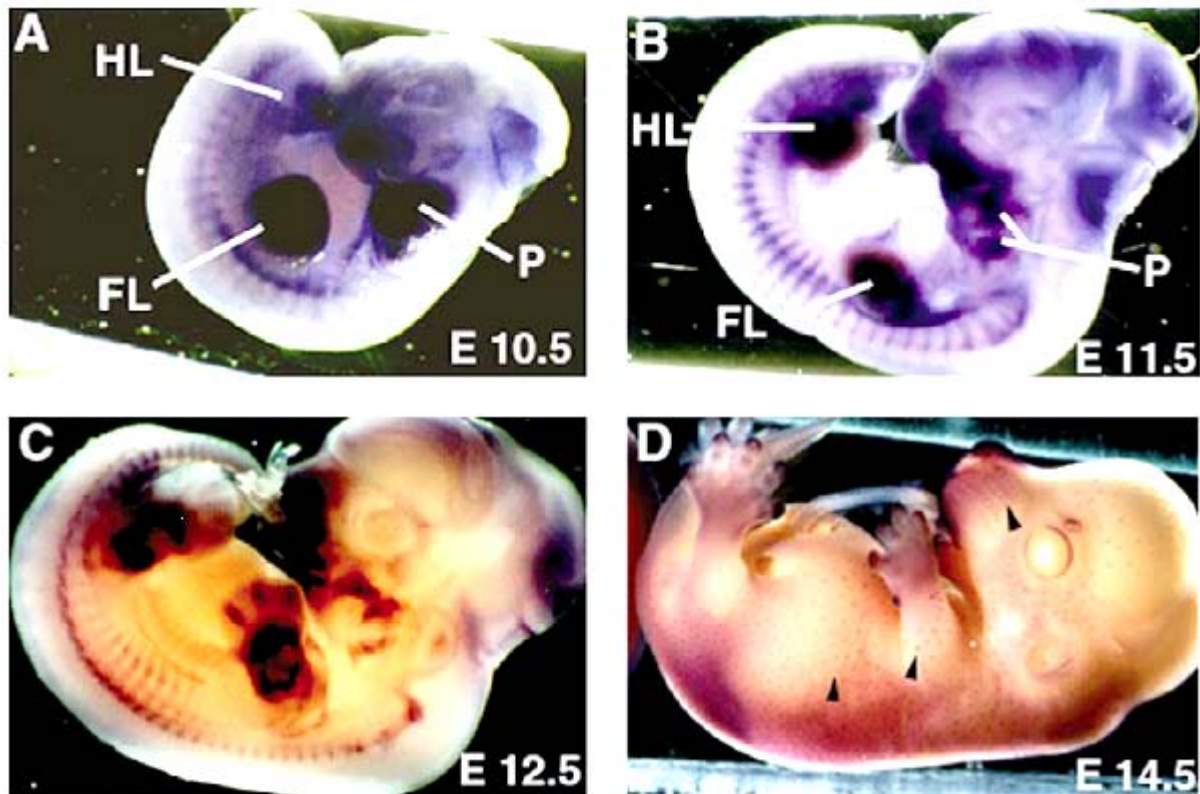
Missense-Mutationen in dem Zinkfinger vom GATA-Typ sind mit dem TRPS III assoziiert (Lüdecke *et al.* 2001). Möglicherweise ist hierfür ein dominant-negativer

Effekt verantwortlich, der zustande kommt, weil das mutante TRPS1-Protein eine verminderte DNA-Bindungsaffinität aufweist, aber dennoch die Fähigkeit besitzt, Cofaktoren zu binden. Funktionsverlustmutationen in *TRPS1* führen zum Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrom Typ I. In der Regel sind dies Mutationen, die zum Verlust eines *TRPS1*-Allels geführt haben oder Veränderungen, die die Bildung funktionellen Genprodukts von einem der Allele verhindern. Es wurden aber auch Mutationen gefunden, die lediglich den Transfer des Transkriptionsfaktors in den Nukleus verhindern (Kaiser *et al.* 2004).

In den vergangenen Jahren sind mehrere Bindepartner von TRPS1 identifiziert worden. So ist z.B. die Protein-Protein-Interaktion mit LC8a (Dynein Light Chain 8) gezeigt worden, die die Repressionsaktivität von TRPS1 vermindert (Kaiser *et al.* 2003a). Außerdem wurde eine Bindung zu RNF4 (RING Finger Protein 4) nachgewiesen, die die TRPS1-Funktion inhibiert (Kaiser *et al.* 2003b). Des Weiteren konnte auch eine posttranslationale Modifikation identifiziert werden, die die TRPS1-Wirkung moduliert. So wird die TRPS1-Aktivität durch multiple SUMOylierung gesteigert (Kaiser *et al.* 2007).

#### **1.4.1 *Trps1*-Expressionsmuster und *Trps1*-defiziente Mäuse**

Um einen Einblick in die möglichen Funktionen von *Trps1* während der Embryogenese zu erhalten, haben Kunath *et al.* 2002 *in situ*-Hybridisierungsexperimente an Mausembryonen durchgeführt. Eine starke *Trps1*-Expression kann demzufolge in den Knorpelanlagen, der Schnauze und den Haarfollikeln gefunden werden (s. Abb. 7). In E14.5-Embryonen war *Trps1* in den prähypertrophen und besonders in den periartikulären Chondrozyten exprimiert. Expression von *Trps1* kann allerdings auch in einer Vielzahl weiterer embryonaler Gewebe gefunden werden. So ist während der Organogenese auch in Lunge, Darm und Urogenitaltrakt sowie in verschiedenen Gehirnarealen *Trps1*-Expression zu verzeichnen (Kunath *et al.* 2002). Die Expression des *TRPS1*-Gens ist allerdings nicht auf fetale Gewebe beschränkt. Auch in verschiedenen adulten Geweben können *TRPS1*-Transkripte nachgewiesen werden (Momeni *et al.* 2000, diese Arbeit).



**Abb. 7: Whole-mount *in situ* Hybridisierung mit einer *Trps1*-spezifischen Sonde (Kunath *et al.* 2002).**

Es wurden Mausembryonen in den Stadien E10.5 (A), E11.5 (B), E12.5 (C) und E14.5 (D) untersucht. FL: vordere Extremitäten, HL: hintere Extremitäten, P: Kiemenbögen, Pfeilspitzen: Haarfollikel.

Um *Trps1*-defiziente Mäuse zu generieren, wurde eine natürlich vorkommende, zu TRPS I führende Mutation (IVS6+1G→T, Lüdecke *et al.* 2001) im murinen System nachempfunden. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Spleißmutation, die zu einer in frame-Deletion des sechsten Exons und somit der gesamten Zinkfingerdomäne vom GATA-Typ führt. Den Mäusen fehlt entweder auf einem oder auf beiden Allelen das Exon 5 (das murine Äquivalent zum humanen Exon 6), so dass sie *Trps1* ohne einen GATA-Zinkfinger exprimieren (Malik *et al.* 2002). Homozygote Mäuse (*Trps1*<sup>ΔGATA-Znf/ΔGATA-Znf</sup>) sind aufgrund schwerer Wirbelsäulen- und Rippenfehlbildungen nicht lebensfähig. *Trps1*<sup>+/ΔGATA-Znf</sup>-Mäuse zeigen faziale Abnormalitäten sowie einen Haar- und Skelettphänotyp. Diese Befunde korrelieren stark mit solchen von Patienten mit einem TRPS und machen deutlich, dass TRPS1, insbesondere dessen GATA-Zinkfinger, von entscheidender Bedeutung für eine normale Knochen- und Haarentwicklung beim Menschen ist.

## 1.4.2 Potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors TRPS1

In vorangegangenen Arbeiten zu diesem Projekt wurde eine systematische Analyse der Expressionsprofile von *Trps1*-defizienten Mäusen angestrebt. Hierzu wurden vergleichende cDNA-Microarray-Analysen an Extremitäten von wildtypischen und entsprechend mutierten Mausembryonen durchgeführt (Brega 2005). Als Zeitpunkt für die RNA-Präparation wurde E11.5 gewählt, weil für diesen Zeitpunkt eine hohe *Trps1*-Expression gezeigt werden konnte (s. 1.4.1). So konnten sowohl in homo- als auch in heterozygot *Trps1*-defizienten Individuen insgesamt rund 500 Gene differentiell exprimiert gefunden werden. Einige von diesen Genen sind in Knochenentwicklungsprozesse involviert und stellen somit gute Kandidaten für eine Regulation durch TRPS1 dar. An einer kleinen Auswahl solcher Gene sollten im Rahmen dieser Arbeit entsprechende funktionelle Studien erfolgen.

### 1.4.2.1 HSPG2

Proteoglykane sind Bestandteile der Extrazellulären Matrix (ECM), die aus einem Proteinkern bestehen, an den lange Ketten von Glycosaminoglykanen gebunden sind, so dass extrem komplexe, hochmolekulare ECM-Komponenten entstehen. Die Komponenten der ECM von Knorpel- und Knochengewebe spielen wichtige Rollen bei der Skelettentwicklung, was anhand der Vielzahl an Skelettdysplasien, die durch Mutationen in Matrixmolekülen hervorgerufen werden, ersichtlich ist (Lachman *et al.* 2005). *HSPG2* codiert das Heparansulfatproteoglykan Perlecan, einen Bestandteil der Extrazellulären Matrix, der u.a. eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Homeostase des Skeletts und der Gelenke spielt (Hassell *et al.* 2002). Das Genprodukt ist ein Strukturprotein der Basalmembran, das z.B. in der Wachstumsfuge in den prähypertrophen und hypertrophen Zonen exprimiert wird (Arikawa-Hirasawa *et al.* 1999). Funktionsverlustmutationen in dem Gen sind mit zwei autosomal-rezessiven Erkrankungen assoziiert, dem Schwartz-Jampel Syndrom, das eine Kombination aus Myotonie und Chondrodysplasie darstellt (Nicole *et al.* 2000), und der Dyssegmentalen Dysplasie vom Silverman-Handmaker-Typ (Arikawa-Hirasawa *et al.* 2001). Des Weiteren führt auch die Überexpression von Perlecan u.a. zu Defekten in der Wachstumsfuge der Röhrenknochen sowie der



Gelenkoberfläche. Expressionsanalysen in den Gliedmaßen von *Trps1*<sup>+/-</sup>-Mausembryonen, die durchgeführt wurden, um von TRPS1 regulierte Gene zu identifizieren, zeigten eine Hochregulation des *Hspg2*-Gens (Brega 2005).

#### 1.4.2.2 *EXTL2*

Das Gen *EXTL2* (Exostoses (multiple)-like 2) codiert eine alpha1, 4-N-Acetylhexosaminyltransferase, die N-Acetylgalactosamin und N-Acetylglucosamin auf die Glycosaminoglykan-Protein-Binderegion überträgt. Es stellt somit ein Schlüsselenzym für die Initiation der Heparansulfat-Biosynthese dar (Kitagawa *et al.* 1999). Jüngst wurde bewiesen, dass die shRNA-vermittelte Reduktion der *EXTL2*-Expression zu einer signifikanten Verminderung der Glycosaminoglykan-Synthese führt (Kaidonis *et al.* 2010). *Extl2* war ebenfalls eines der Gene, für die in o.g. *Trps1*<sup>+/-</sup>-Expressionsanalysen eine Hochregulation gezeigt werden konnte (Brega 2005).

#### 1.4.2.3 *MATN4*

Matrilin 4 ist ein Protein der Extrazellulären Matrix, das in der Epiphysenfuge exprimiert wird und während der Entwicklung der Gelenke auf der Gelenkoberfläche zu finden ist (Klatt *et al.* 2002). Es ist nicht viel bezüglich der Funktion des Genproduktes bekannt. Vermutlich dienen Matriline dazu, Proteoglykane und Collagene zu assoziieren. Matrilin 4 interagiert mit verschiedenen Proteoglykanen (Wiberg *et al.* 2003) und COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein; Mann *et al.* 2004), das seinerseits ebenfalls mit dem Proteoglykan Aggrecan sowie Collagen II interagiert (Chen *et al.* 2007, Rosenberg *et al.* 1998). In *Trps1*-defizienten Mäusen wird *Matn4* geringer exprimiert als in wildtypischen Geschwistern (Brega 2005).



#### 1.4.2.4 *LAPTM4B*

*LAPTM4B* fördert die Zellproliferation, indem es in die Regulation des Zellzyklus eingreift, und kann somit zur Entstehung von Tumoren beitragen (He *et al.* 2003). Das zugehörige Gen konnte als Zielgen des Transkriptionsfaktors *HOXB4* identifiziert werden, der wichtig für die Selbsterneuerung und Expansion hämatopoetischer Stammzellen ist (Lee *et al.* 2010). Des Weiteren konnten durch intergenes Spleißen entstandene Transkriptionseinheiten von *LAPTM4B* und *MATN2* gefunden werden (Maeda *et al.* 2005). Matrilin 2 ist ein weiteres Protein aus der Familie der Matriline, dessen Expressionsprofil mit dem von Matrilin 4 korrespondiert (Klatt *et al.* 2002). Die biologische Funktion des Lysosomal Associated Protein Transmembrane 4 beta ist gänzlich unbekannt. *Trps1*-defiziente Mäuse zeigen allerdings eine Hochregulation des entsprechenden Gens (Brega 2005). Interessanterweise ist *Matn2* hierbei ebenso hochreguliert gefunden worden.

#### 1.4.2.5 *EMP3*

Das Gen *EMP3* ist ein Tumorsuppressorgen, das epigenetisch reguliert ist und für das Epitheliale Membranprotein 3 codiert (Alaminos *et al.* 2005). Sein Genprodukt ist ein transmembranes Signalmolekül, das in Prozesse der Zellproliferation und Zell-Zell-Interaktion involviert ist. Man weiß, dass es eine entscheidende Rolle in der Regulation von Apoptose, Differenzierung und Invasion von Krebszellen spielt (Zhou *et al.* 2009). Seine genaue Funktion ist allerdings weitgehend unbekannt. Auch dieses Gen wurde in Expressionsanalysen an *Trps1*-defizienten Mäusen differenziell exprimiert gefunden (Brega 2005).

### 1.4.3 Zielgene des Transkriptionsfaktors TRPS1

Vier Gene wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen als Zielgene von TRPS1 publiziert. Der *RUNX2*-Promotor wurde 2005 von Napierala *et al.* per EMSA und Luciferase-Reporter-Gen-Assay als TRPS1-reprimiert identifiziert. 2007 wiesen Suemoto und Kollegen mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay und Chromatinimmunpräzipitation nach, dass der *Stat3*-Promotor durch Trps1 reguliert wird. Nishioka *et al.* konnten 2008 mithilfe derselben Methoden zeigen, dass Trps1 die *PTHrP*-Expression reguliert. Schließlich konnte auch das Gen *Bglap*, das Osteocalcin codiert, als Trps1-Zielgen identifiziert werden (Piscopo *et al.* 2009). Auch hier wurden Luciferase-Reporter-Gen-Assay und Chromatinimmunpräzipitation sowie shRNA-basierte Experimente durchgeführt.

#### 1.4.3.1 *RUNX2*

RUNX2 ist ein Transkriptionsfaktor aus der RUNX-TF-Familie, die durch Runt-DNA-Bindedomänen charakterisiert ist. RUNX2 ist von entscheidender Bedeutung für die Genese des Skelettes (s. 1.2 und Abb. 2). Er aktiviert *IHH* (Yoshida *et al.* 2004) und zusammen mit dem Coaktivator FHL2 führt RUNX2 zu einer Hochregulation von Osteocalcin (Günther *et al.* 2005). Des Weiteren wurde in zwei verschiedenen Arbeiten eine Interaktion mit *TRPS1/TRPS1* sowohl auf genetischer Ebene als auch auf Proteinebene gezeigt (Napierala *et al.* 2005, Napierala *et al.* 2008).

#### 1.4.3.2 *STAT3*

STAT3 steht für Signal Transducer and Activator of Transcription 3. Dieser Transkriptionsfaktor vermittelt die Expression einer Vielzahl von Genen in Erwiderung auf bestimmte Zellstimuli und spielt somit eine Schlüsselrolle in zellulären Prozessen wie Zellwachstum und Apoptose. Es steht als latenter Faktor im Cytoplasma zur Verfügung, der durch Phosphorylierung rasch aktiviert wird, wenn bestimmte Interleukine oder andere Wachstumsfaktoren exprimiert werden. 2007 konnte von Suemoto *et al.* gezeigt werden, dass die Regulation von Chondrozytenproliferation und –apoptose durch Trps1 Stat3-vermittelt vonstatten geht.

### 1.4.3.3 PTHLH

*PTHLH* (Parathyroid Hormone-Like Hormone) stellt das menschliche Homolog des murinen *PTHrP* (Parathyroid Hormone related Peptide) dar. Dieses hormonartige Peptid ist ein wichtiger Regulator der Chondrozytendifferenzierung. Im Rahmen der *Ihh*/*PTHrP*-Signalkaskade reguliert Indian hedgehog die Chondrozytendifferenzierung u.a. durch eine negative Rückkopplung mit *PTHrP*. *PTHrP* ist ein Inhibitor der Chondrozytendifferenzierung und wird von *Ihh* positiv reguliert (Vortkamp *et al.* 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Trps1*-Defizienz zu einer Hochregulation von *PTHrP* und somit zur Vergrößerung der Proliferationszone in der Knorpelplatte führt (Nishioka *et al.* 2008).

### 1.4.3.4 Osteocalcin

Osteocalcin, codiert von dem Gen *BGLAP*, ist ein Peptidhormon, das von Chondroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten gebildet wird. Es ist Teil der Extrazellulären Knochenmatrix und bindet an Hydroxylapatit, das ebenfalls Bestandteil der Knochenmatrix ist. Seine Funktion besteht in der Inhibition der Knochenmineralisierung, weshalb es auch als biochemischer Marker der Ossifikation dient. *BGLAP* wird direkt durch *RUNX2* reguliert (Geoffroy *et al.* 1995, Merriman *et al.* 1995). Die Ausschaltung des Gens führt zu einer abnormen Erhöhung der Knochendichte, da die Knochenbildung bei konstant bleibendem Knochenabbau zunimmt (Ducy *et al.* 1996). Der Transkriptionsfaktor *Trps1* wurde kürzlich als ein Repressor der *Bglap*-Expression identifiziert (Piscopo *et al.* 2009).

## 1.5 Zielsetzung

Bei etwa 5% der Patienten mit klinisch eindeutigem TRPS, lässt sich bislang keine krankheitsursächliche Mutation oder Deletion der kodierenden Region des *TRPS1*-Gens nachweisen. Solche Patienten könnten genetische Veränderungen im Promotorbereich des *TRPS1*-Gens, in anderen regulatorischen Elementen, die für die Regulation der Expression des *TRPS1*-Gens selbst bedeutend sind, oder in Zielgenen von TRPS1 aufweisen. Um die Wirkung von TRPS1 besser zu verstehen und den Transkriptionsfaktor in Proteinkomplexe und Signalwege einzuordnen, sollen zwei Teilprojekte verfolgt werden.

Im ersten Teil sollen direkte Zielgene von TRPS1 identifiziert und verifiziert werden, um Einsicht in die zelluläre Funktion von TRPS1 und so in die molekularen Ursachen der Entstehung der Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrome zu bekommen. Promotoren, an die TRPS1 bindet, sollen hierzu per Chromatinimmunpräzipitation und anschließender Sequenzierung der angereicherten DNA-Fragmente (ChIP-Seq) ermittelt werden. Eine Auswahl potentieller Zielgenpromotoren soll außerdem mittels funktioneller Assays verifiziert werden. Die Identifizierung TRPS1-regulierter Gene ist wichtig, um die Rolle von TRPS1 in entwicklungsrelevanten Signalwegen zu bestimmen.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollen der Transkriptionsstart näher bestimmt und die regulatorischen Elemente des *TRPS1*-Gens identifiziert und charakterisiert werden. Patienten mit ungeklärter Pathogenese sollen auf Veränderungen in diesen Elementen hin untersucht werden. Mittels Analyse der *TRPS1*-Expression soll dann deren Relevanz für die Pathogenese untersucht werden. Wenn möglich, soll die *TRPS1*-Expression in verschiedenen Zellsystemen untersucht werden, um gewebespezifische Regulatoren der *TRPS1*-Expression erkennen zu können. Die Identifizierung der regulatorischen Elemente wird dann zur Bestimmung der Faktoren führen, die *TRPS1* regulieren. Dies würde die Einordnung von TRPS1 in die relevanten Signalwege beschleunigen.

Patienten mit den charakteristischen TRPS-Merkmalen berichten immer wieder von zusätzlichen, bisher nicht in der Literatur beschriebenen gesundheitlichen Problemen. Dies weist darauf hin, dass zusätzlich zu den Minimalzeichen eines TRPS auch andere Organsysteme, möglicherweise mit verminderter Penetranz, betroffen sein können. Hierfür würde auch das recht breite Expressionsspektrum von

*TRPS1* sprechen. Die Kenntnis relevanter Pathways könnte demnach helfen, das klinische Spektrum der TRPS zu erweitern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Applied Biosystems (Darmstadt), BD Biosciences (Heidelberg), Clontech (Heidelberg), GE Healthcare (München), Life Technologies (Karlsruhe), Mallinckrodt Baker (Griesheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (NEB, Frankfurt), PeqLab (Erlangen), Promega (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in *pro analysis* Qualität bezogen.

#### 2.1.2 Standardlösungen

6x DNA-Ladefarblösung: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau oder Xylenblau,  
15 % (w/v) Ficoll PM 400,  
10 mM EDTA

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, pH 8,0  
1 mM EDTA

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,8  
1 mM EDTA

#### 2.1.3 Medien

##### 2.1.3.1 Medien und Agenzien für die Kultivierung von Bakterien

Sowohl Voll- als auch Festmedium wurde autoklaviert. Die Antibiotikumlösungen wurden durch Filtration sterilisiert.

LB-Medium:	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
LB-Platten:	LB-Medium + 1,5 % (w/v) Bacto-Agar
Ampicillin:	Endkonzentration 100 µg/ml
X-Gal:	Endkonzentration 80 µg/ml

### 2.1.3.2 Medien und Agenzien für die Kultivierung von Zellen

D-MEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose (Gibco, # 41966)  
+ 10 % (v/v) FBS  
+ 1 % (v/v) Pen/Strep

F-12 Nährstoffmischung (Ham) mit GlutaMAX I (Gibco, # 31765)  
+ 10 % (v/v) FBS  
+ 1 % (v/v) Pen/Strep

D-MEM/F-12 (1:1) (Gibco, # 11320)  
+ 5 % (v/v) FBS  
+ 1 % (v/v) Pen/Strep

RPMI 1640 Medium (Gibco, # 11875)  
+ 10 % (v/v) FBS  
+ 1 % (v/v) Pen/Strep

AmnioMAX-C100 (Gibco, # 12558) Kompletmedium für Primärzellen

Opti-MEM I (Gibco, # 31985) Serumreduziertes Medium für die Transfektion

FBS (Gibco, # 10108) Fötales Kälberserum

Pen/Strep (Gibco, # 15070) Penicillin-Streptomycin-Cocktail

Trypsin 0,05 % (Gibco, # 25300) Trypsingebrauchslösung

ITS-A 100x (Gibco, # 51300) Insulin-Transferrin-Selenium-Präparat

D-PBS (Gibco, # 14190) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

## 2.1.4 Mikroorganismen und Zelllinien

### 2.1.4.1 Bakterienstamm

Der Genotyp des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stammes ist unten aufgeführt. Der Stamm leitet sich von dem allgemeinen Laborstamm K12 ab.

Er diente Klonierungsexperimenten und ermöglichte bei Verwendung eines entsprechenden Vektors eine Blau-Weiß-Selektion transformierter Zellen.

*E. coli* DH5 $\alpha$ : F', endA1, hsdR17, ( $r_k^- m_k^+$ ), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal<sup>r</sup>), relA1, D(lacZYA-argF), U169, deoR, ( $\Phi$ 80dlacD(lacZ)M15)

### 2.1.4.2 Zelllinien und Primärkulturen

Die ATDC5-Zellen dienten als Donor von Gesamtproteinextrakt sowie quervernetzten Chromatins. Alle anderen aufgeführten Zelllinien wurden als Wirtssysteme für Luciferase-Reporter-Gen-Assays verwendet. Die kultivierten primären Fibroblasten dienten als Quelle für genomische DNA und Gesamt-RNA.

ATDC5	Aus der Teratokarzinom-Zelllinie AT805 abgeleitete murine embryonale Zelllinie, zur chondrogenen Differenzierung befähigt (RIKEN cell bank Number RCB0565, adhären, DMEM/F12)
CHO-K1	Ovarialzelllinie des Chinesischen Hamsters (ATCC Number CCL-61, adhären, F12)
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC Number CRL-1573, adhären, DMEM)
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Epithel-Zelllinie (ATCC Number CCL-2, adhären, DMEM und RPMI 1640)
NIH/3T3	Murine embryonale Fibroblastenzelllinie (ATCC Number CRL-1658, adhären, DMEM)
Fibroblasten	Aus Hautbiopsien von Patienten mit einem TRPS sowie gesunden Kontrollpersonen angelegte und kryokonservierte Primärkulturen (Die Kultivierung wurde von Regina Kubica im Institut für Humangenetik, UK Essen, durchgeführt.)



### 2.1.5 Enzyme

#### Restriktionsendonukleasen:

Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt am Main), in seltenen Fällen auch von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), bezogen.

#### Weitere Enzyme:

Expand High Fidelity PCR System (Roche)

GC-RICH PCR System (Roche)

GoTaq DNA Polymerase (Promega)

Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)

T4 DNA Ligase (Roche)

### 2.1.6 Größenstandards

DNA-Größenmarker: 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)  
pUC19/*MspI* (MBI Fermentas)  
FastRuler Low Range DNA Ladder (MBI Fermentas)  
FastRuler Middle Range DNA Ladder (MBI Fermentas)  
FastRuler High Range DNA Ladder (MBI Fermentas)  
GeneScan 120 LIZ Size Standard (Applied Biosystems)  
GeneScan 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems)

Protein-Größenmarker: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (MBI Fermentas)

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer, die nicht bereits im Institut für Humangenetik etabliert waren, wurden mit Hilfe des Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) entworfen. Die einzelnen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt. Mit der Synthese der Oligonukleotide wurde die Firma Biomers (Ulm) oder die Firma Eurogentec (Köln) beauftragt.

### 2.1.8 Vektoren

Alle genannten Vektoren enthalten das Gen *bla*, das für eine beta-Lactamase kodiert und somit Ampicillinresistenz vermittelt.

pGEM-T Easy	Vektor für die Klonierung von PCR-Produkten (Promega)
pCRII-TOPO	Vektor für die Klonierung von PCR-Produkten (Invitrogen)
pCS2-MT	eukaryotischer Expressionsvektor, CMV-Promoter reguliert die Expression der inserierten codierenden Sequenzen, die N-terminal mit einem Myc-Epitop gekoppelt sind (Roth <i>et al.</i> 1991, Turner und Weintraub 1994)
pcDNA3.1(+)/pcDNA4	eukaryotischer Expressionsvektor, CMV-Promoter reguliert die Expression der inserierten codierenden Sequenzen (Invitrogen)
pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]	Reportervektor mit dem promotorlosen Gen für die Firefly-Luciferase (Promega)
pGL4.74 [ <i>hRluc/TK</i> ]	Reporterplasmid zur Transfektionskontrolle, enthält das Gen für die Renilla-Luciferase unter Kontrolle des HSV-TK-Promotors (Promega)

Die auf Basis der o.g. Vektoren generierten Plasmide sind im Anhang aufgelistet.

### 2.1.9 Antikörper

Rabbit anti-TRPS1 (EP042228) polyklonaler Antikörper, hergestellt auf Anfrage durch Immunisierung von Kaninchen gegen das Peptid H<sub>2</sub>N – MVR KKN PPL RNV ASC – CONH<sub>2</sub> mit anschließender Affinitätsaufreinigung (Eurogentec). Dieses entspricht den ersten 14 Aminosäuren des humanen TRPS1-Proteins. Aufgrund hoher evolutionärer Konservierung detektiert der Antikörper ebenfalls das entsprechende Epitop im murinen Trps1-Protein.

Rabbit anti-LaminA (H-102) polyklonaler Antikörper, hergestellt durch Immunisierung gegen die Aminosäuren 563-664 des humanen LaminA-Proteins (SantaCruz, sc-20680). Der Antikörper weist sowohl das humane als auch das murine Protein nach.

Stabilized Goat anti-Rabbit HRP Conjugated (PIERCE, # 1858415), Meerrettichperoxidase-gekoppelter Zweitantikörper zur Detektion von Erstantikörpern aus Kaninchen.

Mouse anti-TBP (kch-225-010) monoklonaler Antikörper, hergestellt durch Immunisierung gegen die aminoternale Domäne des humanen TATA-Box bindenden Proteins (TBP). Der Antikörper ist Teil des Red ChIP Kits der Firma Diagenode.

Mouse anti-GFP (Roche, # 11814460001) Mischung zweier monoklonaler Antikörper, hergestellt durch Immunisierung gegen rekombinantes *Aequorea victoria*-GFP, getestet in Western-Blot und Immunpräzipitation.

#### **2.1.10 DNA**

Humane genomische DNA aus Fibroblasten bzw. Lymphozyten gesunder Kontrollindividuen sowie von Patienten mit einem TRPS.

Murine genomische DNA aus Schwanzbiopsien wildtypischer Tiere (zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Nicholas Wagner, Humangenetik UK Essen).

#### **2.1.11 RNA / cDNA**

Humane RNA aus Fibroblasten bzw. Lymphozyten gesunder Kontrollindividuen sowie von Patienten mit einem TRPS.

#### **2.1.12 Protein**

Für Western-Blot-Analysen im zeitlichen Verlauf wurde Gesamtproteinextrakt von verschieden lang zur chondrogenen Differenzierung induzierten sowie nicht induzierten ATDC5-Zellen isoliert.

### 2.1.13 Online-Datenbanken und Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende öffentlichen Informationsplattformen und Dienste genutzt:

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>)

Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>)

ECR Browser (<http://ecrbrowser.dcode.org/>)

Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>)

LALIGN ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html))

Zur Ausarbeitung von Klonierungsstrategien wurden außerdem verschiedene Programme des Software-Paketes Lasergene (DNASTAR) verwendet.

Zur statistischen Evaluation von Messergebnissen aus Reporteragen-Assays wurden T-Tests durchgeführt. Hierzu wurde die Software R genutzt:

R version 2.13.0 (2011-04-13)

Copyright (C) 2011 The R Foundation for Statistical Computing

ISBN 3-900051-07-0

Plattform: i386-pc-mingw32/i386 (32-bit)

## **2.2 Methoden**

Die nachfolgenden Arbeitsprotokolle wurden in Anlehnung an die Methodensammlungen von Sambrook und Russell (2001) durchgeführt, wenn nicht auf andere Literaturquellen verwiesen ist.

### **2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

#### **2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA**

Zur Präparation von genomischer DNA aus Leukozyten sowie kultivierten primären Fibroblasten wurde das FlexiGene DNA Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

##### DNA-Präparation aus peripherem Blut

Zu 2,5 ml FG1-Puffer wurde 1 ml EDTA-Blut gegeben und fünfmal invertiert. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 x g) und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden 500 µl mit 5 µl Proteinase K versetztem FG2-Puffer gegeben. Das Pellet wurde homogenisiert, der Ansatz dreimal invertiert und 10 min bei 56°C in einem Thermomixer (850 rpm) inkubiert. Zur anschließenden Fällung der DNA wurden 500 µl 100 % Isopropanol zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die DNA präzipitiert und mittels eines Glashakens aus der Lösung geangelt. Die präzipitierte DNA wurde dann in 70 % Ethanol gewaschen (Glashaken mit DNA in Reaktionsgefäß mit 70 % Ethanol getaucht), an der Luft getrocknet und in 100 – 250 µl FG3-Puffer abgestriffen. Es folgte eine einstündige Inkubation im 65°C-Heizblock, anschließend wurde die DNA zur vollständigen Resuspension über Nacht bei RT auf einem Taumel-Rollenmischer inkubiert.

##### DNA-Präparation aus Primärkulturen von Hautfibroblasten

Die Zellen wurden nach der Ernte (s. 2.2.3.2) in 500 µl PBS aufgenommen und bei 3000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1 ml FG1-Puffer resuspendiert und danach für 10 min auf einem Taumel-Rollenmischer inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Danach wurde erneut zentrifugiert (10 min, 3000 x g) und der Überstand verworfen. Zum Zellkernsediment wurden 500 µl mit 5 µl

Proteinase K versetzter FG2-Puffer gegeben. Das Pellet wurde homogenisiert, der Ansatz dreimal invertiert und 10 min bei 56°C und 850 rpm im Thermomixer inkubiert. Zur anschließenden Fällung der DNA wurden 500 µl 100 % Isopropanol zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die DNA präzipitiert und anschließend mit einem Glashaken aus der Lösung herausgeangelt. Es folgte ein Waschschrift in 70 % Ethanol. Dann wurde die DNA an der Luft getrocknet, in 100 – 250 µl FG3-Puffer 1 h im 65°C-Heizblock und anschließend bei RT über Nacht auf dem Taumel-Rollenmischer resuspendiert.

### **2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA**

Für die analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurden jeweils 3 ml LB-Ampicillin mit einer Einzelkolonie von entsprechend transformierten *E. coli* DH5α über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte im Allgemeinen nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979). Aus 1,5 ml der Übernachtskultur wurden die Zellen sedimentiert (4 min, 2600 x g), das Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 lysiert (5 min, RT). Dann wurden 300 µl Puffer P3 zur Fällung der SDS-Protein-Komplexe zugegeben und 15 min bei 10300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 500 µl 100 % Ethanol versetzt und das DNA-Präzipitat sedimentiert (20 min, 16000 x g, 4°C). Das Pellet wurde mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Puffer P1, P2 und P3 wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen. Dem P1-Puffer wurde vor dem ersten Gebrauch RNase A (ebenfalls Qiagen) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und das Gemisch von diesem Zeitpunkt an bei 4°C gelagert.

Zur Gewinnung größerer Mengen gereinigter Plasmid-DNA wurde das Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Hierbei wurden 250 ml Bakteriensuspension genutzt und die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die erhaltene DNA wurde in 100 – 300 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Um für Primärzelltransfektionen geeignete Plasmid-DNA zu gewinnen wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen genutzt. Hierbei wurden 100 ml Bakterienkultur eingesetzt und das Lysat durch Filtration zwischengereinigt, um einen Endotoxinentfernungsschritt zu ermöglichen. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte

wurden unter Nutzung endotoxin- und pyrogenfreier Materialien durchgeführt. Die isolierte DNA wurde entsprechend in 50 – 150 µl endotoxinfreiem TE-Puffer resuspendiert.

Puffer P1:	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
Puffer P2:	200 mM	NaOH
	1 % (w/v)	SDS
Puffer P3:	3 M	Kaliumacetat, pH 5,5

### 2.2.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Fibroblastenzellen

Zur Präparation von RNA aus kultivierten primären Fibroblasten wurde das QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die geernteten Zellen (s. 2.2.3.2) wurden sedimentiert (5 min, 3000 x g) und in 300 µl beta-Mercaptoethanol-enthaltenden RLT-Puffer lysiert. Die Homogenisierung des Lysates erfolgte mittels QIAshredder-Säulchen (2 min, max. speed), bevor 300 µl 70 % Ethanol zugegeben wurde. Das Gemisch wurde auf QIAamp-Minisäulen appliziert, um die Gesamt-RNA aus der Lösung an die Silicagelmembran zu binden (1 min, 8000 x g). Nachdem einmal mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen wurde, erfolgte eine DNase I-Behandlung der am Säulenmaterial gebundenen Nukleinsäuren, um DNA-Kontaminationen zu eliminieren. Hierzu wurde das RNase-Free DNase Set (ebenfalls Qiagen) nach Angaben des Herstellers genutzt. Anschließend wurde ein weiteres Mal mit 350 µl RW1-Puffer und 2 x mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen (1 min, 8000 x g). Vor der Elution der Gesamt-RNA in RNase-freiem H<sub>2</sub>O (2-schrittig in je 20 µl), wurde die Silicamembran trocken zentrifugiert (3 min, 20.000 x g). Die aufgereinigte RNA wurde direkt auf Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.2.1.4 DNase I-Behandlung von RNA

Falls sich nach der Präparation, trotz DNase-Behandlung auf der Säule, noch genomische DNA in der RNA-Probe befand, wurde eine zweite DNase I-Behandlung in Lösung durchgeführt. Dazu wurden in einem Ansatz ca. 5 µg RNA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, 3 U DNase I (Roche) und 1 U RNase Inhibitor (Applied Biosystems) gemischt und 4 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Denaturierung bei 95°C für 5 min und die RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### 2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung

Die genaue Konzentration von DNA und RNA in Proben wurde photometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Bei RNA- und proteinfreier DNA beträgt der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> 1,8. Bei reiner RNA liegt der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> zwischen 1,8 und 2,1.

Alternativ wurde die ungefähre DNA-Konzentration durch Auftragung eines Aliquots auf ein analytisches Agarosegel bestimmt. Durch den Intensitätsvergleich der Banden mit den Markerbanden in *MspI*-restringierter pUC19-DNA (s. 2.1.6), von denen die Konzentrationen bekannt sind, konnte die DNA-Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

#### 2.2.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR, nach Mullis *et al.* 1986)

Mittels der Polymerasekettenreaktion wurden spezifische DNA-Fragmente aus genomischer DNA, cDNA oder Plasmid-DNA amplifiziert. Standardmäßig wurde die GoTaq DNA Polymerase der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 1 x Polymerasepuffer, jeweils 20 pmol eines 5'- und eines 3'-Oligodesoxynukleotids (Primer), 10 nmol dATP, dGTP, dCTP und dTTP sowie 2,5 U Polymerase. Als Matrizen-DNA dienten 100 – 150 ng genomische DNA bzw. 50 – 100 pg Plasmid-DNA. Das Endvolumen betrug 50 µl. Es wurden in der Regel 35 Zyklen in einem Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt.



Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 30 sec, das Primer-Annealing für 30 sec, wobei die Annealing-Temperatur abhängig von den  $T_m$ -Werten der Primer war, und die Elongation erfolgte bei 72°C. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des erwarteten Amplikons (1 min/kb). Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 2 min bei 95°C eingefügt, nach dem letzten Zyklus eine Elongationsphase von 5 min bei 72°C.

Zur Amplifikation schwer amplifizierbarer, GC-reicher oder besonders langer DNA-Fragmente wurden spezielle Polymerasen (s. 2.1.5 „weitere Enzyme“) verwendet und die Reaktionsbedingungen gemäß den Herstellerangaben angepasst.

Für quantitative Analysen wurde die Universal Probe Library und das LightCycler 480 PCR-System der Firma Roche verwendet.

#### **2.2.1.7 Reverse Transkription von RNA (RT)**

Die RNA wurde mithilfe von Random Hexamers als unspezifische Primer revers transkribiert, um cDNA-Bibliotheken herzustellen. Hierfür wurden die Reagenzien des GeneAmp RNA PCR Kits (Applied Biosystems) verwendet. Der Reaktionsansatz für die Reverse Transkription enthielt 300 – 2000 ng RNA, 5 mM  $MgCl_2$ , je 1mM dNTPs, 1 U RNase Inhibitor, 2,5 U Reverse Transkriptase und 2,5  $\mu M$  Hexamere in 1 x PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl) in einem Endvolumen von 20  $\mu L$ . Die Reverse Transkription erfolgte anschließend in einem Thermocycler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) in drei Schritten: 10 min Hexamer-Annealing bei 21°C, 15 min Reverse Transkription bei 42°C, 5 min Denaturierung bei 99°C. Zu jedem RT-Ansatz wurde ein entsprechender Reaktionsansatz ohne Reverse Transkriptase erstellt. Zur Überprüfung der Integrität sowie zum Ausschluss einer Kontamination der RNA mit genomischer DNA, wurde an 5  $\mu L$  jedes +RT- und –RT-Ansatzes eine PCR mit Primern für Exon 4 und 5 des ubiquitär exprimierten  $\beta$ -Actin-Gens durchgeführt (Primersequenzen siehe Anhang). Diese Primer sind intronüberspannend konzipiert, so dass bei Reinheit der RNA ohne RT im Reaktionsansatz kein Produkt erhalten werden kann und nach RT nur ein Produkt erhalten wird, das die Integrität der RNA anzeigt (Buiting *et al.* 2001). Bei Kontamination der RNA mit genomischer DNA entsteht jedoch noch ein weiteres, größeres Produkt.

### 2.2.1.8 Amplifikation von cDNA-Enden (5'-RACE)

Bei der Methode der RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) werden an einer mRNA die Sequenzabschnitte zwischen der bekannten internen Sequenz und dem unbekanntem 5'- bzw. 3'-Ende amplifiziert (Frohman 1993, Ohara *et al.* 1989). Zunächst wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und dann erfolgt im Falle der 5'-RACE das Poly(A)-Tailing mit Hilfe der Terminalen Transferase (Roche). Hierbei wird an das 3'-Ende der cDNA ein Poly(A)-Schwanz angehängt. Dadurch können die Enden der mRNA in einer PCR mit einem spezifischen Primer für den Poly(A)-Schwanz (Oligo(dT)-anchor primer) und einem genspezifischen Primer amplifiziert werden. Für die RACE wurde das 5'/3' RACE Kit (2nd Generation, Roche) verwendet. Für die cDNA Synthese wurde das Protokoll des Herstellers modifiziert. Es wurde eine unspezifische Reverse Transkription mit Hexameren (siehe 2.2.1.7) durchgeführt. Alle darauf folgenden Arbeitsschritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden nach (größenselektiver) Reamplifikation per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.2.1.10), eluiert (s. 2.2.1.11), kloniert (s. 2.2.1.14) und sequenziert (s. 2.2.1.12).

### 2.2.1.9 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten sowie restringierter Plasmid-DNA wurde das MultiScreen Vakuum-Filtrationssystem der Firma Millipore (Schwalbach) nach Vorschrift des Herstellers benutzt, sofern keine vorherige elektrophoretische Trennung notwendig war. Dies wurde vorab mittels eines analytischen Agarosegels abgeklärt.

### 2.2.1.10 Agarose-Gelelektrophorese

Zur größenspezifischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden, abhängig von den jeweiligen Auflösungsanforderungen, Midigele aus 0,8 bis 2 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Den DNA-Proben wurde 6 x DNA Probenpuffer zugegeben und die Gelelektrophorese erfolgte bei 75 – 120 Volt in 1 x TAE-Laufpuffer mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid. Zur Ermittlung der spezifischen Größe der jeweiligen DNA-Fragmente dienten spezifische Größenstandards (siehe 2.1.6). Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid konnten die DNA auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 302$  nm sichtbar gemacht werden.

### 2.2.1.11 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurde das MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus den Agarosegelen ausgeschnitten. Das Gelstück wurde mit einem dreifachen Gelvolumen Puffer QC versetzt und bei 50°C für 10 min unter Schütteln gelöst. Die Lösung wurde anschließend mit einem Gelvolumen Isopropanol gemischt und mittels Silicamembransäulchen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde 2 x in je 10 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.1.12 Sequenzierung von DNA (nach Sanger *et al.* 1977)

Die Sequenzierung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wurde nach der Sanger-Methode unter Verwendung fluoreszenzmarkierter 2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphate als Terminatoren durchgeführt. Hierzu wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) genutzt. Einer 10 µl Sequenzierreaktion wurden 2,5 µl Terminator Ready Reaction Mix BigDye, 20 – 200 ng aufgereinigtes PCR-Produkt oder 500 – 1000 ng Plasmid-DNA als Matrize und 5 pmol des jeweiligen Primers zugesetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach folgenden Parametern: Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von

1 min bei 96°C eingefügt. Im Anschluss daran wurden 25 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 96°C für 10 sec, das Primer-Annealing bei 45 – 60°C (abhängig von dem T<sub>m</sub>-Wert des Primers) für 5 sec und die Elongation bei 60°C für 4 min. Der Reaktionsansatz wurde anschließend per Gelfiltration über Sephadex G-50 Säulenmaterial (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Elektrophorese erfolgte auf dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme Sequencing Analysis (Applied Biosystems) und Lasergene (DNASTAR).

#### **2.2.1.13 Restriktionsendonukleaseverdau**

Für analytische und präparative Zwecke wurden 1 – 10 µg Plasmid-DNA mit 10 – 60 U Restriktionsendonuklease in dem jeweiligen vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 – 2 h bei 37°C verdaut. Die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease wurde dem Maßstab der Reaktion angepasst und war außerdem davon abhängig, ob es sich um eine Hydrolyse mit nur einem Enzym oder um einen Doppelverdau handelte.

Bei Bedarf wurde im Anschluss an den Restriktionsendonukleaseverdau eine Dephosphorylierung mittels 1 U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, usb) durchgeführt um spontane Religationen zu vermeiden.

#### **2.2.1.14 Ligation**

PCR-Produkte wurden für Sequenzierungszwecke immer in den pGEM-T Easy Vektor inkloniert. Die Ligation erfolgte dabei durch die mitgelieferte Ligase im entsprechenden Ligationspuffer nach Anleitung des Herstellers.

Standardmäßig wurden auch PCR-Produkte für Expressions- oder Reportergerkonstrukte zunächst in die Vektorsysteme pGEM-T Easy oder pCRII-TOPO subkloniert, wobei ebenfalls gemäß der Herstellerangaben verfahren wurde.

Die Ligation von Restriktionsfragment und Zielvektoren wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 5 U T4 DNA Ligase (Roche) durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA betrug dabei 1:3 – 1:6. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und dann zur Transformation herangezogen.

Alle Ligationsansätze wurden ohne vorherige Hitzeinaktivierung direkt in kompetente Bakterienzellen transformiert (s. 2.2.2.1 und 2.2.2.2).

#### **2.2.1.15 *In vitro* Mutagenese**

Für funktionelle Studien wurde unter Verwendung des QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) eine spezifische Mutation in ein Reporterkonstrukt eingeführt. Die Methodendurchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Das hier verwendete *in vitro* System beruht auf der Verwendung spezifisch veränderter Primer in der PCR. Für die in dieser Arbeit generierte Basensubstitution wurden Primer von 30 bp Länge verwendet, die im mittleren Teil die gewünschte Substitution aufwiesen. Als Template diente hierbei das Ursprungsplasmid (wildtypische Plasmid), welches die zu mutierende Sequenz enthält. Nach gezielter Degradation der Template-DNA mithilfe des methylierungsspezifischen Enzyms *DpnI* wurden direkt kompetente Bakterien mit dem zirkulären PCR-Produkt transformiert.

Eine ähnliche Strategie wurde auch für die Deletion eines Exons aus einem Expressionsplasmid gewählt. Hier wurden Primer verwendet, die die zu deletierende Region flankierten, wobei einer der Primer am 5'-Ende phosphoryliert war, um eine Zirkularisierung des PCR-Produkts zu ermöglichen. Das Plasmid wurde, mit Ausnahme des ausgesparten Exons, mittels Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) amplifiziert.

#### **2.2.1.16 Quantitative Primer Extension Analyse allelischer Transkriptverhältnisse**

Bei dieser Technik macht man sich exprimierte Polymorphismen in biallelisch exprimierten Genen zu Nutze. Hierfür ist essenziell, dass die zu untersuchende Person heterozygot für einen exprimierten SNP ist, damit die beiden Allele sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene unterschieden werden können. Für die quantitative Analyse allelischer Transkriptverhältnisse wurde das ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems) angewendet. Hierzu wurde zunächst eine PCR-Amplifikation der SNP-enhaltenen Region an genomischer DNA sowie cDNA mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt (siehe 2.2.1.6 und 2.2.1.7). Die

PCR-Produkte wurden denaturiert und ein Primer angelagert, der komplementär zu dem Bereich direkt vor dem zu untersuchenden Polymorphismus ist. Dieser wurde gemäß den Herstellerangaben mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden verlängert. Ein Reaktionsansatz (10 µl) setzte sich aus 100 ng aufgereinigtem PCR-Produkt, 5 µl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix und 2 µl Primer (0,2 µM) zusammen. Die SNaPshot-Reaktion erfolgte nach folgenden Parametern: Einer initialen Denaturierung von 3 min bei 96°C folgten 25 Zyklen aus je 10 sec Denaturierung bei 96°C, 5 sec Annealing bei 45 – 60°C (abhängig vom jeweiligen Primer) und 30 sec Elongation bei 60°C. Jeder Reaktionsansatz wurde verlustfrei durch Zugabe von 1 U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase der Firma usb) mit anschließender Inkubation bei 37°C für 60 min und Inaktivierung des Enzyms bei 75°C für 15 min aufgereinigt. Je 1 µl des aufgereinigten SNaPshot-Produktes wurden mit 8,5 µl Formamid (FA) und 0,5 µl GeneScan 120 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) gemischt. Nach Elektrophorese durch den ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer sowie Analyse durch die GeneScan-Software und das Programm Genotyper (Applied Biosystems), konnten die beiden elterlichen Allele und dessen Transkripte unterschieden werden. Zur quantitativen Analyse wurde das Verhältnis der Signalintensitäten (Peak-Integrale) der beiden allelischen Transkripte berechnet und gegen das Verhältnis der Signalintensitäten der beiden Allele auf DNA-Ebene normalisiert.

#### **2.2.1.17 Mikrosatellitenanalyse**

Die Mikrosatellitenanalyse wurde durchgeführt wie in Nardmann *et al.* 1997 beschrieben. Ein Aliquot der entsprechenden PCR wurde dann mit GeneScan 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems) und Formamid versetzt. Nach Elektrophorese durch den ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer wurden die Daten wie in 2.2.1.16 beschrieben analysiert.

### 2.2.1.18 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Um die Kopienzahl verschiedener Loci zu untersuchen wurde das SALSA MLPA Kit P288 TRPS1-LGS der Firma MRC Holland nach Herstellerangaben angewandt. Dieses Kit enthält je zwei Sonden für die *TRPS1*-Exons 1, 3, 4, 5, und 7, und je eine Sonde für die Exons 2 und 6. *EXT1* ist durch je eine Sonde in den Exons 1, 2, 8 und 11 repräsentiert. Eine Sonde liegt im Exon 8 von *EIF3H*, das zwischen *TRPS1* und *EXT1* lokalisiert ist. Ferner enthält es Sonden für die Gene *EIF3E*, *EBAG9* und *CSMD3*, die proximal von *TRPS1* liegen, und für *SAMD12*, *TNFRSF11B*, *NOV*, *MTBP*, *HAS2*, *RNF139*, *MTSS1*, *MYC* und *DDEF1*, die alle distal von *EXT1* liegen.

## 2.2.2 Bakterien

### 2.2.2.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Bakterienzellen wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode für die Aufnahme freier DNA kompetent gemacht (chemisch-kompetente Zellen). Eine Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  wurde in 10 ml b-Medium bei 37°C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,3 inkubiert (Ultrospec III, Pharmacia LKB). Von der Kultur wurden 5 ml in 100 ml b-Medium überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator weiter bebrütet. Bei Erreichen eines OD<sub>550</sub>-Wertes von 0,48 wurden je 25 ml der Kultur in vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 1250 x g und 4°C sedimentiert und das Pellet vorsichtig in 10 ml kaltem TfbI-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis (90 min) wurden die Zellen erneut für 15 min bei 1250 x g und 4°C sedimentiert und das Pellet in 1 ml kaltem TfbII-Puffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 100  $\mu$ l-Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

b-Medium:            2 % (w/v) Bacto-Trypton  
                          0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
                          0,5 % (w/v) MgSO<sub>4</sub>  
                          pH 7,6 mit KOH eingestellt, autoklaviert

Tfbl-Puffer: 30 mM KOAc  
100 mM RbCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % Glycerin  
pH 5,8 mit 0,2 M HAc eingestellt, sterilfiltriert

TfbII-Puffer: 10 mM MOPS  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM RbCl  
15 % Glycerin  
pH 6,5 mit KOH eingestellt, sterilfiltriert

### 2.2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Es wurden 5 µl eines Ligationsansatzes oder 1 – 10 ng Plasmid-DNA zu 50 µl kompetenten Bakterienzellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 2 min bei 42°C, gefolgt von einer 2-minütigen Abkühlungsphase auf Eis. Dies dient der weiteren Erhöhung der Durchlässigkeit der chemisch bereits entsprechend vorbereiteten Zellmembran. Zur Regeneration der Bakterien wurden 450 µl LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension (je 100 µl und 400 µl des o.g. Ansatzes) wurde dann auf antibiotikumhaltigem Festmedium ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert, um plasmidtragende Klone zu selektionieren. Sollte per Blau-Weiß-Selektion abgeschätzt werden, ob das transformierte Plasmid das DNA-Fragment von Interesse inseriert hatte, so wurden Platten verwendet, die zusätzlich das Substrat X-Gal enthielten.

### 2.2.3 Zellkultur

Alle Säugerzelllinien und Primärkulturen wurden in Brutschränken bei 37°C, unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt und sämtliche Geräte und Lösungen vor der Benutzung sterilisiert.



### **2.2.3.1 Auftauen von kryokonservierten Zellen**

Die eingefrorenen Kulturen wurden dem Stickstofftank entnommen, aufgetaut, mit 9 ml Kulturmedium (37°C) gemischt und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Wiederauftauen der Zellen muss im Gegensatz zum Einfrieren rasch erfolgen, um die wieder stoffwechselaktiv werdenden Zellen möglichst nur kurz dem toxisch wirkenden DMSO auszusetzen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium (37°C) resuspendiert. Die Suspension wurde in eine große Gewebekulturflasche (75 cm<sup>2</sup>, Greiner Bio-One) überführt und bis zur Subkonfluenz im Brutschrank inkubiert. Sofern diese nicht bereits nach zwei bis drei Tagen erreicht war, wurden die Zellen nach dieser Zeit mit frischem Medium gefüttert.

### **2.2.3.2 Passagieren von Zellen**

Die Zellen wurden bei Subkonfluenz geerntet. Das Kulturmedium wurde von den adhärent wachsenden Zellen vollständig abgenommen, die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen und durch eine 3 – 5-minütige Inkubation mit Trypsinlösung abgelöst. Durch Zugabe eines 5-fachen Überschusses an Kulturmedium, wurde das Trypsin inaktiviert. Nach Zentrifugation (5 min, 200 x g) wurde das Zellsediment in frischem Kulturmedium resuspendiert und ein Zehntel der geernteten Zellen wurde zur weiteren Kultivierung in eine neue Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>, Greiner Bio-One) gegeben. Die auf diese Weise geernteten Zellen konnten auch direkt für die Isolation von Nukleinsäuren herangezogen werden. Für Luciferase-Reportergen-Assays wurde die Zellzahl in der Suspension mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und es wurden je 1 – 2 x 10<sup>4</sup> Zellen in 100 µl Medium in 96-well Zellkulturplatten (Microplates 96 well, white, clear bottom; Berthold Technologies, # 24910) ausgesät.

### **2.2.3.3 Differenzieren von Zellen**

Zur Differenzierung von ATDC5-Zellen wurde dem Kulturmedium bei Erreichen von 75 % Konfluenz das Präparat ITS-A (s. 2.1.3.2) in einfacher Konzentration zugegeben. ATDC5-Zellen beginnen durch Anwesenheit dieses Präparats mit einer chondrogenen Differenzierung, welche sich morphologisch durch die Bildung von

Aggregaten knorpelähnlichen Gewebes (Atsumi *et al.* 1990), aber auch molekular durch die Umstellung des Transkriptoms (Chen *et al.* 2005, Osawa *et al.* 2006) zeigt. Während der weiteren Kultivierung wurde das Kulturmedium mit ITS-A (Differenzierungsmedium) jeden zweiten Tag durch frisches ersetzt.

Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen jeden zweiten Tag eine Differenzierungskultur geerntet und für die Protein-Analytik herangezogen (s. 2.2.4.2 – 2.2.4.5).

Für Chromatinimmunpräzipitationen wurden die Kulturen 8 Tage lang differenziert, eine Crosslinking-Reaktion durchgeführt und die Zellen daraufhin geerntet (s. 2.2.4.6).

#### **2.2.3.4 Transiente Transfektion von Säugerzellen**

Die Transfektion von Zellen erfolgte mittels FuGENE HD (Roche). Hierzu wurde das Transfektionsreagenz, sobald es Raumtemperatur hatte, gevortext und ohne Gefäßwände zu berühren in Opti-MEM I Medium ohne FBS verdünnt. Anschließend wurden die entsprechenden, ebenfalls in Opti-MEM I aufgenommenen Plasmide, mit der dreifachen Menge (w/v) an FuGENE HD, bezogen auf die Menge der zu transfizierenden DNA, versetzt. Nach 20 – 30-minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz (je 46 µl) vorsichtig auf die zu transfizierenden Zellen (96-well-Format, s. 2.2.3.2) gegeben, welche nun 40 – 48 h unter Standardbedingungen weiter kultiviert wurden.

#### **2.2.3.5 Luciferase-Reportergen-Assay**

Um die Fähigkeit eines DNA-Abschnitts als Promotor zu wirken, aber auch den Effekt von Transkriptionsfaktoren auf solche potenziellen Promotoren zu untersuchen, wurden Luciferase-Reportergen-Assays durchgeführt. Die hierfür durchgeführten Zelltransfektionen erfolgten mittels FuGENE HD (Roche). Es wurden das jeweilige Reporterkonstrukt (pGL4.10 [*luc2*]-Konstrukte; je 200 ng) und ggf. das für den jeweiligen Effektor kodierende Plasmid (pCS2-MT- oder pcDNA-Konstrukte; je 333 ng) cotransfiziert. Um die Menge der verwendeten DNA innerhalb eines Experiments konstant zu halten, wurden die Ansätze bei Bedarf mit leerem Vektor aufgefüllt. Zur

Kontrolle der Transfektionseffizienz und zur internen Standardisierung wurde zusätzlich ein Reporterplasmid (5 ng) transfiziert, das das Gen für die Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des HSV-TK-Promotors enthält (pGL4.74 [*hRluc/TK*]). Alle transfizierten Plasmide wurden unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment gelelektrophoretisch auf ihre Integrität hin überprüft. Des Weiteren wurden die TRPS1-Expressionsplasmide vorab in CHO-Zellen auf Proteinebene auf ihre Expression getestet. Die Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurden mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) durchgeführt. 40 – 48 Stunden nach Transfektion wurde das Medium von den adhären wachsenden Zellen abgesaugt und die Zellen mit D-PBS gewaschen. Dann wurden sie in je 20 µl 1 x Passive Lysis Buffer (Promega) aufgenommen und für 20 – 30 min lysiert. Die Messung der Luciferase-Aktivitäten erfolgte vollautomatisch mit Hilfe des Luminometers Centro LB 960 (Berthold Technologies). Die relative Luciferase-Aktivität wurde berechnet, indem der Quotient aus der Firefly-Luciferase-Aktivität und der Renilla-Luciferase-Aktivität, unter Verwendung der Software MicroWin 2000 von Mikrotek Laborsysteme, gebildet wurde. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme des Microsoft Office-Programms Excel.

#### **2.2.3.6 Kryokonservierung von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Kulturen geerntet, in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde dann erneut bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert, so dass die Zelldichte  $1 \times 10^6$  Zellen/ml betrug. Die zur Kryokonservierung vorbereiteten Zellen wurden dann in Aliquots von je 1 ml schonend eingefroren (24 h Lagerung in einem Isopropanol-gefüllten Einfrierkontainer bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ) und schließlich dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert. Dieses schrittweise Vorgehen und die Verwendung von DMSO sind nötig, um der intrazellulären Bildung von  $\text{H}_2\text{O}$ -Kristallen entgegenzuwirken.

Einfriermedium:    80 % (v/v) Kulturmedium  
                          10 % (v/v) FBS  
                          10 % (v/v) DMSO

## 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.4.1 *In vitro* Translation von Proteinen

Zur *in vitro* Synthese von Proteinen wurde das TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) verwendet. Als Template-DNA dienten Vektoren, die die cDNA des entsprechenden Gens unter der Kontrolle des T7-Promotors enthielten. Jeder Ansatz (50  $\mu$ l) enthielt 25  $\mu$ l Retikulozytenlysats, 2  $\mu$ l Reaktionspuffer, 1  $\mu$ l T7-Polymerase, 1  $\mu$ l Aminosäure-Mix, 2  $\mu$ l Ribonuklease-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l) und das DNA-Template (1  $\mu$ g). Der Reaktionsansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert, aliquotiert (je 5  $\mu$ l) und bei Bedarf bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.4.2 Gesamtproteinextraktion aus ATDC5-Zellen

Um Gesamtprotein zu extrahieren, wurden die adhärenz gewachsenen Zellen 1 x mit kaltem D-PBS gewaschen und mit Hilfe eines Gummischarbers in ein weiteres Aliquot D-PBS vom Kulturschalenboden gekratzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (175 x g, 5 min, 4°C) sedimentiert und in Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Das so gewonnene Lysat wurde sofort schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Nach dem schonenden Auftauen der Proben auf Eis, wurde eine vollständigen Lyse der Zellen durch Vortexen, unterbrochen von mehreren 5-minütigen Abkühlungsphasen auf Eis, erreicht. Nach Sedimentierung aller unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Gesamtproteinextrakt in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und sogleich für eine Konzentrationsbestimmung herangezogen (siehe 2.2.4.3).

Lysepuffer:            25 mM Tris-HCl  
                          375 mM NaCl  
                          1 mM CaCl<sub>2</sub>  
                          1 % (v/v) Triton-X-100  
                          auf pH 7,4 eingestellt  
                          vor Gebrauch 1mM DTT und Proteaseinhibitor-Cocktail  
                          Complete Mini EDTA-free von Roche frisch dazu

### 2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung (nach Bradford 1976)

Dieser Test beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie-Blau bei der Bindung an Proteine von 465 nm auf eine Wellenlänge von 595 nm verschiebt. Es wurde jeweils 1 ml Bradford Reagenz mit 1 µl Proteinextrakt versetzt, 5 min bei RT inkubiert, um eine Vervollständigung der Farbreaktion zu ermöglichen, und die Absorption bei 595 nm photometrisch (Ultrospec III, Pharmacia LKB) bestimmt. Parallel wurde auf gleiche Weise mit BSA-Lösungen verschiedener bekannter Konzentrationen als Standards verfahren. Mit Hilfe dieser Eichkurve konnten die Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten bestimmt werden.

Bradford Reagenz:           0,01 % (w/v) Coomassie G250  
                                  5 % (v/v) Ethanol  
                                  10 % (v/v) Phosphorsäure

### 2.2.4.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, nach Laemmli 1970)

Die Proteine wurden in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen (7,5 %, 1 mm) elektrophoretisch nach ihrer apparenten molekularen Masse aufgetrennt (Minigelapparatur Mini-PROTEAN III, BIO-RAD). Für eine Analyse durch SDS-PAGE wurden pro Spur 50 – 100 µg Gesamtprotein mit 4 x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95°C denaturiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und in 1x SDS-Laufpuffer bei 15 – 20 mA für 2 – 4 h aufgetrennt. Anhand des Größenstandards PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (s. 2.1.6), konnten dann die molekularen Massen der aufgetrennten Proteine abgeschätzt werden. Für den immunologischen Nachweis wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

4 x SDS-Probenpuffer:   62 mM Tris-HCl, pH 6,8  
                                  2 % (w/v) SDS  
                                  10 % (v/v) Glycerin,  
                                  5 % (w/v) DTT  
                                  5 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
                                  0,025 % (w/v) Bromphenolblau

1x SDS-Laufpuffer:           125 mM Tris  
                                  200 mM Glycin  
                                  1 % (w/v) SDS

#### 2.2.4.5 Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot)

Zum Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wurde das Semi-Dry-Verfahren (Trans-Blot SD, BIO-RAD) angewendet. Dazu wurde auf der Graphit-Anode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgeschichtet: Ein Extra Thick Blot Paper (BIO-RAD), eine Amersham Hybond-C Extra Membran (GE Healthcare), das Proteingel und abschließend ein weiteres Extra Thick Blot Paper. Alle Komponenten wurden vorab 5 min in Transfer-Puffer inkubiert. Es wurde 70 min bei 20 Volt transferiert. Der Erfolg des Proteintransfers konnte direkt anhand des vorgefärbten Größenstandards (s. 2.1.6) auf der Nitrocellulosemembran überprüft werden. Zur Kontrolle des gleichmäßigen Proteintransfers wurden die Proteinbanden auf dem Membranträger jedoch zusätzlich einer reversiblen Ponceau-Rot-Färbung unterzogen (Salinovich und Montelaro 1986), bevor dieser in TBS-Puffer gewaschen wurde. Zum Nachweis spezifischer Proteine wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierlösung abgesättigt (Inkubationszeit 45 min bei RT). Anschließend wurde der Blot mit dem spezifischen Antikörper in Blockierlösung für 90 min bei RT auf einem Schütteltisch inkubiert. Der anti-TRPS1-Antikörper wurde hierbei 1:900, der anti-LaminA-Antikörper 1:8000 in Blockierlösung eingesetzt. Die Membran wurde 3 x 5 min in TBS gewaschen und für 1 h mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Zweitantikörper (1:900 in Blockierlösung) bei RT inkubiert. Nach 3-maligem Waschen für je ca. 10 min in TBS wurde der Western-Blot entwickelt. Aufgrund der spezifischen Bindung der Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörper, konnten Proteine indirekt durch Immundetektion sichtbar gemacht werden, da das Enzym das SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (ThermoScientific) unter Emission von Photonen umsetzt (Durrant 1990, Schneppenheim *et al.* 1991). Der Membranträger wurde hierzu 5 min in der aktivierten Entwicklerlösung geschwenkt und anschließend in Haushaltsfolie eingeschlagen. Die Lichtemission führt zu einer Schwärzung an der entsprechenden Stelle auf einem Röntgenfilm, der nach einer Expositionszeit von 22 sec bis 24 min gemäß den Herstellerangaben entwickelt wurde (Super RX, Fuji).

---

Transfer-Puffer:	49,5 mM Tris 192 mM Glycin 0,0375 % (w/v) SDS 15 % (v/v) Methanol
Ponceau-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S 0,5 % (v/v) Essigsäure
TBS-Puffer:	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
Blockierlösung:	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS

#### 2.2.4.6 Chromatinimmunpräzipitationen

Die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) wurde mit Hilfe des Red ChIP Kits der Firma Diagenode (Liège, Belgien) durchgeführt. Diese Technik erlaubt die Analyse der Assoziationen von Proteinen (im Speziellen Transkriptionsfaktoren) mit spezifischen genomischen Regionen in der DNA, so wie sie *in vivo* auftreten. Hierzu werden geeignete Zellsysteme (in dieser Arbeit zur chondrogenen Differenzierung induzierte und somit *TRPS1* exprimierende ATDC5-Zellen) mittels Formaldehyd fixiert, so dass im Chromatin reversible kovalente DNA-Protein-Bindungen entstehen. Anschließend werden die Zellen zerstört und das Chromatin mittels Ultraschall in Stücke von einigen hundert Basenpaaren Länge zertrümmert. Jene DNA-Stücke, die das gewünschte Protein gebunden haben, werden mit einem für das Protein spezifischen Antikörper immunpräzipitiert (isoliert). Die kovalenten Bindungen der DNA-Protein-Komplexe werden wieder hydrolysiert, woraufhin die DNA aus dem Gemisch aufgereinigt wird. Die Identität der jeweiligen DNA-Stücke kann dann auf verschiedene Weise geklärt werden: Hat man eine Hypothese über den wahrscheinlichen Bindungsort im Genom, kann man eine PCR unter Verwendung von Primern durchführen, die spezifisch für die vermutete DNA-Region sind. Ist man hingegen daran interessiert alle Bindungsstellen des Proteins im gesamten Genom aufzuspüren, kann ein Microarray (ChIP-on-Chip) oder massives Parallelsequenzieren der Gesamtheit aller isolierten DNA-Fragmente (ChIP-Seq) angeschlossen werden.

### Shearing Module

Das erste Modul des Kits wurde unter Durchführung der Scraping-Methode (Step 1-a) gemäß den Herstellerangaben für eine Zellmenge von  $1,5 \times 10^7$  Zellen angewandt. In Step 2 musste beachtet werden, dass der Puffer D bis zur Lösung aller sichtbaren Präzipitate aufgewärmt werden musste, bevor das benötigte Aliquot abgenommen, mit Protease-Inhibitor-Mix versetzt und wieder abgekühlt wurde. Für Step 3 wurde das für die Scherung vorbereitete Chromatin auf zwei 1,5 ml-Schraubdeckelreagiergefäße aufgeteilt und der Bioruptor (ebenfalls Diagenode) für 15 Zyklen (30 sec on / 30 sec off) auf hoher Leistungsstufe angewendet. Nach dem Zentrifugationsschritt wurden die beiden Überstände wieder vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterbearbeitung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### ChIP Module

Die IP-Ansätze wurden strikt nach Anweisungen des Kit-Lieferanten unter Verwendung von  $4 \mu\text{g}$  eines jeden Antikörpers (anti-TBP für die Positivkontrolle, anti-TRPS1 als spezifischer AK von Interesse, anti-GFP als unspezifischer AK für die Negativkontrolle) angesetzt. Zusätzlich wurde ein Ansatz ohne Antikörper als Negativkontrolle hergestellt. Die Zentrifugationsschritte beim Waschen und Eluieren des Chromatins erfolgten bei ca.  $400 \times g$  in einem Kühlraum. Nach der Elution bei RT erfolgte die Hydrolyse (Reverse Crosslinking) für 4 h bei 500 rpm und  $65^\circ\text{C}$  in einem Thermoschüttelinkubator. Von diesem Schritt an wurde parallel zu den ChIP-Ansätzen ein Aliquot des Chromatin-Inputs mitbehandelt, um eine Kontroll-DNA zu erhalten, in der keinerlei Anreicherung stattgefunden haben kann. Die EtOH-Fällung, die sich an die Phenol-Chloroform-Aufreinigung anschloss, erfolgte über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$ . Die per ChIP isolierte und aufgereinigte DNA wurde schließlich in  $100 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und zur vollständigen Resuspension 1 h bei  $25^\circ\text{C}$  und 1400 rpm im Thermoschüttler inkubiert.

### PCR Module

Für die Analyse der ChIP per PCR wurde das murine Primer-Set der Firma Diagenode (Gapdh promoter, Gapdh p-0,6kb, Gapdh p-1,1kb, Myoglobin exon 2) verwendet. Zusätzlich kamen Primer für Promotorbereiche putativer Trps1-Zielgene (s. Anhang) zum Einsatz. Allerdings wurde auf eine Analyse per quantitativer



Echtzeit-PCR verzichtet. Stattdessen wurden konventionelle PCR-Reaktionen durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

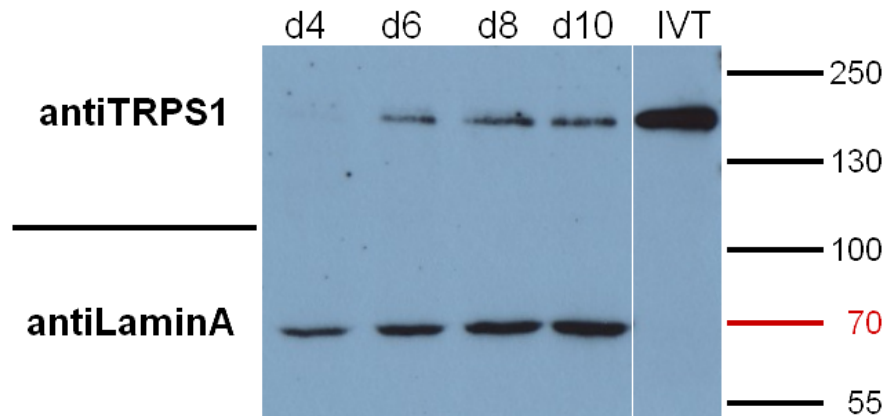
*TRPS1* wird zwar in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, jedoch erlauben nur wenige dieser Gewebe eine schnelle und unproblematische Beschaffung von entsprechenden Patientenproben in ausreichenden Mengen. Ferner sind diese Proben weitgehend ungeeignet für zellbasierte Analysemethoden. Auch wenn man auf das Mausmodell zurückgreift, eignen sich nur wenige Gewebe für solche Experimente. Es bestehen hier zum einen Schwierigkeiten bzgl. der Ausbeute an entsprechendem Material, insbesondere wenn die stark *Trps1*-exprimierenden fetalen Gewebe in Augenschein genommen werden sollen. Zum anderen stellt auch die fehlende Reinheit der Gewebe ein Problem dar. So war z.B. in vorangegangenen Experimenten aufgefallen, dass sich Gliedmaßen von Mausembryonen nur bedingt für Expressionsanalysen *Trps1*-regulierter Gene eignen. Die Heterogenität dieser Proben (Gemisch aus Knorpel-, Knochen-, Haut- aber auch Muskelzellen) kann die *Trps1*-abhängigen Effekte verdünnen oder verfälschen, die für einen bestimmten Zelltyp zu finden wären. Daher war die Auswahl eines geeigneten Zellsystems notwendig, um dieses Forschungsprojekt weiter zu verfolgen. Unsere Wahl fiel auf die chondrogene Zelllinie ATDC5, die eine definierte Umgebung für die Durchführung reproduzierbarer Analysen sicherstellen sollte.

#### 3.1 Proteinbiochemische Analyse von chondrogen differenzierten ATDC5-Zellen (Zeitverlauf)

Die Zelllinie ATDC5 ist durch die Zugabe von Insulin ins Kulturmedium zur chondrogenen Differenzierung induzierbar. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach einigen Tagen sowohl ihre Morphologie als auch ihr Expressionsprofil ändern. So kommt es nach ca. 10 Tagen zur sichtbaren Bildung von Knorpelaggregaten, wobei aber noch bis zum Tag 21 postkonfluentes Zellwachstum zu verzeichnen ist (Shukunami *et al.* 1996). Des Weiteren wird die Expression von Genen initiiert, die spezifisch für die Chondrogenese sind. Beispielsweise findet man nach zweiwöchiger Induktion eine Hochregulation von Aggrecan und Typ II Collagen (Shukunami *et al.* 1996), wichtigen Bestandteilen der Extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe (s. Einleitung). Auch weitere, für die Knochenentwicklung

interessante Gene, konnten differentiell exprimiert gefunden werden. Beispielsweise die *PTHrP*-Transkription wurde über einen vierwöchigen Zeitraum verfolgt und ein Maximum nach zwei- bis dreiwöchiger Induktionsphase nachgewiesen (Shukunami *et al.* 1996). Die Gene *Matn4*, *Ihh*, *Runx2* und *Bmp2* sind ebenfalls während einer 17-tägigen Induktionsphase entweder fortlaufend oder vorübergehend hochreguliert, zum Teil schon nach zwei bis vier Tagen (Chen *et al.* 2005). In diesem Projekt sollte zunächst festgestellt werden, ob ähnliches auch für *Trps1* gilt.

Die Feststellung eines Zeitpunktes, zu dem das *Trps1*-Gen in dem gewählten Modellsystem hochexprimiert ist, ist essentiell für die erfolgreiche Durchführung einer entsprechenden Chromatinimmunpräzipitation. Nur wenn der Transkriptionsfaktor auf Proteinebene detektierbar ist, kann angenommen werden, dass das endogene Protein auch in hinreichender Menge für eine Präzipitation vorhanden ist. Wie die Abb. 8 zeigt, ist *Trps1* in der frühen Phase der chondrogenen Differenzierung nur in sehr geringen Mengen in den Zellen existent. Im zeitlichen Verlauf steigt die *Trps1*-Expression stark an, bis ca. acht Tage nach Induktionsbeginn ein *Trps1*-Maximum auf Proteinebene erreicht ist.



**Abb. 8: Western-Blot Analyse der *Trps1*-Expression während der chondrogenen Differenzierung von ATDC5-Zellen.**

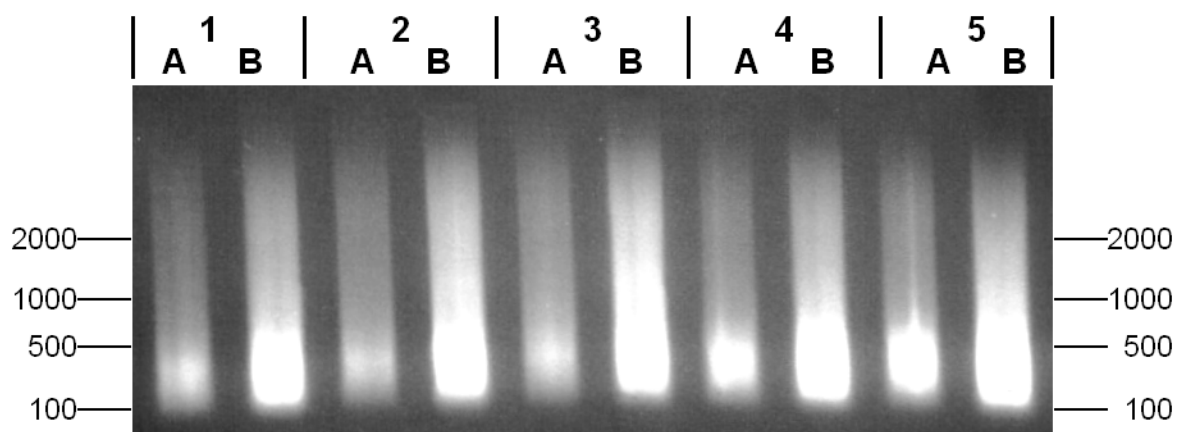
Es erfolgte eine optische Auswertung der Immundetektion von Proteinen. Lamin A ist ein Typ-V-Intermediärfilament, das in der Kernhülle eukaryotischer Zellen vorkommt. Es diente als interne Kontrolle für den Proteinnachweis. Ca. sechs Tage nach Induktion ist ein deutlicher *Trps1*-Level in den Zellen vorhanden. Nach Zeitpunkt d8 erfolgt aber keine weitere Signalverstärkung, obwohl die Signalintensität der Ladekontrolle noch weiter ansteigt. Die Menge an *Trps1*-Protein hat somit nach 6- bis 8-tägiger Differenzierung ein Maximum erreicht. IVT: *In vitro* translatiertes TRPS1 zur Methodvalidierung. Rechts sind Markerbanden und zugehörige Größen in kDa angegeben.

Aufgrund der signifikant erhöhten *Trps1*-Expression durch die Induktion von ATDC5-Zellen zur chondrogenen Differenzierung wurden für die nachfolgende ChIP ebenfalls differenzierte ATDC5-Zellen herangezogen. Da acht Tage nach Induktion mit einem maximalen *Trps1*-Level gerechnet werden kann, erfolgte die Fixierung zu diesem Zeitpunkt.

### 3.2 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Um Einsicht in die zelluläre Funktion von TRPS1 und die Pathogenese des Tricho-Rhino-Phalangealen Syndroms zu bekommen, sollten Zielgene dieses Transkriptionsfaktors bestimmt und verifiziert werden. Die Identifizierung TRPS1-regulierter Gene ist wichtig, um die Rolle des TRPS1-Proteins in entwicklungsrelevanten Signalwegen zu bestimmen. Über die Methodenkombination der ChIP-Seq sollten solche Zielgene gefunden werden.

Die Chromatinimmunpräzipitationen erfolgten an Extrakten aus chondrogen differenzierten ATDC5-Zellen. Für diese Zellen ist im Vorfeld auf Proteinebene gezeigt worden, dass sich acht Tage nach Induktion ein *Trps1*-Expressionsmaximum einstellt (s. 3.1). Zunächst erfolgte, wie in Abb. 9 gezeigt, die Überprüfung der Scherungsintensität, die mechanisch mittels Ultraschallbehandlung erzielt wurde.



**Abb. 9: Analyse des gescherten Chromatins nach Anwendung des Bioruptors und Shearing Moduls des Red ChIP Kits (beides Diagenode).**

In 5 Chromatinproben aus je ca.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden gemäß des Herstellerprotokolls die Quervernetzungen von DNA und Proteinen revertiert und die DNA-Anteile aufgereinigt. Ein Fünftel der DNA wurde einer RNase-Behandlung unterzogen. Hiervon wurden jeweils 1/16 (A) und 1/8 (B) gelelektrophoretisch analysiert. Eine photometrische Konzentrationsbestimmung zeigte, dass diesen Proben DNA-Mengen von ca. 800 ng bzw. 1600 ng entsprechen.

Da die Mehrheit der Fragmente die gewünschte Länge von 100 – 600 bp hatte, konnte mit diesem Material weitergearbeitet werden.

Zur Methodvalidierung wurde eine ChIP mit ChIP-grade anti-TBP durchgeführt. Dieser Antikörper bindet das TATA-Box bindende Protein, so dass die von diesem Transkriptionsfaktor besetzten Chromatinbereiche copräzipitiert werden. Dies führt zu einer Anreicherung der TBP-regulierten Promotoren, die dann per PCR in der Probe nachgewiesen werden können. Ein solcher ist der Promoter des Gens *Gapdh*, das die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase codiert. Die Amplifikation des Promotors in Abb. 10 A zeigt somit den grundsätzlichen Erfolg der Methodendurchführung an. Des Weiteren kann auch die Qualität der Auflösung der jeweiligen Chromatinimmunpräzipitation anhand dieser Kontrolle überprüft werden. So ist die Amplifikation von genomischen Bereichen, die 0,6 kb bzw. 1,1 kb vom *Gapdh*-Promotor entfernt liegen, signifikant geringer. Weitere Kontrollen für die erfolgreiche Anreicherung von Chromatin waren ChIP-Ansätze ohne oder mit unspezifischem Antikörper (anti-GFP). In diesen Ansätzen sollten keine der auf Anreicherung getesteten Regionen amplifiziert werden können. Auf PCR-Ebene wurde diese Negativkontrolle mittels Oligonukleotiden erreicht, die spezifisch für das Exon 2 des Myoglobin-Gens sind. Da Transkriptionsfaktoren in der Regel nicht in proteincodierenden Bereichen binden, sollte auch hier keinerlei Anreicherung und somit keine Amplifikation möglich sein.

Mangels geeigneter Alternativen musste die Immunpräzipitation des TRPS1-enthaltenden Chromatins mittels eines polyklonalen Antikörpers (s. 2.1.9) erfolgen, der nicht kommerziell erhältlich und nicht auf seine Eignung für ChIP-Experimente hin getestet war. Um zu überprüfen, ob auch in diesen Ansätzen eine Anreicherung von Promotoren erreicht werden konnte, wurden verschiedene potentielle sowie publizierte Zielgene von TRPS1 untersucht. So wurde, in Anlehnung an die Arbeit von Suemoto *et al.* 2007 sowie die Veröffentlichung von Piscopo *et al.* im Jahre 2009, auf Anreicherungen des *Stat3*- und des *Bglap*-Promotors getestet (Primer s. Anhang). Das Gen *Ptch1* ist bekanntermaßen ein Zielgen des Transkriptionsfaktors Gli3 (Agren *et al.* 2004). Da gezeigt wurde, dass die Aktivatorform dieses TF eine Protein-Protein-Interaktion mit Trps1 eingeht (Wülling *et al.* 2009), wäre eine Coregulation durch diese beiden Proteine denkbar. Daher wurde eine Anreicherung eines, die relevante Gli3-Bindestelle einschließenden Teils des *Ptch1*-Promotors analysiert. Des Weiteren wäre eine direkte Regulation des Gens *Hspg2* durch Trps1

denkbar, da Expressionsanalysen in *Trps1*<sup>+/-</sup>-Mausembryonen eine Hochregulation des *Hspg2*-Gens gezeigt hatten (Brega 2005). Aufgrund dessen wurden zwei verschiedene, upstream des *Hspg2*-Gens gelegene, sich nicht überlappende Bereiche auf Anreicherung getestet.

Die Menge an DNA, die nach ChIP an  $1 \times 10^6$  Zellen zurückgewonnen werden konnte, betrug ca. 300 – 1200 ng. Die anschließenden PCR-Analysen wurden somit an 15 – 60 ng DNA durchgeführt. Parallel wurden diese, zum Zweck der positiven PCR-Kontrolle, ebenfalls an ca. 100 ng geschertem Chromatin sowie an ca. 100 ng muriner genomischer DNA durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 zusammengefasst.

Die Amplifikation des *Gapdh*-Promotors erfolgt in der anti-TBP-Probe deutlich effizienter als die Amplifikation der Bereiche *Gapdh* p-0,6kb, und *Gapdh* p-1,1kb, was auf eine signifikante Anreicherung und eine relativ gute ChIP-Auflösung hindeutet (s. Abb. 10 A, Zeilen 1-3 und 5). Das Myoglobin-Exon 2 wurde in dem Ansatz nicht angereichert gefunden (s. Abb. 10 A, Zeile 4). In den Kontrollansätzen ohne Antikörper kann ebenfalls keine signifikante Anreicherung bestimmter Promotoren gefunden werden (s. Abb. 10 A, Spalten no). Die Antikörper gegen TRPS1 und GFP scheinen jedoch auch gewisse Mengen unspezifischen Chromatins präzipitiert zu haben (s. Abb. 10 A, Spalten TRPS1 und GFP).

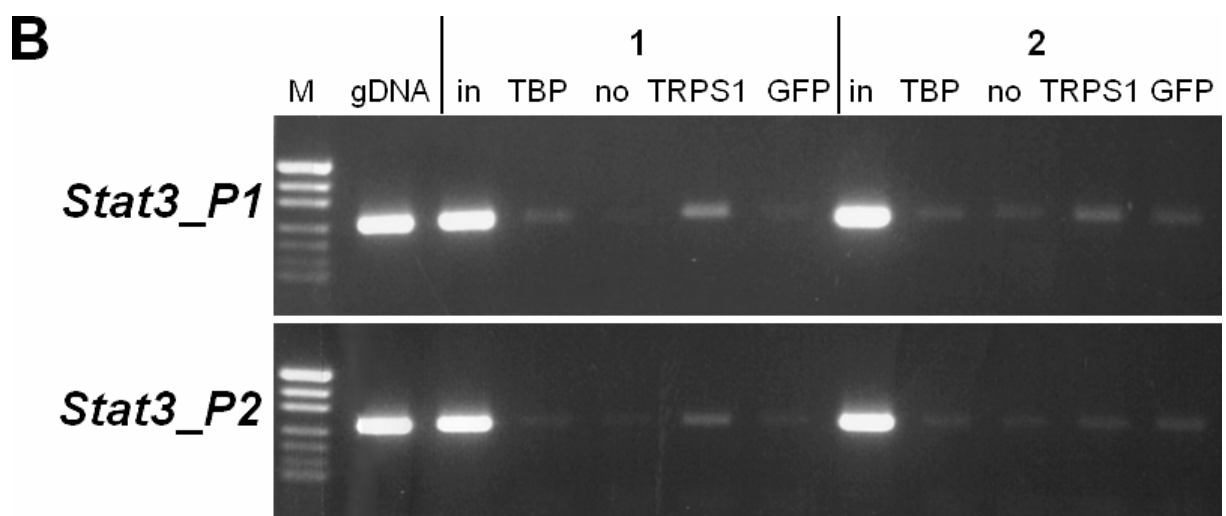
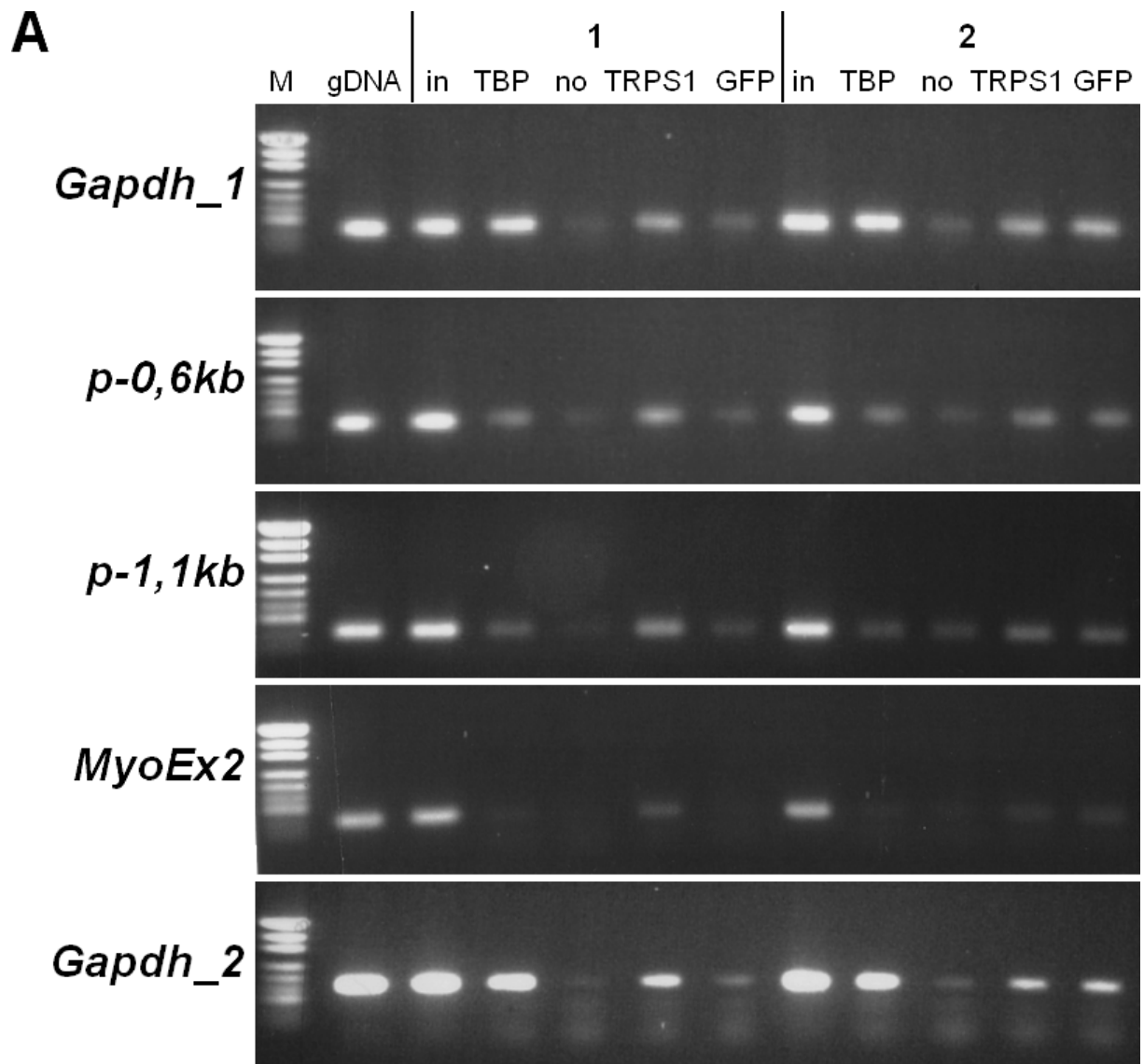
Die Primer P1 amplifizieren den Bereich von Position -1094 bis -846, die P2-Primer den Bereich von Position -718 to -465 des murinen *Stat3*-Promotors (Suemoto *et al.* 2007). Diese beiden Bereiche werden in allen Ansätzen in basalen Mengen amplifiziert (s. Abb. 10 B). Die anti-TRPS1-Proben zeigen jedoch, besonders für die Position P1 eine höhere Amplifikationsrate (s. Abb. 10 B, Zeile 1), so dass in gewissem Maße von einer spezifische Anreicherung des *Stat3*-Promotors durch *Trps1* ausgegangen werden kann.

Vom *Bglap*-Promotor wird die Region -194 bis -84 amplifiziert, die sowohl eine GATA- als auch eine RUNX-Bindedomäne enthält und in dem publizierten ChIP-PCR-Produkt (Piscopo *et al.* 2009, -416 bis -67) vollständig enthalten ist. Da das angewandte Methodenprotokoll auf PCR-Produkte von 100 bis 200 bp Länge ausgelegt war, war diese Abweichung von den veröffentlichten Daten notwendig. Die durchgeführte PCR-Analyse war jedoch nicht auswertbar, da die starke unspezifische Amplifikation in allen Ansätzen eine Identifikation einer Anreicherung verhinderte (s. Abb. 10 C).

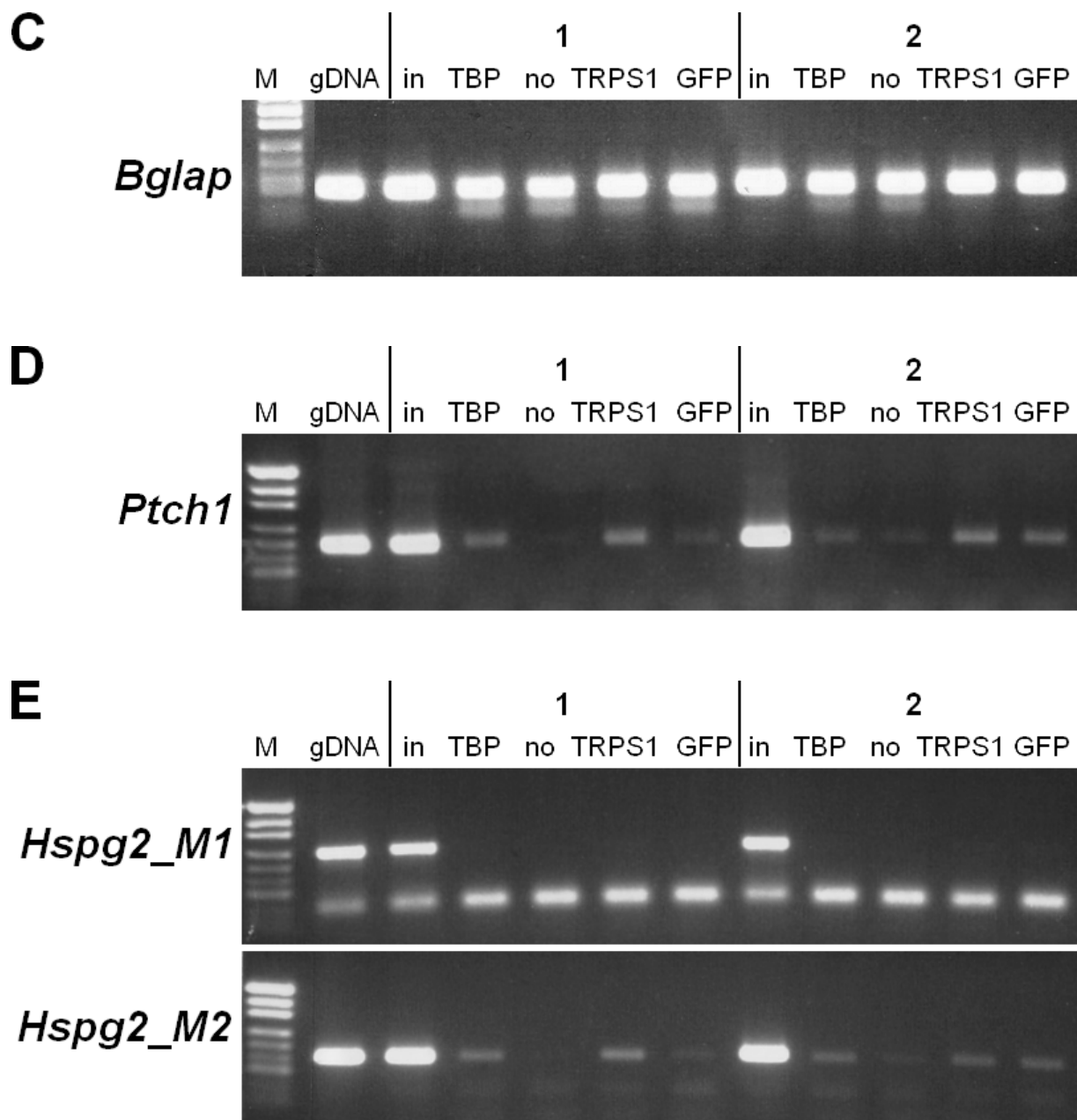
Die Primer LB159/LB160 sind spezifisch für die Region -1089 bis -910 des murinen *Ptch1*-Promotors (Laetitia Buelens unveröffentlicht), wobei die Gli3-Bindestelle die Position -923 bis -915 überspannt. Ähnlich wie in Abb. 10 B zeigt sich ein stärkeres Signal, wenn mit einem TRPS1-Antikörper präzipitiert wird. Es konnte allerdings keine signifikante Anreicherung des *Ptch1*-Promotors durch Trps1 gezeigt werden (s. Abb. 10 D).

Ebenso konnte keine spezifische Anreicherung des *Hspg2*-Promotors durch Trps1 gefunden werden. Das Primerpaar *Hspg2\_M1* amplifiziert den Bereich -497 bis -267, während *Hspg2\_M2* spezifisch für die Region von -259 bis -103 ist. Ersterer wird in keinem der Ansätze angereichert gefunden (s. Abb. 10 E, Zeile 1). Letzterer lässt sich amplifizieren, jedoch nicht signifikant über eine basale Rate hinaus (s. Abb. 10 E, Zeile 2).

Da die PCR-Analyse der Chromatinimmunpräzipitationen nicht die gewünschten Ergebnisse lieferte, war nicht absehbar, ob die Methode hinreichend gut funktioniert hat, um per Hochdurchsatzsequenzierung spezifische Anreicherungen von Promotoren durch Trps1 zu finden. Aufgrund der Kostspieligkeit der Verfahren, die auf die ChIP gefolgt wären, wurde deshalb eine andere ChIP-Strategie entworfen, so dass dieses Experiment an dieser Stelle nicht weiter verfolgt werden konnte.







**Abb. 10: PCR-basierte ChIP-Anreicherungsanalyse.**

M: Marker, gDNA: PCR an genomischer DNA, in: PCR an Input-Material, TBP: PCR an anti-TBP-ChIP-Material, no: PCR an Material aus ChIP ohne Antikörper, TRPS1: PCR an anti-TRPS1-ChIP-Material, GFP: PCR an anti-GFP-ChIP-Material. Die ChIP-Experimente wurden jeweils in 2 unabhängigen Ansätzen (1) und (2) durchgeführt. (A) Methodvalidierung. (B-E) Analyse der spezifischen Anreicherung des *Stat3*-Promotors (B), des *Bglap*-Promotors (C), des *Ptch1*-Promotors (D) und des *Hspg2*-Promotors (E) durch anti-TRPS1.

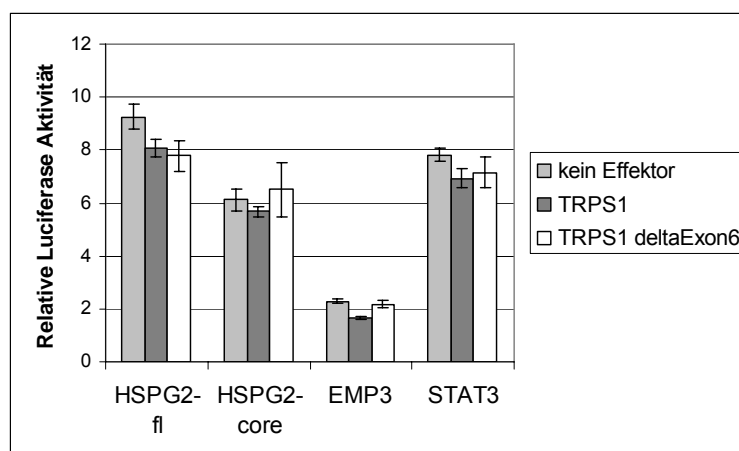
### 3.3 Funktionelle Promotorstudien von potentiellen TRPS1-Zielgenen

In unserer Arbeitsgruppe mittels Microarray-Technologie durchgeführte Expressionsanalysen in *Trps1*<sup>+/-</sup>-Mausembryonen (Brega 2005, vgl. 1.4.2), lieferten etliche Gene, die eine Korrelation zur *Trps1*-Expression zeigten. Einige von ihnen stellen gute Kandidatengene für eine direkte Regulation durch TRPS1 dar. An einer Auswahl an Genen, für die eine Regulation durch TRPS1 biologisch Sinn machen würde, sollten deshalb funktionelle Promotorstudien durchgeführt werden. Außerdem sollten bereits publizierte Zielgene in unser Testsystem übernommen, verifiziert und so als Positivkontrollen validiert werden. Hierzu wurde das Dual-Luciferase Reportersystem (Promega) verwendet, das darauf basiert, dass eine Firefly-Luciferase exprimiert wird, wenn die untersuchte DNA-Sequenz Promotoraktivität hat. Die enzymatische Aktivität des Reportergens dient hierbei als Maß für die Fähigkeit, als Promotor zu wirken. Anhand der Aktivität einer weiteren Luciferase, die durch Cotransfektion eines Renilla-Expressionsplasmids exprimiert wird, wird eine interne Standardisierung der Methode erreicht. In einer erweiterten Form dieses Assays kann ebenso der Einfluss eines bestimmten Transkriptionsfaktors auf die DNA-Region von Interesse gemessen werden. Hierzu wird ein weiteres Expressionsplasmid, in diesem Fall ein konstitutives TRPS1-Expressionskonstrukt (wt oder deltaExon6), in das entsprechende Zellsystem cotransfiziert.

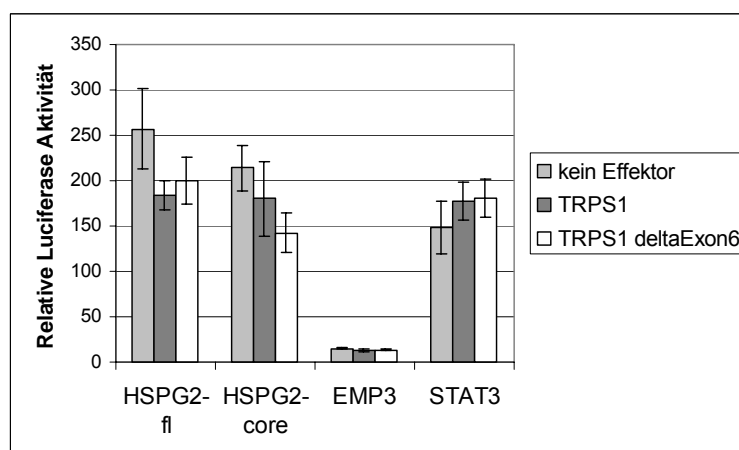
Die untersuchten potentiellen TRPS1-Zielgene waren *HSPG2*, *EMP3*, *EXTL2*, *LAPTM4B* und *MATN4*. Außerdem wurden die Promotorbereiche der Gene *STAT3*, *PTH LH* (Parathyroid Hormone-Like Hormone, humanes Pendant zu PTHrP) und *BGLAP* getestet, für die bereits eine Abhängigkeit von TRPS1 beschrieben war (Suemoto *et al.* 2007, Nishioka *et al.* 2008, Piscopo *et al.* 2009). Obwohl eine Regulation der murinen Gene gefunden worden war, wurde hier die Wirkung des humanen TRPS1 auf die humanen Promotoren untersucht. Das *EXTL2*-, das *BGLAP*-, das *MATN4*-, das *PTH LH*- sowie die beiden *LAPTM4B*-Konstrukte hatte in keinem der gewählten Zellsysteme (CHO und HeLa für *EXTL2*, *MATN4*, *PTH LH* und *LAPTM4B*; CHO und HEK-293 für *BGLAP*) eine signifikante Promotoraktivität, so dass folglich auch keine Regulation durch TRPS1 messbar war (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Reporterstudien bzgl. der beiden *HSPG2*-Konstrukte sowie des *EMP3*- und *STAT3*-Promotors sind in Abb. 11 zusammengefasst. In Anlehnung an die Arbeit von Iozzo *et al.* 1997, wurde ein ca. 600 bp langer Bereich getestet, der

den essentiellen Promotorbereich (core-Promotor) des *HSPG2*-Gens darstellt und zusätzlich ein ca. 2,7 kb langes DNA-Fragment kloniert, dass neben dem core-Promotor noch 9 putative GATA-1-Bindestellen enthält. Da es sich bei TRPS1 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der als Repressor GATA-regulierter Transkription beschrieben ist (Malik *et al.* 2001), stellen diese GATA-1-Bindestellen mutmaßliche TRPS1-Zielsequenzen dar. Für die Untersuchung von *EMP3* und *STAT3* wurden jeweils ca. 2 kb der genomischen Region um den Transkriptionsstart des jeweiligen Gens in das entsprechende Reporterplasmid inseriert.

A



B



**Abb. 11: Untersuchung von putativen Zielgenen auf ihre Regulation durch TRPS1.**

Dargestellt sind Mittelwerte von Sechsfachbestimmungen sowie die entsprechenden Standardabweichungen. Es ist exemplarisch eines von min. zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Hellgrau: Transfektionen ohne Effektorstrukture; Dunkelgrau: Cotransfektionen eines wildtypischen *TRPS1*-Expressionsplasmids; Weiß: Cotransfektion eines *TRPS1*-Expressionsplasmids, in dem das Exon 6 in frame deletiert ist. Es wurde jeweils die Volllänge- (fl, je 1. Block) und die Kernversion (core, je 2. Block) des *HSPG2*-Promotors, das *EMP3*-Reporterkonstrukt (je 3. Block) und das *STAT3*-Reporterkonstrukt (je 4. Block) in CHO- (A) und HeLa-Zellen (B) untersucht.

Wie in Abb. 11 zu sehen ist, haben die vier Konstrukte zwar eine signifikante Promotoraktivität, diese ist jedoch in den gewählten Zellsystemen nicht durch den Transkriptionsfaktor TRPS1 reguliert. Der Verlust des sechsten Exons auf DNA-Ebene resultiert in dem Verlust der DNA-bindenden Zinkfingerdomäne auf Proteinebene und sollte dem TRPS1-Protein, das dennoch gebildet wird, demnach seine regulatorische Funktion nehmen. Allerdings hat diese Mutation keinen Einfluss auf die Reporterexpressionen, da auch der wildtypische Effektor keinerlei Regulation bewirkt.

Weil die Aktivität und Regulierbarkeit der getesteten Promotoren sehr stark vom verwendeten Zellsystem abhängig war, wurden einige Experimente im Rahmen einer BMBF-geförderten Kooperation mit dem Institut für Entwicklungsbiologie (ZMB, Universität Duisburg-Essen) in ATDC5-Zellen und primären Chondrozyten aus Gliedmaßen von Mausembryonen wiederholt. In den Primärzellen konnte die publizierte Regulation des *STAT3*-Promotors durch TRPS1 so bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.4 Untersuchungen zum Pathomechanismus bei Patienten mit TRPS und ungeklärter Pathogenese**

#### **3.4.1 Untersuchungen zum Pathomechanismus bei einer Patientin mit TRPS II**

Bei der in dieser Arbeit molekulargenetisch untersuchten Patientin wurde ein Tricho-Rhino-Phalangeales Syndrom Typ II diagnostiziert. Die klinische Diagnose wurde von erfahrenen Humangenetikern gestellt. Die mental nicht retardierte Patientin weist die charakteristischen craniofazialen Merkmale eines TRPS auf (vgl. 1.3) und präsentierte sich auch mit einer Vielzahl der skelettalen Anomalien, wie einer generellen Verzögerung der Knochenentwicklung während der Kindheit, gefolgt von einem vorzeitigen Verschluss der Wachstumsfugen und daraus resultierend Brachydaktylie und Kleinwuchs (140 cm im Alter von 13 Jahren). Die typischen konusförmigen Epiphysen waren bei dieser Patientin allerdings nicht zu finden. Ein Teil der phänotypischen Merkmale sowie die für ein TRPS II charakteristischen multiple kartilaginäre Exostosen (MKE) sind in Abb. 12 zu sehen.

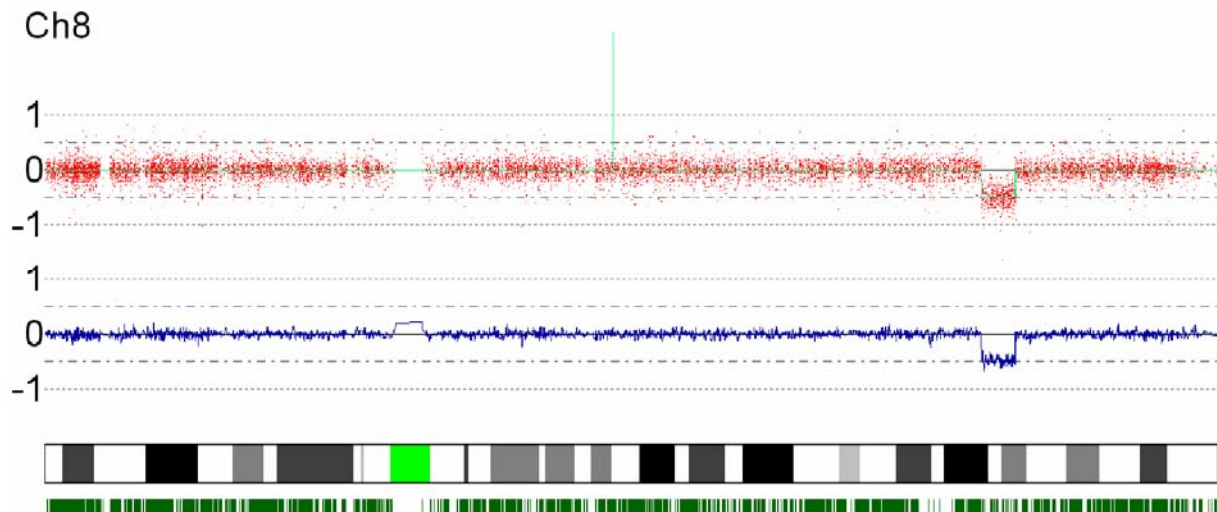


**Abb. 12: Skelettaler Phänotyp der Patientin im Alter von 13 Jahren.**

Pfeilspitzen: Zu kurze Mittelphalangen durch vorzeitigen Verschluss der Wachstumsfugen, Pfeile: MKE.

### 3.4.1.1 Molekulargenetische Analysen bei einer Patientin mit TRPS II

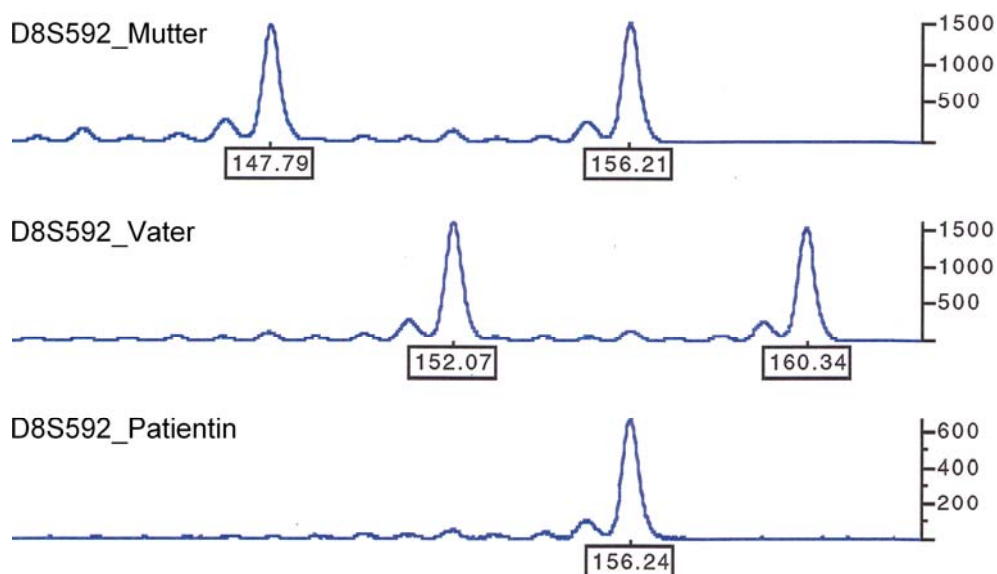
Die SNP-Array-Analyse (GeneChip Human Mapping 250K *Nspl* Array, Affymetrix; durchgeführt von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass, BioChip Lab UK Essen) der genomischen DNA der Patientin zeigte eine ca. 4 Mb-Deletion auf Chromosom 8q23.3-q24.12, die das *EXT1*-Gen, aber offensichtlich nicht den proteincodierenden Teil des *TRPS1*-Gens einschließt (s. Abb. 13). Weitere Kopienzahlveränderungen wurden nicht gefunden. Aufgrund einer unzureichenden SNP-Abdeckung des Arrays um Exon 1 von *TRPS1* herum, musste zur genaueren Kartierung des Bruchpunktes eine Nachgenotypisierung zweier weiterer Polymorphismen (rs720928 und rs11787046) per Sequenzierung erfolgen, um herauszufinden, ob die Deletion den Promotor oder das erste Exon des *TRPS1*-Gens umfasst. Diese ergab, dass sich der proximale Deletionsbruchpunkt außerhalb des *TRPS1*-Gens (zwischen 16,7 kb und 27,4 kb upstream) befindet, und damit auch die CpG-reiche mutmaßliche Promotorregion intakt ist (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 13: Arraybasierte Identifikation einer ca. 4 Mb großen Deletion auf Chromosom 8 unserer Patientin mit TRPS II.**

Die Auswertung erfolgte mittels Copy Number Analyzer for Affymetrix GeneChip Mapping arrays (CNAG, Nannya *et al.* 2005).

Eine Mutation im codierenden Bereich des Gens wurde per Sequenzierung ebenfalls ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Ferner zeigten Mikrosatellitenanalysen an genomischer DNA der Patientin und deren Eltern, dass die Deletion *de novo* und paternalen Ursprungs ist (s. Abb. 14). Die korrekte Paternität konnte anhand weiterer Mikrosatelliten bewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 14: Analyse des Mikrosatelliten D8S592.**

Mutter (oben) und Vater (mittig) zeigen je zwei unterschiedliche STR-Längen wobei sie keine dieser Marker gemeinsam haben. Die Patientin (unten) dagegen weist nur eine STR-Länge auf. Da der Vater diesen Marker nicht besitzt, muss die Patientin hemizygot sein und trägt nur das mütterliche Allel.

### 3.4.1.2 Kartierung der Deletion auf Chromosom 8q

Bei dieser Patientin sollten zunächst die Deletionsbruchpunkte genau kartiert werden. Hierzu wurde die Methode der Connection-PCR angewandt. Es wurde eine Batterie von geschachtelten Primerpaaren (s. Anhang) entworfen, die jeweils die Bereiche zwischen minimaler und maximaler Deletionsausdehnung in Schritten von je ca. 1 kb abdeckten. Die PCR mit dem 5'-Oligonukleotid mapping\_for4 und dem 3'-Oligonukleotid mapping\_rev6 lieferte ein 1883 bp langes PCR-Produkt, das die Bruchpunktregion enthält (s. Abb. 15). Die Position des distalen Deletionsbruchpunktes ist chr8:120988181, der proximale Bruchpunkt konnte auf Position chr8:116771286 kartiert werden (hg18). Die genaue Größe der Deletion konnte somit auf 4.216.895 bp bestimmt werden. Folglich endet die Deletion bei der Patientin 20.878 bp upstream des regulären *TRPS1*-Transkriptionsstartpunkts.

GCCTCTCTCC	CATGTAATTT	TTCTTGCTGG	ATAACTAATT	CAACAAGTGT	116770836
TATTTGGGAA	GAAAAATTAA	TGTTTTACTG	AAATATGAAT	GTATTACCTT	116770886
ATGTTTTATT	TCATTTGGAA	TTCTTTTGCA	CAATGCTGTT	TTTCTTTGAA	116770936
CTAATTTGCT	CTTATGTTAT	TATGCCATTT	TTTAAGTCTT	TACATCTTAG	116770986
GATTATTTTT	TCTATTTATA	GTTTGATTAG	TTTAGTTACA	GAGTTATATC	116771036
TATAGTAACC	CTTCCTATTT	TTGAACAATA	ATGAAATTTG	TTATTGTGTT	116771086
GGATATAGGA	TTTGAAAGTA	ATACCTAAAA	TAAACAGCAA	AGGAGTACAG	116771136
CAAACTTTT	CTTTCTTCTT	TATATAGTTT	GAAGGTCTTA	AAGCTGGAAT	116771186
AGGTGGGTGG	GCCATGATTT	ACCCTTTGAC	AGGTCTGAAT	TCTTGTTGTA	116771236
ATGAAATGTA	TTATACGTGA	GGTTTGCTGC	AGTATATTAT	TTTTTTCTAT	116771286
<b>TT</b>					
TTTCCCAGAG	CTCTATGCAG	GACACCAGAG	CTTTGATTTT	GAGCTCTAGC	120988230
CCTCACTGTT	TATCTTAGGG	TAGTCAAGAC	CCTCACATAA	TTTCTCTGTG	120988280
TCTTCTGAGA	GCATTCGCGT	TGTTTCATCAG	GGCCAATAGT	ATTCCTGTGC	120988330
ATTACATGGT	GCCTGTGGTG	AGTGATTAAT	AAAAGGGATA	TTGTGACTCT	120988380
CTTGGCAGGG	ATGAAAGGAC	TGTCAACATG	GTAATAGCC	CTTGTATAAG	120988430
CAGGCGAAGA	GAATGAGGCT	ATTCTTCCTC	CCACCGTGGC	TCTTACTGGT	120988480
GATGATTACA	ACACCAAAG	CATATTTTTT	TGTTTACTT	TTGAATCCAG	120988530
GGGTCTATGA	TGTTGTAGCA	ACAAAACCTGT	TTTTTTTACA	TGGCAACAAA	120988580
ACGTAAGATC	TGGCCCATGA	CACTACCTTC	CTACTAATGG	ATGGATTGGA	120988630
ACAAGGTTGA	GGGGTAGTGT	TTTGTGTGAA	GTGCAATTAA	CATTGTATTA	120988680

**Abb. 15: Bruchpunktregion der Deletion bei unserer Patientin mit TRPS II.**

Oben: proximaler Bereich von 8q; Unten: distaler Bereich von 8q; **TT**: während des Rekombinationsprozesses dupliziertes DNA-Material.

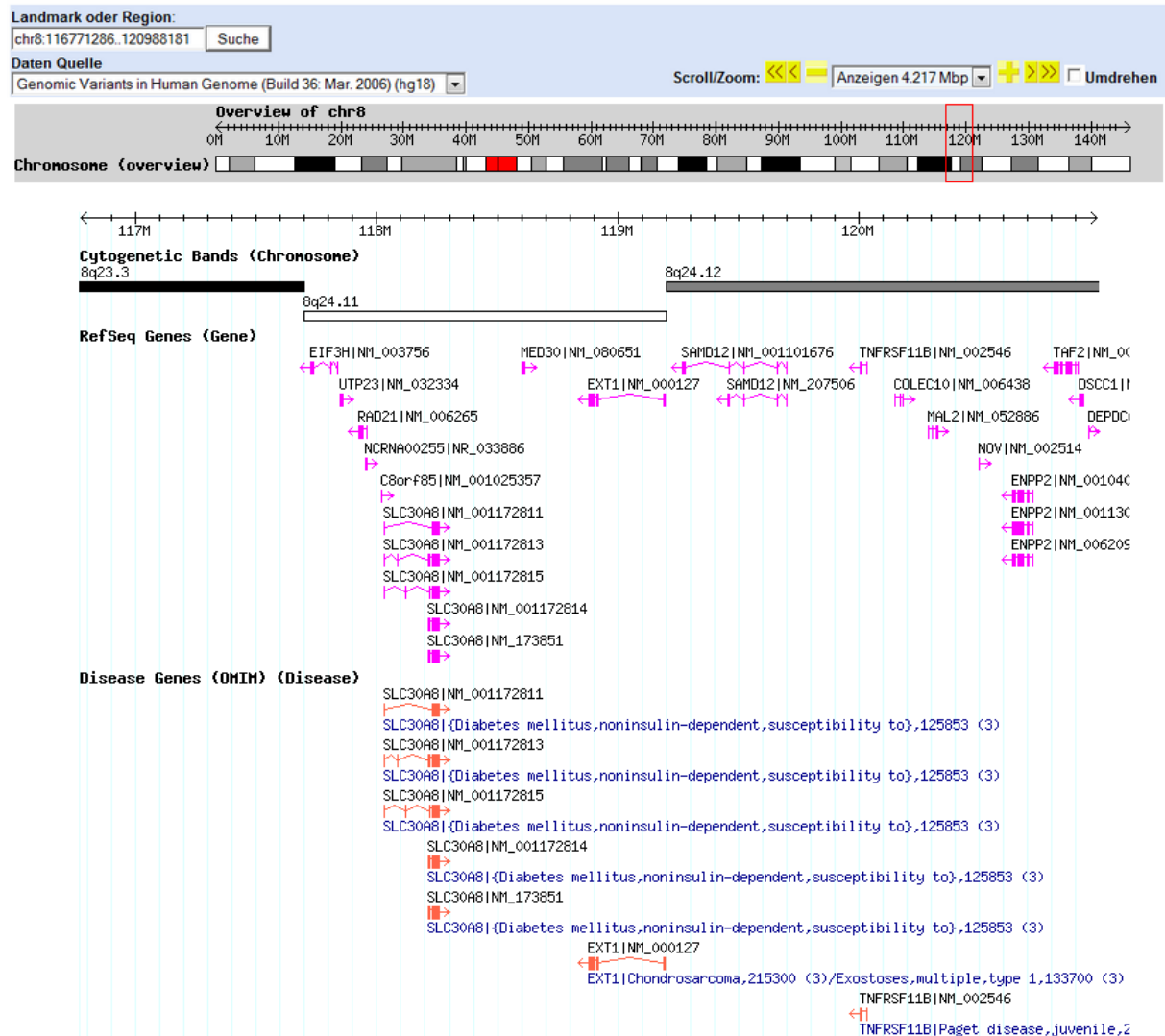
Die auf dem väterlichen Allel deletierten Gene sind in Abb. 16 aufgelistet. Das *EXT1*-Gen, das verantwortlich für die Multiplen Kartilaginären Exostosen ist, sowie *EIF3H*, das dem *TRPS1*-Gen am nächsten gelegene bekannte Gen, ist vollständig deletiert. Außerdem sind zwei weitere Gene deletiert, von denen eine Assoziation mit Erkrankungen bekannt ist. Eine nichtsynonyme Variante (R325W) in *SLC30A8* erhöht das Risiko für Typ 2 Diabetes mellitus (Sladek *et al.* 2007). Da unsere Patientin hemizygot für diesen Locus ist und die Allelfrequenz für das Risikoallel in der Bevölkerung hoch ist, wäre bei ihr ein erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes möglich. Um dies endgültig abzuklären müsste jedoch eine Genotypisierung des SNPs (rs13266634) bei der Patientin erfolgen. *TNFRSF11B* codiert den Osteoklasteninhibitor Osteoprotegerin, der eine Rolle bei der Regulation der Knochenmasse spielt (Simonet *et al.* 1997). Das Gen ist mit der schweren, rezessiven Knochenkrankheit Morbus Paget assoziiert (Whyte *et al.* 2002). Jedoch entwickeln selbst heterozygot *TNFRSF11B*-defiziente Mäuse eine frühe Osteoporose und Arterienverkalkung (Bucay *et al.* 1998). Somit könnte unsere Patientin, die ohnehin an den beiden Skelettdysplasien MKE und TRPS leidet, möglicherweise eine Prädisposition für Osteopenie oder Osteoporose aufweisen.



# Database of Genomic Variants

[human genome build 36]

## Darstellung 4.217 Mbp von chr8, Position 116,771,286 bis 120,988,181



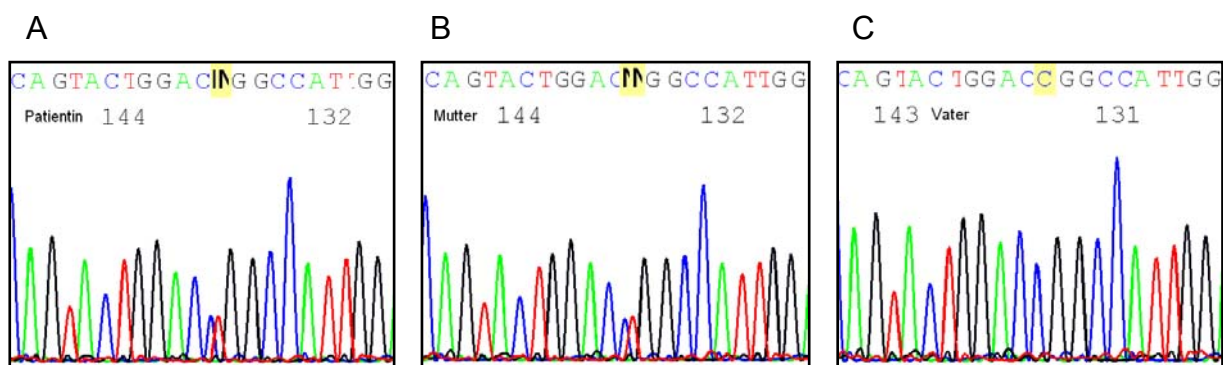
### Abb. 16: Chromosomale Organisation der Deletion unserer Patientin mit TRPS II.

Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>), human genome build 36 (hg18); Rosa: auf einem Allel deletierte Gene, Rot: bekanntermaßen mit bestimmten Erkrankungen assoziierte Gene innerhalb der Deletion.

### 3.4.1.3 Quantitative Analyse der allelischen Transkription

Da bei der Patientin mit TRPS II-Phänotyp zwar eine *EXT1*-Deletion, nicht aber ein Fehlen oder eine Veränderung des *TRPS1*-Gens gefunden werden konnte, wurde eine quantitative Analyse des allelischen Transkriptverhältnisses durchgeführt. Dies sollte helfen, Einsicht in die Pathogenese in diesem Fall zu erhalten.

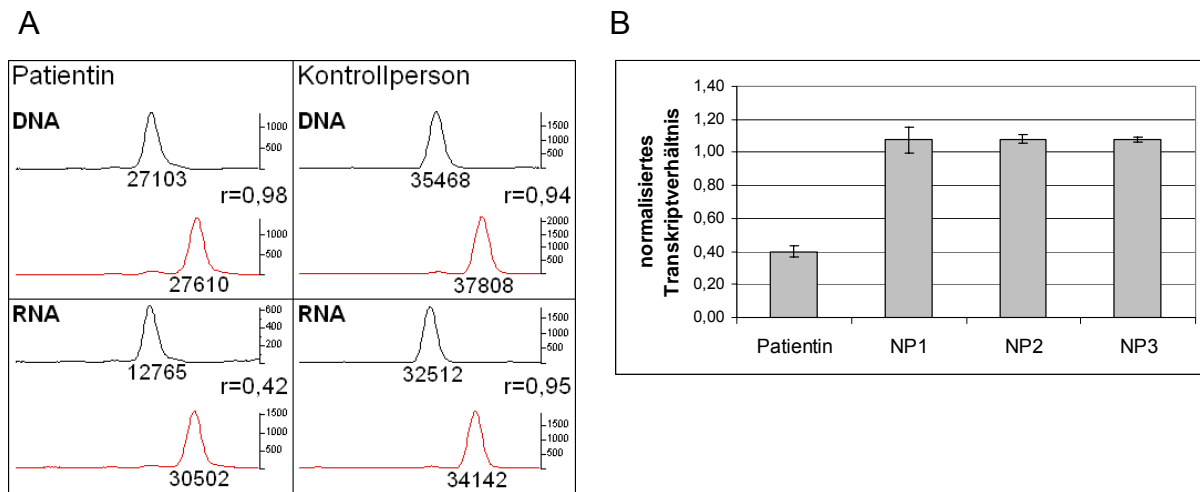
Für die durchgeführte Technik ist ein exprimierter Polymorphismus essenziell, damit die beiden Allele in der cDNA unterschieden werden können. Ein solcher konnte in dem 3'-UTR SNP *rs800899* gefunden werden. In der Normalbevölkerung hat dieser Polymorphismus eine Heterozygotiefrequenz von ca. 50 Prozent, wobei die Allelfrequenz in Europa nahezu ausgeglichen ist. Bei unserer Patientin werden die Allele C und T exprimiert, wobei das Allel C paternalen Ursprungs (s. Abb. 17) und somit in Phase mit der Deletion ist.



**Abb. 17: Sequenzierung von SNP *rs800899* enthaltender genomischer DNA.**

Die Patientin (A) und ihre Mutter (B) sind heterozygot für *rs800899* (C/T), während der Vater (C) homozygot für das C-Allel ist. Demzufolge ist das C-Allel unserer Patientin, wie die *de novo* Deletion, paternalen Ursprungs.

Das biallelisch exprimierte Gen *TRPS1* (Lüdecke *et al.* 2001) lieferte in Primer Extension Experimenten Allelverhältnisse von ungefähr 1. Leichte Abweichungen kommen dadurch zustande, dass die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Fluorophore, mit denen die einzelnen Basen markiert sind, unterschiedlich stark sind. Die Untersuchung von allelischen Transkripten zeigte, dass auch dieses Verhältnis bei gesunden Kontrollpersonen einen Wert von ca. 1 annimmt. Bei der Patientin ist die Expression des Allels, das in Phase mit der Deletion steht, dagegen um ca. 60 % reduziert (s. Abb. 18).



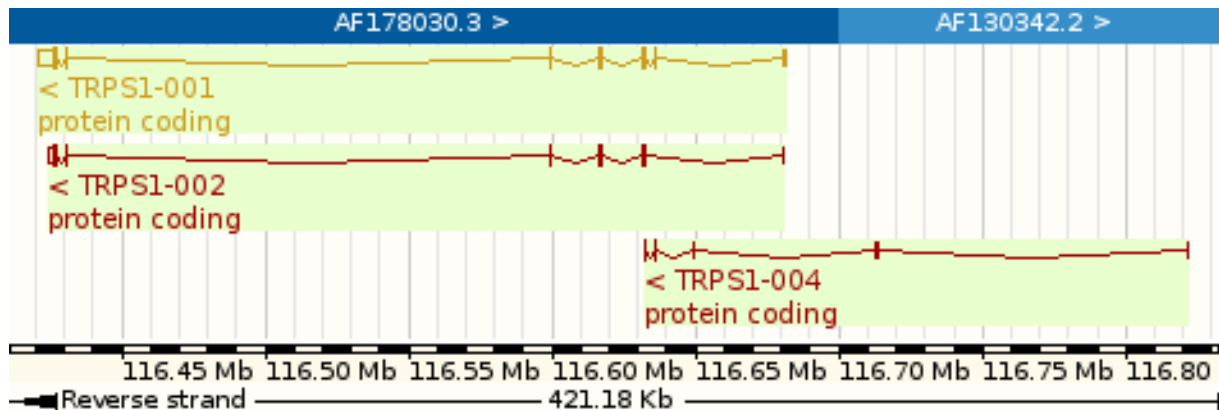
**Abb. 18: Ergebnisse der Primer Extension Experimente.**

(A) Fluoreszenzsignalintensitäten nach Analyse der Elektrophoresedaten von genomischer DNA und RNA aus Fibroblasten mit Hilfe der Software ABI PRISM Genotyper (Applied Biosystems). Es sind sowohl Ergebnisse für die Patientin mit TRPS II (links) als auch für eine Normalkontrolle (rechts) gezeigt. Schwarze Peaks: Signale des SNP-Allels C; Rote Peaks: Signale des SNP-Allels T; r: Verhältnis C/T; Oben: genomisches Allelverhältnis; Unten: allelisches Transkriptverhältnis. (B) Vergleich normalisierter allelischer Transkriptverhältnisse. Es sind jeweils auf genomische Allelverhältnisse normierte Transkriptverhältnisse für Patientin und 3 Normalpersonen (NP) gezeigt. Dabei handelt es sich um Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten mit jeweils bis zu 7 Kontrollproben.

Die allelische Expressionsimbalance unserer Patientin deutet daraufhin, dass die Deletion upstream gelegener Elemente die Expression des entsprechenden *TRPS1*-Allels beeinflusst.

#### 3.4.1.4 Identifikation alternativer *TRPS1*-Transkripte

Datenbankrecherchen zeigten, dass *TRPS1* neben den beiden bekannten Haupttranskripten (Exon1-Exon2-Exon3... und Exon1-Exon3...) auch ein Transkript bildet, das weiter stromaufwärts gelegene Bereiche enthält (s. Abb. 19, vgl. EST-Klone BP357146 und BP357181 aus Brustdrüsentumorzelllinie T47D). Es enthält 41 bp eines Bereichs der ca. 140 kb stromaufwärts von Exon1 liegt (im Folgenden Exon -4). Diese 41 bp werden auf ein 32 kb vom bekannten Transkriptionsstart entfernt liegendes 137 bp-Exon gespleißt (im Folgenden Exon -2). Dieses wiederum wird auf einen 97 bp großen Bereich des Introns 1 und schließlich auf die bekannten Exons 2 und 3 gespleißt.



**Abb. 19: Übersicht über bekannte *TRPS1*-Transkripte gemäß Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).**

TRPS1-001 und TRPS1-002 sind die proteincodierenden Haupttranskripte. Das Ensembl-Transkript TRPS1-004 (ENST00000422939) enthält stromaufwärts des Exons 1 gelegene Bereiche, die ca. 32 kb und ca. 140 kb vom regulären Transkriptionsstart entfernt sind.

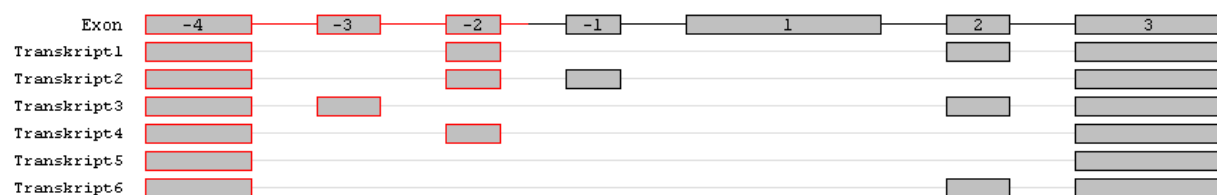
Durch eine RT-PCR-basierte Transkriptanalyse an RNA aus Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson mithilfe eines 5'-Oligonukleotids in dem am weitesten distal gelegenen Bereich dieses Transkriptes und einem 3'-Oligonukleotid in Exon 3 von *TRPS1*, konnten die Exons -4 und -2 verifiziert und zusätzlich die neuen 5'-UTR Exons -3 und -1 identifiziert werden (s. Tab. 1 und Abb. 20). Des Weiteren gelang es mittels 5'-RACE (ebenfalls an Fibroblasten-RNA) das 41 bp umfassende Teilexon -4 aus dem EST-Klon um 223 bp auf 264 bp zu verlängern.

**Tab. 1: Genomische Organisation des *TRPS1*-Gens (Genbank Accession NM\_014112, GI: 90652850)**

Exon		Sequenz der Exon / Intron Übergänge				Intron	
Nr.	Größe [bp]	3'-Spleißakzeptor		5'-Spleißdonor		Nr.	Größe [bp]
-4	264	ccattc <b>tc</b>	TGGCA	TCTAG	g <b>ta</b> aagg	-4	91231
-3	160	cccttc <b>ag</b>	ATCTT	CTCAG	g <b>t</b> atgt	-3	17174
-2	137	actctt <b>ag</b>	GAAAC	CGATG	g <b>ta</b> aaga	-2	24334
-1	139	ctttcc <b>ag</b>	ACAGA	TATGG	g <b>t</b> gagt	-1	7435
1	484	gtggcg <b>ct</b>	TTCCT	AACAG	g <b>ta</b> aagt	1	44973
2	158	ttttgc <b>ag</b>	ATGTA	TACAA	g <b>t</b> atgt	2	3543
3	929	ctttgc <b>ag</b>	AT <b>ATG</b>	TGCAG	g <b>t</b> ttgt	3	14130
4	1130	ttctcc <b>ag</b>	GTGAC	TACAG	g <b>t</b> gagg	4	16268
5	604	ttctcc <b>ag</b>	GAGAG	TACGG	g <b>t</b> agga	5	168548
6	123	tgtttc <b>ag</b>	AGGCG	ACTCG	g <b>ta</b> aaga	6	3245
7	6589	ctctgc <b>ag</b>	ACTCC				
Konsensussequenz		yyyync <b>ag</b>			g <b>t</b> ragt		

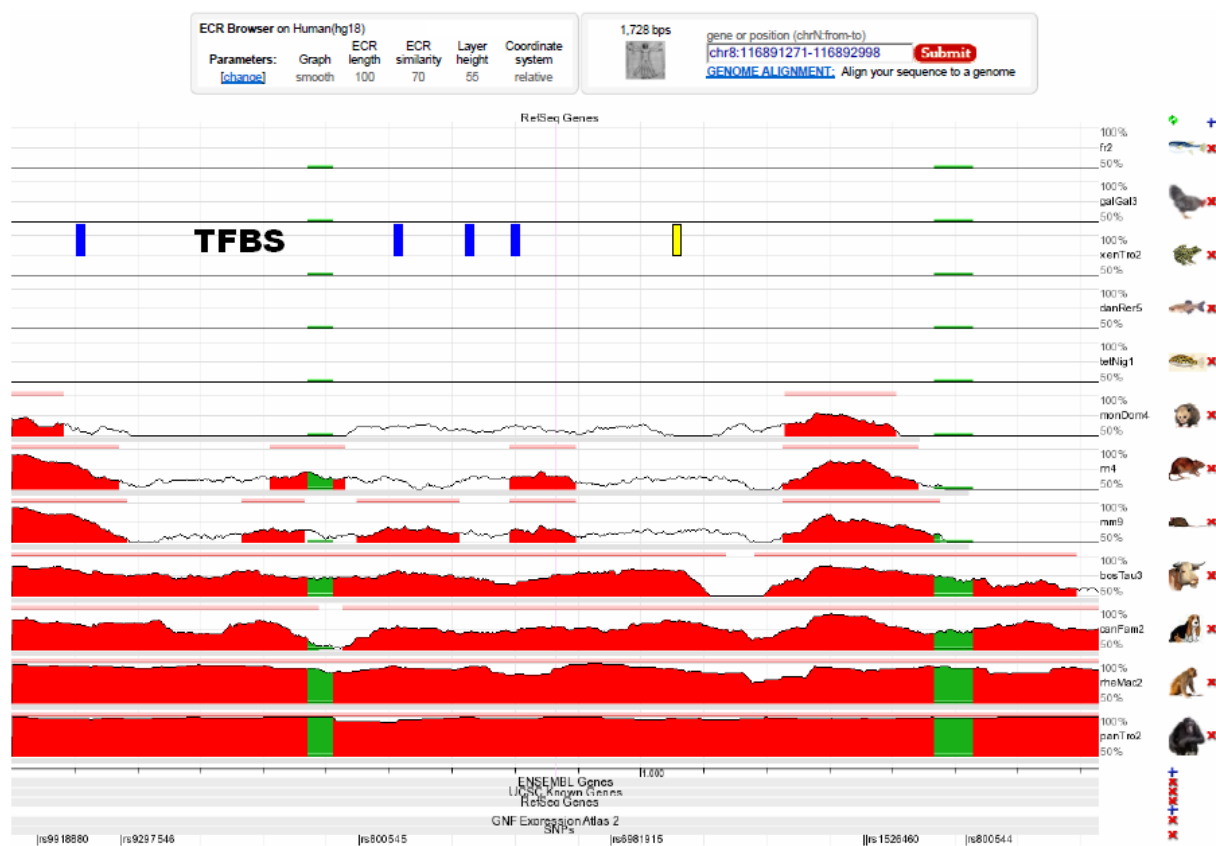
Intronsequenz wurde mit Kleinbuchstaben und Exonsequenz wurde mit Großbuchstaben gezeigt. Die nach GT-AG-Regel (Shapiro und Senapathy 1987) für ein Spleißen notwendigen Intron-Enden sind gelb markiert. Sequenzen, die nicht als Spleißakzeptoren fungieren können sind rot gekennzeichnet. Das Startkodon für die Translation im Exon 3 ist fett gedruckt. r = Purinbase, y = Pyrimidinbase, n = Purin- oder Pyrimidinbase

Es konnte kein Transkript gefunden werden, das eins oder mehrere der neuen 5'-UTR Exons und das reguläre Exon 1 gleichzeitig enthält. Außerdem zeigt das Fehlen einer Spleißakzeptorstelle im Intron -1, dass das Exon 1 nur genutzt wird, wenn es auch den Transkriptionsstartpunkt darstellt. Die neuen 5' Exons werden in unterschiedlicher Kombination auf das Exon 2 oder direkt auf das erste codierende Exon 3 gespleißt (s. Abb. 20).

**Abb. 20: Alternatives Spleißen beim *TRPS1*-Gen.**

Es sind die *TRPS1*-Spleißvarianten dargestellt, die neue 5'-UTR Exons enthalten. Die zugrunde liegende RT-PCR wurde an RNA aus Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson durchgeführt. Es wurden 6 verschiedene Transkripte gefunden. Die rot gerahmten Anteile des väterlichen Allels sind bei der untersuchten Patientin deletiert.

Mittels 5' RACE konnte kein weiteres weiter stromaufwärts gelegenes Exon (Exon -5) mehr gefunden werden. Ferner befindet sich vor Exon -4 keine Spleißakzeptorstelle, was darauf hindeutet, dass dieses Exon den alternativen Transkriptionsstart darstellt. Der stromaufwärts von Exon -4 gelegene DNA-Abschnitt ist evolutionär gut konserviert und enthält fünf putative Transkriptionsfaktorbindestellen (s. Abb. 21). Vier dieser Transkriptionsfaktorbindestellen wurden mittels Datenbankanalysen vorhergesagt (s. Abb. 23 A). Durch manuelle Nachanalyse konnte zusätzlich eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Gli3 identifiziert werden (s. Abb. 22). Die entsprechende Erkennungssequenz wurde 1999 von Dai *et al.* charakterisiert.



**Abb. 21: Evolutionäre Konservierung des potentiellen alternativen *TRPS1*-Promotors.** ECR-Browser (<http://ecrbrowser.dcode.org/>) chr8:116891271-116892998 (hg18), verändert. Gelb: potentielle Gli3-Bindestelle; Blau: weitere vorhergesagte Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS).

GAGATTCAC	CTCTCATGCC	AGGAGAGGTG	AAAGCAAGCA	TGAGATGTCA	116892449
TTTCCCGTAC	CAGATTGCAC	TTCTTGTCAC	GGTCCTCTTT	GGGAATAGGA	116892399
TGGCAGTTCA	GCTCCAACCTT	TCTACTTGCT	ACAGTAGCAA	TAATGAAAGA	116892349
GAAGAATGCC	CTGACAGTTT	<b>G TGGGTGGGT</b>	GGACTCCACC	AGACCTTAAG	116892299
AACTCACAGT	GTTCTCTTCC	ACTTGAGCCC	AATTGTGTCT	GAACCTCTTT	116892249
TGTTCTCAAG	AGCAGCTGTC	TTTCTATTGG	TAAAAGATAG	TCAACATATC	116892199
AATACTTATT	AAACCATAGA	GGCTTGACAG	TCACTTGAAA	ATCATTGGA	116892149

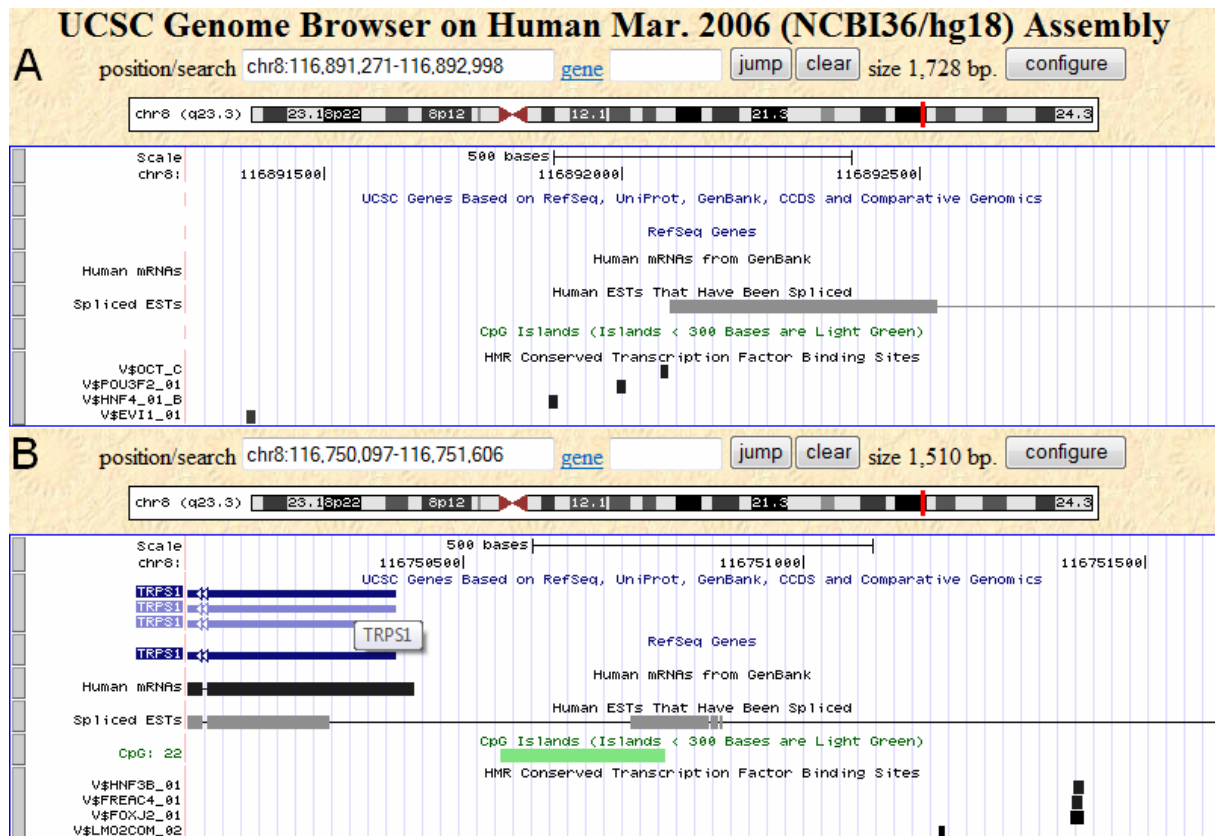
**Abb. 22: Ausschnitt aus der alternativen *TRPS1*-Promotorregion.**

Die putative Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor Gli3 ist gelb markiert.

### 3.4.1.5 Funktionelle Analyse einer potentiellen alternativen Promotorregion

Aufgrund o.g. Forschungsergebnisse erhärtete sich der Verdacht, dass der Bereich um Exon -4 des *TRPS1*-Gens ein alternativer Transkriptionsstart ist. Infolgedessen wurde die genomische Region unmittelbar vor diesem Exon auf ihre Funktionalität als Promotor getestet. Hierzu wurde ein ca. 1,7 kb langes DNA-Fragment in einen promotorlosen Firefly-Luciferase Reportervektor eingebracht (s. Abb. 23 A und Anhang). Zusätzlich wurde durch *in vitro*-Mutagenese ein Konstrukt generiert, in dem die potentielle Gli3-Bindestelle verändert ist. Es konnte von Dai und Kollegen gezeigt werden, dass die Substitution des Guanins an Position sechs der Gli3-Bindestelle durch ein Adenin zum Bindungsverlust durch Gli3 führt (Dai *et al.* 1999). Deshalb wurde in Anlehnung an diese Publikation eine entsprechende Basensubstitution durchgeführt.

Parallel wurden zum Vergleich mit dem unmittelbaren *TRPS1*-Promotor ca. 1,5 kb genomische Region kloniert, die den Bereich -1177 bis +333 repräsentiert (s. Abb. 23 B und Anhang). Dieser enthält im Gegensatz zu o.g. alternativen Promotorbereich nicht nur vier putative TF-Bindestellen, sondern auch ein CpG-Island. CpG-Islands sind häufig mit Promotoren assoziierte, mindestens 200 bp große Regionen im Genom, die einen Gehalt von mindestens 50 % an Guanin- und Cytosin-Resten aufweisen und bei denen der Quotient der beobachteten CG-Dinukleotide im Vergleich zu den erwarteten CG-Dinukleotiden über 0,6 liegt (Gardiner-Garden und Frommer 1987).

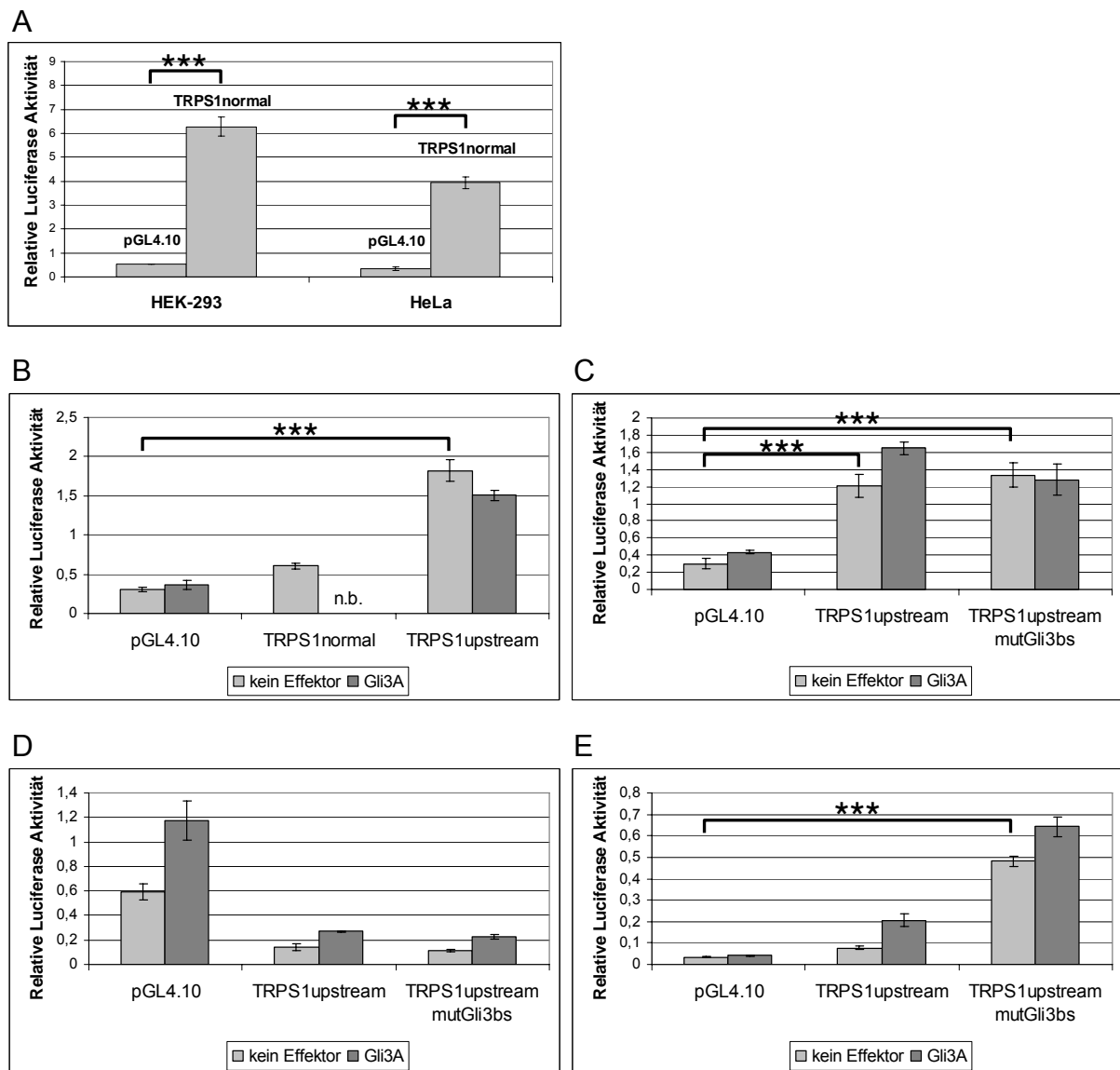


**Abb. 23: *In silico*-Analyse der klonierten *TRPS1*-Promotorbereiche mittels UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, hg18).**

(A) Das alternative *TRPS1*-Promotorkonstrukt (chr8:116891271-116892998) enthält keine CpG-Islands aber potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen (schwarz). (B) Der unmittelbare Promotor (chr8:116750097-116751606) enthält dagegen neben potentiellen Bindestellen für mehrere Transkriptionsfaktoren (schwarz) auch ein CpG-Islands (grün).



Die Promotoraktivität dieser Konstrukte wurde in mehreren verschiedenen Zellsystemen getestet. In CHO-, HEK293- und HeLa-Zellen konnte keine Promotoraktivität des alternativen Promotors gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Der unmittelbare Promotor hingegen zeigte in HEK293- und HeLa-Zellen eine signifikante Aktivität (s. Abb. 24 A). In der murinen Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 war jedoch eine signifikante Promotoraktivität des alternativen Konstruktes zu verzeichnen, während der normale *TRPS1*-Promotor in diesem Zellsystem keine signifikante Aktivität zeigte (s. Abb. 24 B). Weil der putative alternative Promotor eine Gli3-Bindestelle enthält (s. 3.4.1.4 und Abb. 22) wurde parallel zum Test auf Promotoraktivität auch die mögliche Regulation des Promotors durch Gli3A untersucht. Allerdings scheint die Aktivität des alternativen *TRPS1*-Promotors in dem aktiven Zellsystem unabhängig von Gli3A zu sein (s. Abb. 24 B und C). Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass die Mutation der Transkriptionsfaktorbindestelle keinen Einfluss auf die Aktivität der Promotorregion hat (s. Abb. 24 C). Des Weiteren führt diese Mutation zu keiner Aktivitätssteigerung in HEK293-Zellen (s. Abb. 24 D). Interessanterweise führt die Mutation aber zu einer Gli3A-unabhängigen Promotoraktivität in primären Chondrozyten aus Mausembryonen (s. Abb. 24 E). In diesem Zellsystem ist der wildtypische Promotor nicht aktiv und auch nicht signifikant durch Gli3A-Coexpression aktivierbar. Erst durch die Mutagenese der Gli3-Bindestelle hat das Reporterkonstrukt eine signifikante Promotoraktivität (dieses Experiment wurde von Dr. Manuela Wülling im ZMB Essen durchgeführt).



**Abb. 24: Ergebnisse von Reporter-Gen-Assays mit *TRPS1*-Promotorkonstrukten.**

Dargestellt sind Mittelwerte von min. Vierfachbestimmungen sowie die entsprechenden Standardabweichungen. Es ist exemplarisch eines von min. zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. pGL4.10: Basalaktivität des promotorlosen Reportervektors; Hellgrau: Transfektionen ohne Effektorstrukturen; Dunkelgrau: Cotransfektionen eines Gli3A-Expressionsplasmids. (A) Test des unmittelbaren Promotors des *TRPS1*-Gens (*TRPS1*normal) in HEK-293- (vorne,  $p=0,0001295$ ) und HeLa-Zellen (hinten,  $p=3,967e-05$ ). (B) Vergleich des unmittelbaren (*TRPS1*normal) und des alternativen (*TRPS1*upstream) *TRPS1*-Promotors in NIH/3T3-Zellen. Die Regulation des normalen Promotors durch Gli3A wurde nicht getestet (n.b.), da *in silico*-Analysen keine Gli3-Bindestellen in dem Konstrukt zeigten ( $p=0,0001967$ ). (C, D, E) Test des Effekts einer Mutation in der Gli3-Bindestelle des alternativen *TRPS1*-Promotors. Es wurden wildtypisches (*TRPS1*upstream) und mutiertes Konstrukt (*TRPS1*upstream mutGli3bs) in den Zellsystemen NIH/3T3 (C,  $p=0,0004774$  und  $p=0,0003558$ ), HEK-293 (D) und in primären Chondrozyten aus Mausembryonen (E,  $p=3,787e-13$ ) verglichen. Da der alternative *TRPS1*-Promotor bei Coexpression von Gli3A in (B) etwas weniger aktiv, in (C) aber etwas aktiver ist, ist von keiner realen Regulation durch Gli3A auszugehen. Ferner ist die scheinbare Aktivierung durch Gli3A in (E) als experimentelles Artefakt anzusehen, da die Tendenz auch nach Mutagenese der Bindestelle erhalten bleibt.

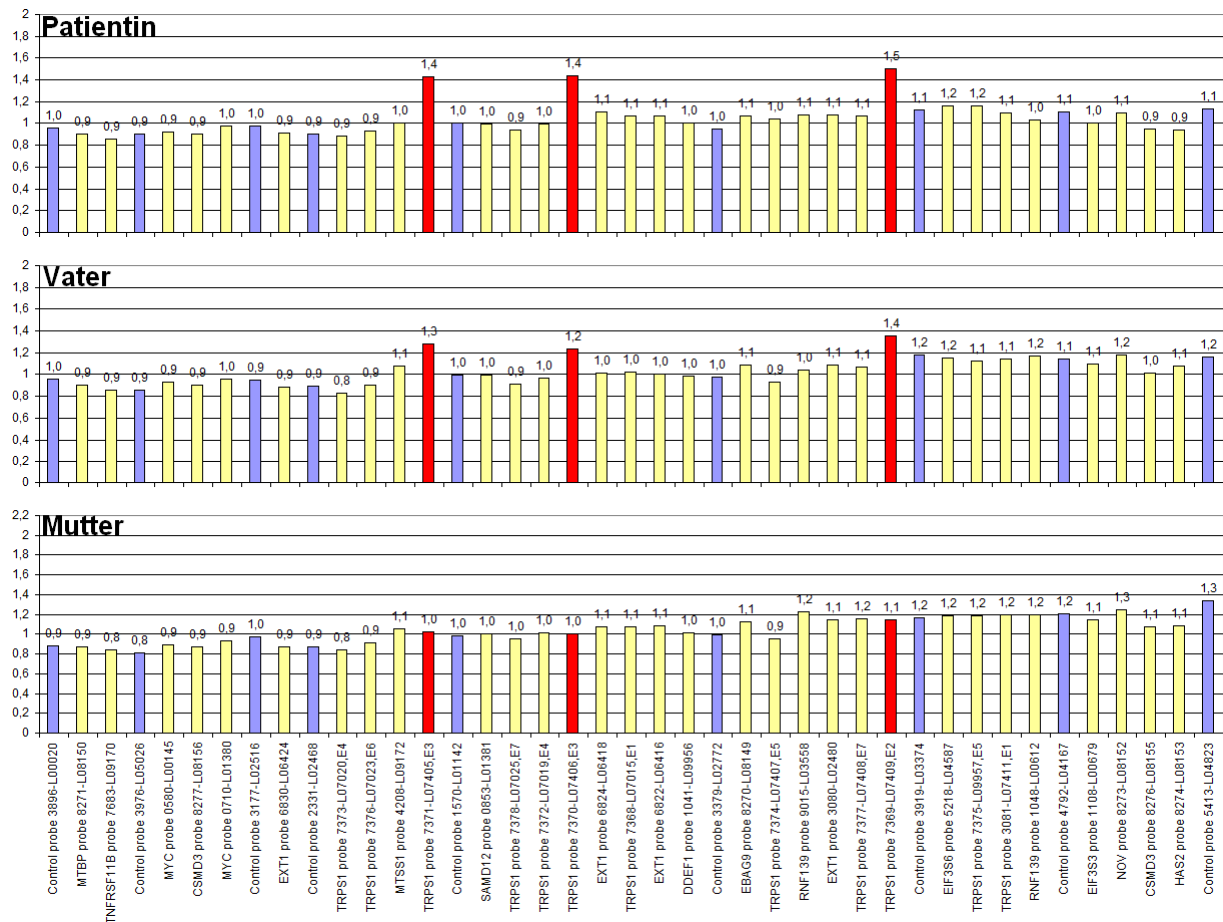
### 3.4.2 Untersuchungen zum Pathomechanismus bei einer Patientin mit TRPS I

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere Patientin molekulargenetisch untersucht, bei der ein Tricho-Rhino-Phalangeales Syndrom Typ I diagnostiziert wurde. Die klinische Diagnose war auch in diesem Fall eindeutig und wurde von erfahrenen Humangenetikern gestellt. Die Patientin weist alle charakteristischen craniofazialen Merkmale eines TRPS auf (vgl. 1.3). Darüber hinaus wurden auch skelettale Anomalien wie Klinodaktylie, Hüft dysplasie und Minderwuchs diagnostiziert. Die Patientin wies keine mentale Retardierung und, wie für ein TRPS I üblich, keine multiplen kartilaginären Exostosen auf. In diesem Fall wurde auch über einige TRPS-typische Merkmale beim Vater berichtet, die aber milder ausgeprägt waren, als bei der Patientin selbst.

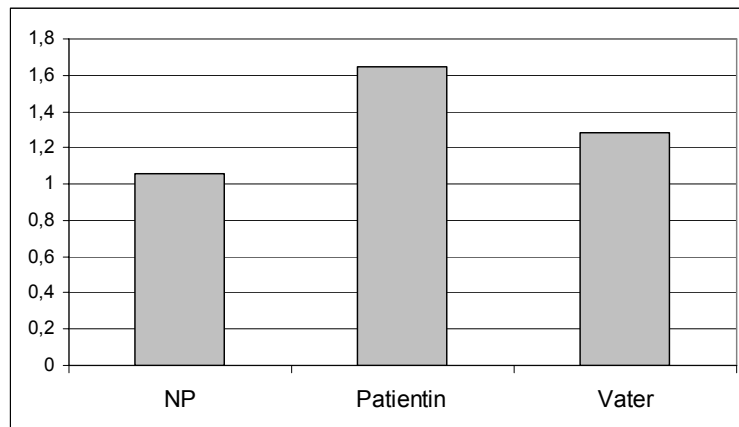
#### 3.4.2.1 Molekulargenetische Analysen bei einer Patientin mit TRPS I

Um die klinische Diagnose molekulargenetisch zu bestätigen, wurde zunächst ein Mutationsscreening durchgeführt. Die einzige Veränderung im proteincodierenden Teil des *TRPS1*-Gens, die bei Patientin und Vater gefunden wurde, war eine Veränderung (G>T) an Position 2619 der cDNA. Da diese das dritte Nukleotid des Codons 873 betrifft und zu keiner Aminosäureveränderung führt, ist jedoch davon auszugehen, dass es sich hierbei nicht um eine krankheitsursächliche Mutation, sondern um einen Polymorphismus handelt. Bei der Kopienzahlanalyse mittels MLPA fiel dann jedoch auf, dass in der genomischen DNA der Patientin die Exons 2 und 3 des *TRPS1*-Gens dupliziert erschienen (s. Abb. 25 oben). Ein ähnlicher, aber weniger deutlicher Befund lag auch beim Vater der Patientin vor, was die Vermutung nahe legt, dass die genetische Aberration bei ihm im Mosaik vorliegt (s. Abb. 25 mittig). Die gesunde Mutter der Patientin weist dagegen keinerlei Kopienzahlveränderungen in der Region auf, die durch die Sonden der TRPS1-LGS-MLPA abgedeckt ist (s. Abb. 25 unten). Mittels quantitativer Real-Time-PCR konnte verifiziert werden, dass das Exon 3 bei der Patientin dupliziert ist. Diese Duplikation konnte beim Vater ebenfalls detektiert werden, wobei die Messergebnisse nahe legen, dass diese nicht in allen Zellen vorhanden ist, also ein somatisches Mosaik vorliegt (s. Abb. 26). Um die Orientierung des duplizierten Fragments zu klären,

wurde eine RT-PCR mit einem forward-Primer in Exon 3 und einem reverse-Primer in Exon 2 durchgeführt. Durch anschließende Sequenzierung des Produkts konnte nachgewiesen werden, dass Exon 3 auf Exon 2 gespleißt wird, also eine Tandemlage der Duplikation existieren muss (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 25: MLPA-Analyse an genomischer DNA der o.g. Patientin und dessen Eltern.** Die Positionen der Sonden, die für die Exons zwei und drei des *TRPS1*-Gens spezifisch sind, sind rot markiert. Alle anderen *TRPS1*-spezifischen Sonden sowie die Sonden für flankierende Gene auf 8q sind gelb dargestellt. Blau markierte Positionen repräsentieren Kontrollsonden für die Methodvalidierung. Die rot markierten Sonden zeigen bei der gesunden Mutter eine normale Dosis (unten), während die Tochter (oben) eine Kopienzahlveränderung aufweist. Es handelt sich daher bei dieser Patientin um eine partielle Duplikation des *TRPS1*-Gens, die die Exons zwei und drei umfasst. Bei dessen Vater (mittig) ist der Befund weniger deutlich, was auf eine Mosaikdeletion hinweist.

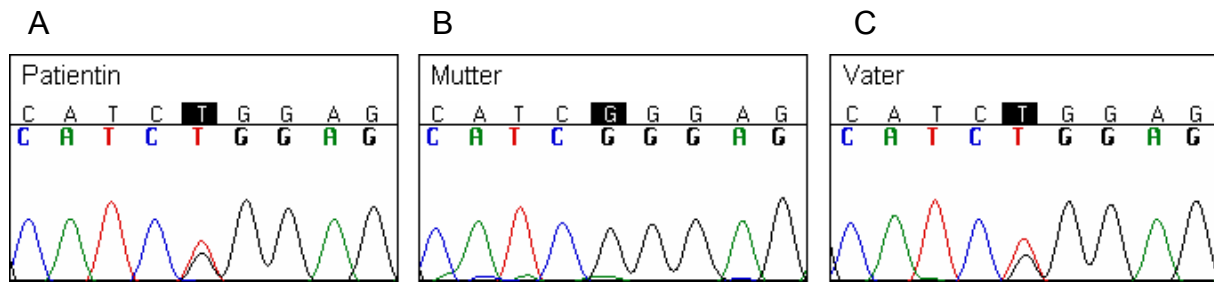


**Abb. 26: qPCR-Analyse bzgl. des Exons 3 von *TRPS1* (UPL-Sonde 34).**

Die gesunde Kontrollperson (NP, links) hat eine Dosis von 1, während die Patientin den Bereich auf einem Allel dupliziert trägt (mittig). Der Vater scheint die partielle Duplikation des *TRPS1*-Gens ebenfalls, wenn auch als somatisches Mosaik, zu tragen (rechts).

### 3.4.2.2 Quantitative Analyse der allelischen Transkription

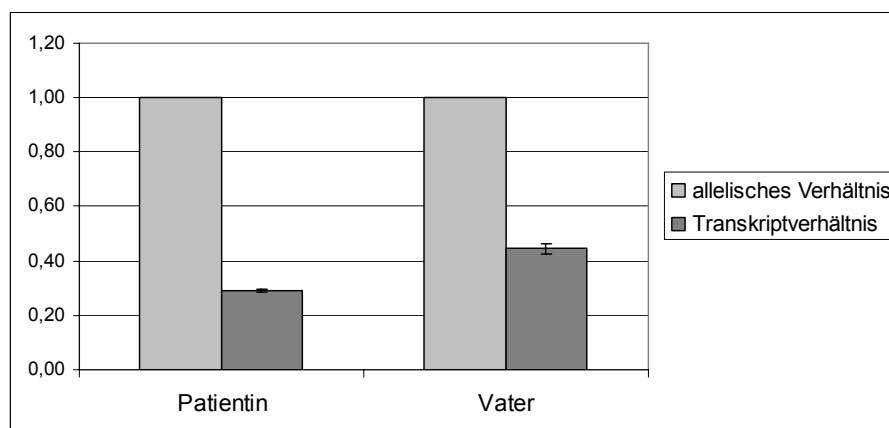
Die partielle Duplikation bei Vater und Tochter beinhaltet das Exon 3, in dem der Translationsstart lokalisiert ist, und liegt in Tandemlage vor. Das Exon 3 endet zwar mit einem vollständigen Codon, wird aber auf das nicht-codierende Exon 2 gespleißt, so dass es zu einer Leserasterveränderung und daraus resultierend zu einem vorzeitigen Translationsstopp kommt. Somit ist in diesem Fall eine partielle Duplikation des *TRPS1*-Gens die krankheitsursächliche genetische Veränderung. Um zu überprüfen, welche Auswirkung dies auf die allelische Transkription hat, wurden quantitative Primer Extension Analysen mittels SNaPshot-Technologie durchgeführt. Hierzu konnte sich der private SNP der Familie zu Nutze gemacht werden, der in Exon 5 lokalisiert ist. Die Mutter trägt an der Stelle das wildtypische Allel G homozygot, während Vater und Tochter heterozygot G/T sind (s. Abb. 27). Somit ist das T-Allel bei der Tochter paternalen Ursprungs und in Phase mit der partiellen Duplikation.



**Abb. 27: Sequenzierung des seltenen Polymorphismus in Exon 5 des *TRPS1*-Gens.**

Die Patientin (A) und ihre Vater (C) sind heterozygot für den SNP (G/T), während die Mutter (B) homozygot für das G-Allel ist. Demzufolge ist das T-Allel unserer Patientin paternalen Ursprungs.

Durch die quantitative Analyse der allelischen Transkription konnte gezeigt werden, dass dieses Allel sowohl bei der Patientin als auch bei ihrem Vater unterrepräsentiert ist (s. Abb. 28). Folglich scheint die partielle Duplikation die Transkription zu stören bzw. das Transkript zu destabilisieren.



**Abb. 28: Ergebnisse der Primer Extension Experimente bzgl. der Patientin mit *TRPS I*.**

Es ist jeweils das Transkriptverhältnis T/G (dunkelgrau) im Verhältnis zum genomischen Allelverhältnis (hellgrau) für die Patientin (links) und ihren Vater (rechts) gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Messungen unter Verwendung sowohl eines forward- als auch eines reverse-SNaPshot-Primers.

## 4. Diskussion

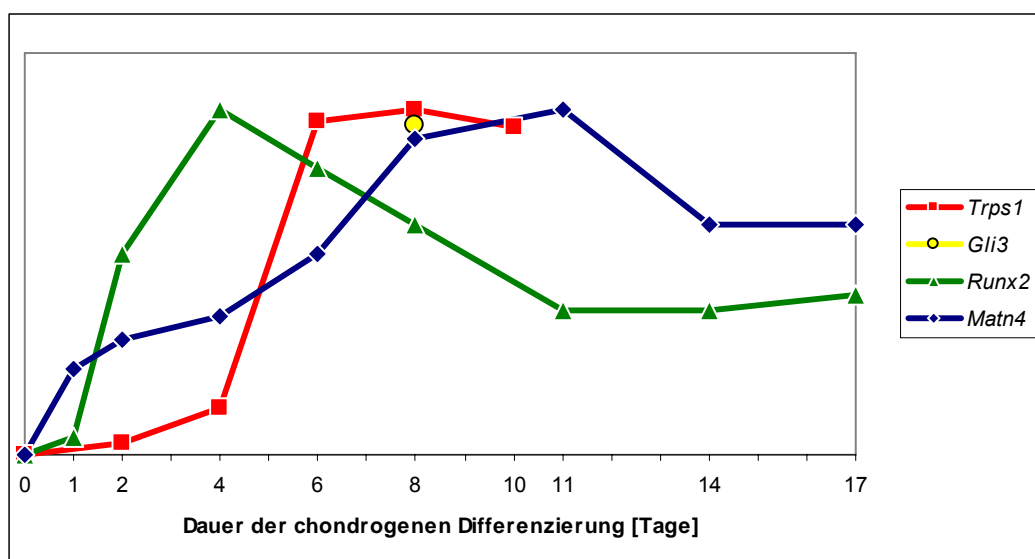
Im Vorfeld dieser Arbeit war nur ein einziges Gen (*RUNX2*) als Zielgen des Transkriptionsfaktors TRPS1 publiziert. Durch Vergleich von Expressionsprofilen verschiedener Gewebe wildtypischer und *Trps1*-defizienter Mäuse konnten aber in unserer Arbeitsgruppe einige Gene (u.a. *EXTL2* und *MATN4*) identifiziert werden, die direkt oder indirekt von TRPS1 reguliert schienen. In unabhängigen Real-Time qPCR-Experimenten konnten die relativen Expressionsunterschiede von sieben Genen verifiziert werden, die differentiell exprimiert erschienen und eine Rolle in der Knochenentwicklung spielen (darunter *EMP3*, *HSPG2* und *LAPTM4B*). Einige dieser Gene sollten im Rahmen dieser Arbeit als direkte Zielgene von TRPS1 verifiziert werden. Des Weiteren sollten mithilfe der CHIP-Seq-Technologie weitere, direkte Zielgene gefunden werden. Im Laufe dieser Arbeit wurden die TRPS1-Zielgene *STAT3*, *PTHrP* und *BGLAP* veröffentlicht. Diese sollten als Positivkontrollen für die geplanten Experimente dienen.

Da zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenig über den genauen Transkriptionsstart und die Regulation der *TRPS1*-Expression bekannt war, sollte auch dieses Gebiet genauer erforscht werden. Hierdurch sollten alternative, möglicherweise gewebespezifische Promotoren gefunden und Faktoren identifiziert werden, die an der Regulation von *TRPS1* beteiligt sind. Dies ermöglicht, ebenso wie die Identifizierung von Zielgenen, die Einordnung von TRPS1 in Regulationsnetzwerke und somit ein besseres Verständnis der TRPS-Pathogenese.

### 4.1 Proteinbiochemische Analyse von chondrogen differenzierten ATDC5-Zellen (Zeitverlauf)

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war die Identifikation von Zielgenen des Transkriptionsfaktors TRPS1. Als Zellsystem für eine CHIP-Seq-Analyse wurden zum chondrogenen Wachstum differenzierte ATDC5-Zellen gewählt. Die proteinbiochemische Analyse im zeitlichen Verlauf sollte sicherstellen, dass das Experiment zu einem Zeitpunkt durchgeführt wird, an dem die *Trps1*-Expression maximal ist. Die Veränderung des ATDC5-Expressionsprofils während der chondrogenen Differenzierung wurde bereits in mehreren Publikationen analysiert (Chen *et al.* 2005,

Shinomura *et al.* 2006, Osawa *et al.* 2006). Jedoch ist das *Trps1*-Gen in keiner dieser Arbeiten erfasst worden. Im Rahmen dieses Forschungsprojekts konnte nun ein mit der Induktionszeit korrelierender *Trps1*-Expressionsanstieg bis zum Tag acht nachgewiesen werden (s. Abb. 29). Shinomura *et al.* sind 2006 auf der Suche nach Transkriptionsfaktoren, die nach achttägiger Differenzierung von ATDC5-Zellen hochreguliert sind, auf Gli3 gestoßen. Die simultane Expression von *Trps1* und Gli3 in chondrogen differenzierenden ATDC5-Zellen wird unterstützt von den Forschungsergebnissen, nach denen *Trps1* mit der Aktivatorform von Gli3 interagiert (Wülling *et al.* 2009). Interessanterweise zeigt das Expressionsprofil von *Runx2* einen steilen Anstieg bis Tag vier der Induktionsphase, gefolgt von einem ähnlich steilen Abfall bis elf Tage nach Induktionsbeginn (Chen *et al.* 2005, s. Abb. 29). Da das *Runx2*-Gen durch *Trps1* reprimiert wird (Napierala *et al.* 2005), könnte die signifikante *Runx2*-Reduktion ab Tag sechs durch den Anstieg der *Trps1*-Expression in diesem Zeitraum begründet sein. Das Gen *Matn4* wird in *Trps1*-defizienten Mäusen geringer exprimiert als in wildtypischen Geschwistern (Brega 2005), was auf eine positive Regulation von *Matn4* durch *Trps1* hindeutet. Der Expressionsanstieg dieses Gens während der chondrogenen Differenzierung von ATDC5-Zellen findet in zwei Schüben statt (Chen *et al.* 2005, s. Abb. 29). Das im Rahmen dieser Arbeit gezeigte *Trps1*-Expressionsprofil lässt somit vermuten, dass *Trps1* an der zweiten Aktivierungsphase von *Matn4* beteiligt ist.



**Abb. 29: Schematische Darstellung der Expressionsprofile der Gene *Trps1*, *Gli3*, *Runx2* und *Matn4* im Verlauf der chondrogenen Differenzierung von ATDC5-Zellen.** *Trps1*: diese Arbeit, *Gli3*: nach Shinomura *et al.* 2006, *Runx2* und *Matn4*: nach Chen *et al.* 2005.



## 4.2 Identifikation und Verifizierung von TRPS1-Zielgenen per Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatinimmunpräzipitationen wurden durchgeführt, um per anschließender Sequenzierung direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors TRPS1 zu identifizieren. Die Anreicherung spezifischer Sequenzen in den Präzipitaten deutet darauf hin, dass diese Sequenzen *in vivo* mit dem Protein von Interesse assoziiert sind. Hierbei ist die Qualität des verwendeten Antikörpers von entscheidender Bedeutung.

Die PCR-basierte Analyse der Präzipitate diente der Qualitätskontrolle des Experiments. Leider konnte keine signifikante Anreicherung der potentiellen Zielgenpromotoren *Hspg2* und *Ptch1* gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Promotoren nicht um direkte Targets, sondern sie werden indirekt durch TRPS1 reguliert. Zum einen könnte TRPS1 Gene regulieren, deren Genprodukte *Hspg2* oder *Ptch1* regulieren. Zum anderen bestünde die Möglichkeit, dass TRPS1 nicht direkt an die DNA-Sequenzen bindet, sondern seine regulatorische Funktion durch Interaktion mit anderen, in dem gewählten Zellsystem nicht ausreichend vorhandenen, Faktoren ausübt.

Die bereits publizierten TRPS1-Zielgenpromotoren hätten aber spezifisch in den anti-TRPS1-Ansätzen angereichert werden sollen. Dies war jedoch ebenfalls nicht der Fall. Die Amplifikationsrate des *Bglap*-Promotors war in allen Ansätzen zu hoch, so dass eine spezifische Anreicherung nicht detektierbar war. Eine Optimierung der PCR-Parameter war allerdings aufgrund der geringen Präzipitatenmengen zum Zeitpunkt des Experiments nicht mehr möglich. Die aus der Publikation von Suemoto *et al.* (2007) übernommenen PCRs zur Amplifikation des *Stat3*-Promotors bedurften dagegen keiner weiteren Optimierungsarbeit. Es konnte in den anti-TRPS1-Ansätzen zwar eine höhere Amplifikatmenge erzielt werden, man kann aber auch hier nicht von einer signifikanten Anreicherung sprechen. Die übrigen PCR-Analysen lassen vermuten, dass die anti-TRPS1-ChIP zur Copräzipitation unspezifischen DNA-Materials geführt hat. Dies kann zum einen im Grad der Stringenz der Waschschriffe, zum anderen aber auch in der Qualität des Antikörpers begründet sein.

Anhand der Analysen mit dem Primer-Set der Firma Diagenode konnte gezeigt werden, dass die spezifische Anreicherung des *Gapdh*-Promotors durch den anti-TBP-Antikörper funktioniert hat. Das Experiment (Effizienz von Crosslinking, Shearing etc.) hat also generell funktioniert. Allerdings handelt es sich bei dieser

Positivkontrolle um ein Housekeeping-Gen, das ubiquitär stark exprimiert wird. Eventuell war die *Trps1*-Expression im Gegensatz dazu trotz Expressionskontrolle auf Proteinebene nicht hoch genug für eine erfolgreiche ChIP. Des Weiteren wäre möglich, dass in dem gewählten Zellsystem nicht alle notwendigen Cofaktoren für eine *Stat3*-Regulation durch *Trps1* exprimiert werden.

Ferner wird darüber spekuliert, ob der Multityp-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *TRPS1* überhaupt direkte Zielsequenzen hat. Es ist unstrittig, dass *TRPS1* in artifiziellen Reporter-Systemen an GATA-Sequenzen in Promotoren binden kann. Es wäre aber möglich, dass dieser Effekt nur in dem künstlichen Überexpressionssystem auftritt, in dem möglicherweise auch nicht alle notwendigen Cofaktoren von *TRPS1* zugegen sind. Die hohe Homologie der Repressionsdomänen von *TRPS1* und *IKAROS* legen außerdem nahe, dass *TRPS1* Genexpression ebenso wie *IKAROS* nicht nur durch direkte Bindung an Promotoren (Koipally und Georgopoulos 2000, Kathrein *et al.* 2008), sondern auch durch Modifikation der Chromatinkonformation (Kim *et al.* 1999, Keys *et al.* 2008) regulieren kann. Interessanterweise werden beide Proteine posttranslational durch SUMOylierung reguliert (Gomez-del Arco *et al.* 2005, Kaiser *et al.* 2007). Allerdings beeinflusst die Modifikation die *IKAROS*-Wirkung negativ, während sie die *TRPS1*-Wirkung positiv beeinflusst.

Da mittels der PCR-basierten Analysen keine spezifische Anreicherung nachgewiesen werden konnte, war fraglich, ob durch eine vergleichende Hochdurchsatzsequenzierung Anreicherungen gefunden worden wären. Wir haben uns deshalb für eine neue Strategie entschieden. Um zu gewährleisten, dass das Zellsystem möglichst viele der benötigten Cofaktoren bereithält, wird weiterhin mit ATDC5-Zellen gearbeitet. Diese lassen sich leider nur sehr schlecht mit herkömmlichen Methoden transient transfizieren, so dass ein retrovirales System zu Hilfe genommen wird, um *TRPS1* in ausreichender Menge in ATDC5-Zellen überzuexprimieren. Es bleibt unklar, in wie weit der spezifische Antikörper für Chromatinimmunpräzipitationen geeignet ist. Da zum Zeitpunkt der Projektplanung keine *TRPS1*-Antikörper kommerziell erhältlich waren, die für eine ChIP geeignet gewesen wären, wird das *TRPS1* mit einem N-terminalen c-Myc-Anhang fusioniert. Dies bietet nicht nur die Möglichkeit mit einem qualitativ hochwertigen anti-c-Myc-ChIP-Antikörper zu präzipitieren, sondern verbessert auch die Vergleichbarkeit zu anderen parallel mit diesem Antikörper durchgeführten ChIPs. So ist unser Ziel, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Vortkamp (Institut für

Entwicklungsbiologie, ZMB Essen), vergleichende ChIPs mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper an Material aus ATDC5-Zellen durchzuführen, die retroviral c-Myc-TRPS1 bzw. c-Myc-Gli3 überexprimieren. Da für den Transkriptionsfaktor Gli3 einige Zielgene gut charakterisiert wurden, wird dieser Ansatz die PCR-basierte Qualitätskontrolle massiv vereinfachen. Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass Trps1 durch Interaktion mit der Aktivatorform von Gli3 die Größe der Zone distaler Chondrozyten in der Wachstumsfuge reguliert (Wülling *et al.* 2009). Wir hoffen, durch diesen vergleichenden Ansatz, Gene identifizieren zu können, die gemeinsam von Trps1 und Gli3 reguliert werden.

#### **4.3 Identifikation und Verifizierung von TRPS1-Zielgenen durch funktionelle Promotorstudien**

Luciferase-Reporter-Gen-Assays mit dem *Hspg2*-Volllänge-promotor und verschiedensten Deletionskonstrukten im pGL3-Vektorsystem (Promega) zeigten eine Repression durch überexprimiertes TRPS1. Da jedoch auch der kleinste Anteil des *Hspg2*-Promotors und sogar konstitutive Kontrollpromotoren wie HSV-TK in diesem System reprimierbar waren, ist diese Repression sehr wahrscheinlich durch eine unspezifische Interaktion von TRPS1 mit dem pGL3-Vektor, und nicht durch eine spezifische Interaktion von TRPS1 mit dem jeweiligen getesteten Promotor vermittelt worden. Die Promotoren wurden daraufhin in den Vektor pGL4.10 (Promega) umklontiert und alle weiteren Reporter-Gen-Assays nur in diesem System durchgeführt. Diese neuere Vektorgeneration zeichnet sich u.a. durch ein geringeres Risiko für Expressionsartefakte durch Reduktion putativer regulatorischer DNA-Elemente und Transkriptionsfaktorbindestellen aus.

Mittels funktioneller Promotorstudien wurden die potentiellen TRPS1-Zielgene *HSPG2*, *EMP3*, *EXTL2*, *LAPTM4B* und *MATN4* untersucht. Des Weiteren sollte die Methode mit Hilfe der Gene *STAT3*, *PTH1H* und *BGLAP*, für die bereits eine Abhängigkeit von TRPS1 beschrieben ist, validiert werden.

Das Heparansulfatproteoglykan HSPG2 (auch Perlecan) ist Bestandteil der Extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe und ist von immenser Bedeutung für die Entwicklung und Homeostase des Skeletts. Die Überexpression des *HSPG2*-Gens ist mit Defekten in den Epiphysenfugen der Röhrenknochen assoziiert. Demnach könnte

eine verstärkte *HSPG2*-Expression infolge der reduzierten *TRPS1*-Dosis bei Patienten mit TRPS für einige klinische Zeichen verantwortlich sein.

*EXTL2* ist, wie *EXT1*, ein Schlüsselenzym für die Heparansulfat-Biosynthese. Heparansulfate sind nicht nur Bestandteile von Proteoglykanen in der Extrazellulären Matrix sondern regulieren auch die Verteilung und Rezeptorbindung etlicher Wachstumsfaktoren (Perrimon und Hacker 2004). Für *EXT1* ist bereits gezeigt worden, dass die *EXT1*-abhängigen Heparansulfat-Level in sich entwickelnden Knochen das IHH-Signalling regulieren (Koziel *et al.* 2004). Somit könnte der veränderte *TRPS1*-Level bei Patienten mit TRPS durch Hochregulation von *EXTL2* indirekt auf den IHH-Signaltransduktionsweg einwirken.

*LAPTM4B* sowie *MATN2* sind bei *TRPS1*-Defizienz hochreguliert, während *MATN4* schwächer exprimiert wird. Von *LAPTM4B* ist bekannt, dass es regulierend in den Zellzyklus eingreift (He *et al.* 2003). Die Matriline 2 und 4 sind dagegen weitere Komponenten der Extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe mit korrespondierenden Expressionsprofilen (Klatt *et al.* 2002). Demnach wäre eine Regulation der ECM-Komposition durch *TRPS1* denkbar. Vorstellbar wäre eine Art Funktionsredundanz, die die unterschiedliche differenzielle Expression von *Matn2* und *Matn4* in *Trps1*-defizienten Mäusen erklären könnte. Interessanterweise konnten durch intergenes Spleißen entstandene Transkriptionseinheiten von *LAPTM4B* und *MATN2* gefunden werden (Maeda *et al.* 2005). Eine gleichzeitige Regulation der beiden Gene in *TRPS1*-defizienten Mäusen könnte folglich auch in der Regulation dieses Mechanismus begründet sein.

Die Expression von *BMP2* vermittelt die Aktivierung von STAT3 durch Phosphorylierung. Interessanterweise ist die *TRPS1*-Expression über den MAPK-Signalweg durch *BMP7* hochreguliert (Gai *et al.* 2009). Es wäre demnach möglich, dass die BMPs die Aktivität von STAT3 sowohl über die Regulation seiner posttranslationalen Modifikation als auch über die Aktivierung seines Transkriptionsrepressors modulieren. Ferner wäre auch eine Interaktion von *TRPS1* mit solchen Wachstumsfaktoren denkbar, da der Transkriptionsfaktor regulierend in den Zellzyklus eingreift.

Die Mehrheit der klonierten Promotorbereiche zeigte keinerlei Promotoraktivität im Luciferase-Assay. Dies kann zum einen daran liegen, dass nicht das geeignete Zellsystem gewählt wurde, in dem alle notwendigen Faktoren im korrekten Verhältnis vorliegen. Zum anderen wäre möglich, dass essentielle Anteile der größtenteils nicht

gut charakterisierten Promotoren nicht in den klonierten Fragmenten enthalten waren.

Die klonierten Promotorbereiche der Gene *HSPG2*, *EMP3* und *STAT3* zeigten signifikante Aktivitäten in beiden Zellsystemen. Jedoch war, sofern die Promotorkonstrukte im pGL4-Vektorsystem eingebracht waren (s.o.), keine Repression durch die Überexpression von TRPS1 zu erreichen. Möglicherweise bestand schon in dem Ansatz ohne TRPS1-Überexpression ein gewisser Repressionslevel durch endogenes Trps1, der nicht weiter gesteigert werden kann. *HSPG2* und *EMP3* könnten ferner auch indirekt durch TRPS1 reguliert werden. Denkbar wäre außerdem ein Defizit an entsprechenden Cofaktoren. Die publizierte direkte *Stat3*-Regulation wurde z.B. in primären Chondrozytenkulturen von wildtypischen und *Trps1*-defizienten Mäusen gezeigt. In einem solchen Ansatz ist nicht nur die Anwesenheit aller nötigen Cofaktoren gewährleistet. Das System ist des Weiteren unabhängig von Cotransfektionen/Überexpressionen und Artefakten durch die Anwesenheit endogenen Trps1 in allen Ansätzen. Die Strategie birgt jedoch auch das Risiko der Detektion indirekter Regulationen. Die Defizienz endogenen Trps1 könnte zur vermehrten Synthese Trps1-regulierter Regulatoren/Cofaktoren führen, die ihrerseits regulatorisch auf den getesteten Promotor einwirken.

Im Rahmen einer BMBF-geförderten Kooperation mit dem Institut für Entwicklungsbiologie (ZMB, Universität Duisburg-Essen) wurden einige Experimente in ATDC5-Zellen und primären Chondrozyten aus Gliedmaßen von wildtypischen Mausembryonen unter Verwendung exogenen TRPS1 wiederholt. Diese Experimente zeigten, dass die TRPS1-abhängige *Stat3*-Regulation eines sehr spezifischen Sets von Cofaktoren bedarf, da die Repression ausschließlich in den Primärzellen reproduziert werden konnte (Wülling, persönliche Mitteilung). Daher ist davon auszugehen, dass dieser Regulation ein komplexer Mechanismus zugrunde liegt. Vermutlich sind nur in diesen sehr spezialisierten Zellen alle notwendigen Cofaktoren für eine TRPS1-abhängige Genregulation vorhanden.

Ferner konnte eine Promotoraktivität des *EXTL2*-, *LAPTM4B*-, *MATN4*- und des *PTHLH*-Konstrukts in ATDC5-Zellen gemessen werden, die aber nicht TRPS1-reguliert war (Daten nicht gezeigt). Dies deutet ebenfalls daraufhin, dass die Promotoren nur in spezialisierten Zellsystemen aktiviert werden können. Ähnliches gilt für das *BGLAP*-Konstrukt, das eine nicht TRPS1-regulierte Aktivität in primären Chondrozytenkulturen zeigte (Daten nicht gezeigt). In diesem Experiment konnte

allerdings die RUNX2-vermittelte Aktivierung des humanen *BGLAP*-Promotors durch TRPS1 reprimiert werden. Demnach kann man spekulieren, dass die Regulation des für Osteocalcin codierenden *BGLAP*-Gens nicht durch direkte Interaktion von TRPS1 mit dem entsprechenden Promotor stattfindet, sondern durch die nachgewiesene Interaktion mit *RUNX2/RUNX2* (Napierala *et al.* 2005, Napierala *et al.* 2008). Interessanterweise fungiert das Protein FHL2, welches in unserer Arbeitsgruppe mittels Yeast-2-Hybrid-Screenings als Interaktionspartner von TRPS1 identifiziert werden konnte (Kaiser, unveröffentlicht), als Coaktivator von RUNX2 für *BGLAP* (Günther *et al.* 2005). Folglich wäre denkbar, dass TRPS1 mit dem RUNX2/FHL2-Aktivorkomplex interagiert und die *BGLAP*-Expression auf diese Weise reprimiert. Die Diskrepanz unserer Ergebnisse zu der Veröffentlichung bezüglich der Osteocalcin-Regulation durch TRPS1 kann aber auch andere Gründe haben. Möglicherweise ist die *TRPS1*-Expression in den von Piscopo und Kollegen verwendeten Zelllinien U2OS und ROS17/2.8 signifikant geringer, so dass keine Repression des Reporterkonstrukts durch endogenes TRPS1 erfolgt, wohingegen aber in primären Chondrozyten der Maus schon ein gewisser Repressionslevel herrscht. Dies würde bedeuten, dass ein Effekt durch *TRPS1*-Überexpression nur in den Zelllinien, nicht aber in der Primärkultur zu finden wäre. Somit würde, wie in unseren Ergebnissen, nur die Repression der Aktivierungsaktivität des exogenen RUNX2 durch exogenes TRPS1 messbar sein. Des Weiteren muss angemerkt werden, dass die Reporter-Gen-Assays in genannter Publikation in dem pGL3-Vektorsystem durchgeführt wurden, das sich in unseren Experimenten als problematisch im Bezug auf die Untersuchung von TRPS1-Regulation (in CHO und HeLa) herausstellte. Dabei ist es sehr wahrscheinlich, dass TRPS1 über seinen GATA-Zinkfinger eine Interaktion mit dem pGL3-Vektorrückgrat eingeht, da die unspezifische Repression mehrerer Promotoren (darunter SV40 und HSV-TK) durch die Mutation T901P im Exon 6 von *TRPS1* aufgehoben wird (Daten nicht gezeigt). Vermutlich ist das endogene TRPS1 in den Zelllinien U2OS und ROS17/2.8 ausreichend, um eine solche Repression des vermeintlichen Kontrollvektors herbeizuführen, so dass dieser durch exogenes TRPS1 unreguliert erscheint.

#### 4.4 Untersuchungen zum Pathomechanismus bei Patienten mit TRPS und ungeklärter Pathogenese

Trotz der stetigen Verbesserung und Ausweitung der Methoden in der molekulargenetischen Diagnostik, ist bei etwa 5% der Patienten mit klinisch eindeutigem TRPS bislang keine krankheitsursächliche genetische Aberration gefunden worden, die die kodierende Region des *TRPS1*-Gens betrifft.

Um den Pathomechanismus bei solchen Patienten aufzuklären, wurde die *TRPS1*-Expression bei einer Patientin mit einem TRPS II untersucht. Zunächst wurde die Deletion dieser Patientin genau kartiert. Die Bruchpunktregionen wiesen keinerlei repetitive Sequenzen auf, die für die Deletion ursächlich gewesen sein könnten. Der proximale Bruchpunkt dieser 4,2 Mb-Deletion liegt 21 kb vom regulären *TRPS1*-Transkriptionsstartpunkt entfernt. Trotzdem weist die Patientin einen für TRPS charakteristischen Phänotyp auf. Die Analyse der allelischen Transkription zeigte, dass das in Phase mit der Deletion stehende väterliche Allel erheblich schwächer exprimiert wird, als dies bei gesunden Kontrollpersonen der Fall ist. Die allelische Diskriminierung erfolgte hierbei anhand eines exprimierten SNPs im 3'-UTR des *TRPS1*-Gens. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die Deletion von Elementen, die mindestens 21 kb stromaufwärts von *TRPS1* liegen, die Transkription dieses Gens beeinflusst.

In den öffentlichen Datenbanken ist ein *TPRS1*-Transkript beschrieben worden, das Anteile von 140 kb upstream und 32 kb upstream von *TRPS1*, sowie 97 bp von Intron 1 auf das reguläre Exon 2 gespleißt enthält (EST-Klone BP357146 und BP357181). Mittels RT-PCR konnten diese beiden upstream-Exons verifiziert und zwei weitere identifiziert werden. Da in keinem dieser Transkripte der Anteil aus Intron 1 gefunden werden konnte, ist anzunehmen, dass nicht alle möglichen alternativen Transkriptkombinationen gefunden wurden bzw. dass ihr Vorkommen gewebespezifisch ist. Per 5'-RACE konnte das 5'-UTR-Exon -4 (-140 kb) auf 264 bp verlängert werden. Es konnte jedoch kein weiteres weiter stromaufwärts gelegenes Exon gefunden werden. Ferner befindet sich vor Exon -4 keine Spleißakzeptorstelle, was darauf hindeutet, dass dieses Exon einen alternativen Transkriptionsstart darstellt.

Die gut konservierte Region stromaufwärts von Exon -4 hat Gli3A-unabhängige Promotoraktivität in NIH/3T3-, nicht aber in CHO-, HEK293- oder HeLa-Zellen. Dieser

Befund, zusammen mit dem Aktivitätsprofil des unmittelbaren Promotors von *TRPS1* (s. 3.4.1.5), lässt darauf schließen, dass die beiden Promotoren Zelltypspezifität aufweisen. Der weiter upstream gelegene Promotor scheint fibroblastenspezifisch zu sein. Interessanterweise sind die alternativen Transkripte in RNA aus Hautfibroblasten einer gesunden Kontrollperson gefunden worden. Der publizierte EST-Klon (s.o.) ist dagegen in Brustdrüsentumorzellen gefunden worden. Es ist bekannt, dass *TRPS1* stark in Brustdrüsengewebe exprimiert wird und in Brusttumoren überexprimiert erscheint (Chang *et al.* 2004, Radvanyi *et al.* 2005). Möglicherweise gibt es auch in diesem Gewebe zelltypspezifische Regulatorelemente und alternative Spleißmuster, die zu spezifischen alternativen Transkripten führen. *TRPS1* wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Zusammen mit dem Befund, dass einige Patienten mit TRPS Fehlbildungen innerer Organe haben (Graybiel *et al.* 2005, Robert und Cooper 2007), deutet dies darauf hin, dass die Expression dieses wichtigen Transkriptionsfaktors tatsächlich komplex über gewebespezifische Promotoren reguliert wird.

Da im Bezug auf *TRPS1* ein besonderes Interesse an der Knochenentwicklung besteht, wurden die Promotoren auch in primären Chondrozyten aus Gliedmaßen von E12.5-Mausembryonen getestet (durchgeführt von Dr. Manuela Wülling, Institut für Entwicklungsbiologie, ZMB Essen). In diesen Primärzellen haben beide Promotoren nur basale Aktivitäten. Auch hier kann keine Regulation durch Gli3A verzeichnet werden. Allerdings führt die gezielte Mutation der Gli3-Bindestelle im *TRPS1*-Upstreampromotor zu einer starken Aktivierung des Reportergens. Dies deutet darauf hin, dass der alternative Promotor des *TRPS1*-Gens in Chondrozyten durch einen Faktor stillgelegt ist, der an diese DNA-Sequenz bindet. Hierbei handelt es sich möglicherweise um die Repressorform des Transkriptionsfaktors Gli3. Um diese Hypothese zu überprüfen, sind weitere Experimente in Arbeit. Durch Zugabe eines Hedgehog-Analogons soll hierbei künstlich eine Situation in den Zellen geschaffen werden, in der es zu keiner Prozessierung zu Gli3R mehr kommen kann. Ist unter diesen Bedingungen auch der wildtypische *TRPS1*-Upstreampromotor aktiv, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass er Gli3-reguliert ist. Die Tatsache, dass der unmittelbare Promotor ebenfalls kaum Aktivität zeigte, könnte in dem späten Chondrozytenstadium begründet sein. In dieser Entwicklungsphase beginnt die *TRPS1*-Expression in Knorpelgewebe schon geringer zu werden (Kunath *et al.* 2002), so dass möglicherweise entsprechende Regulatoren an- bzw. abwesend sind,



wodurch die Expression des Reportergens verhindert wird. Die weitere Charakterisierung der alternativen Promotoren soll dabei helfen, Faktoren zu identifizieren, die die möglicherweise zeit- und ortsabhängige Expression von *TRPS1* regulieren.

Es ist gezeigt worden, dass *TRPS1* sowohl den *RUNX2*-Promotor reprimiert als auch mit dem Genprodukt interagiert (Napierala *et al.* 2005, Napierala *et al.* 2008). Interessanterweise enthält der alternative *TRPS1*-Promotor eine *EVI1*-Bindestelle. *EVI1* ist ein Transkriptionsfaktor, der mit etlichen Coaktivatoren, aber auch Corepressoren, assoziiert. *EVI1* interagiert mit *RUNX1* und supprimiert so die Aktivität dieses Transkriptionsaktivators, indem es seine DNA-Bindungsaffinität herabsetzt (Senyuk *et al.* 2007). *EVI1* inhibiert außerdem die Bindung von *GATA1* an die entsprechenden DNA-Sequenzen (Laricchia-Robbio *et al.* 2006). Des Weiteren aktiviert *EVI1* das Aktivatorprotein 1 (*AP-1*, Tanaka *et al.* 1994). *MMP13* ist eine Collagenase, die u.a. in hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der endochondralen Ossifikation spielt (Gack *et al.* 1995, Johansson *et al.* 1997). Ihre Expression wird über den *PTH/PTHrP*-Signalweg von *AP-1* und *Runx*-Proteinen stimuliert (Selvemurugan *et al.* 1998, Porte *et al.* 1999). Möglicherweise erfolgt eine Coregulation der *TRPS1*- und der *AP1*-abhängigen Collagenase-Expression durch *EVI1*. Denkbar wäre ebenso eine Art Feedback-Loop durch die Interaktion des *TRPS1*-Proteins mit *RUNX2*.

Bei unserer Patientin sind drei der vier neuen 5'UTR-Exons deletiert. Möglicherweise ist die Deletion eines alternativen *TRPS1*-Promotors die Ursache für die allelische Transkriptionsreduktion. Offensichtlich ist schon diese Reduktion der allelischen *TRPS1*-Transkription hinreichend für die Ausprägung des *TRPS*. Auch die Deletion des *TRPS1*-Gens in einem somatischen Mosaik konnte bereits als ausreichende Krankheitsursache identifiziert werden (Shanske *et al.* 2008). In der Literatur gibt es mehrere Hinweise darauf, dass die *TRPS1*-Expression durch die Deletion upstream gelegener Sequenzabschnitte dereguliert werden kann. Bernardini *et al.* berichteten 2007 von einer Patientin mit einer komplexen Umorganisation der langen Arme der Chromosomen sieben und acht. Obwohl der Translokationsbruchpunkt ca. 500 kb vom *TRPS1*-Gen entfernt kartiert wurde, weist diese Patientin *TRPS*-typische Zeichen wie spärliches Haar, eine birnenförmige Nase, ein langes flaches Philtrum und hervorstehende Ohren auf (Bernardini *et al.* 2007). In dieser Publikation wird ein Longrange-Effekt auf das *TRPS1*-Gen diskutiert. Man schlussfolgert, dass die

*TRPS1*-Expression der Patientin möglicherweise durch Trennung des Gens von regulatorischen Elementen, die von der Translokation betroffen sind, verändert wird. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass bereits vielfach Effekte von Deletionen auf die Expression nicht deletierter Nachbargene beschrieben worden sind (Reymond *et al.* 2007). Interessanterweise wurde ein halbes Jahr später von Floris *et al.* von einem Patienten berichtet, der ebenfalls einen Translokationsbruchpunkt ca. 500 kb von *TRPS1* entfernt aufweist, dem aber die typischen TRPS-Merkmale fehlten. Bei ihm wurde neben einem autistischen Syndrom lediglich ein retardiertes Skeletalter diagnostiziert (Floris *et al.* 2008). Die für die *TRPS1*-Expression relevante Region scheint demnach max. 500 kb vom *TRPS1*-Gen entfernt zu sein, so dass sie bei der Patientin von Bernardini *et al.* (2007), bei der der Translokationsbruchpunkt maximal 530 kb upstream von *TRPS1* liegt, gerade noch betroffen, bei dem Patienten von Floris *et al.* (2008), dessen Translokationsbruchpunkt in dem Intervall von 533 – 733 kb upstream von *TRPS1* lokalisiert ist, jedoch nicht mehr involviert ist. Hierfür würde sprechen, dass ein 2008 von McBrien *et al.* publizierter Patient mit einer 1,46 Mb große Mikrodeletion in 8q24.11, dessen proximaler Bruchpunkt in einem Intervall zwischen 600 kb und 800 kb upstream von *TRPS1* liegt, keine klinischen Zeichen eines TRPS aufweist (McBrien *et al.* 2008). Eine weitere mögliche Begründung für die unterschiedlichen Befunde wäre jedoch, dass die *TRPS1*-Expression nicht einfach durch die Trennung des Gens von potentiellen regulatorischen Regionen reprimiert wird, sondern dass es vielmehr von großer Bedeutung ist, in welchen genomischen Kontext das Gen durch die chromosomalen Aberrationen gelangt.

Homozygote Koa-Mäuse zeigen schwere Rippenfehlbildungen, sowie eine generelle Längenreduktion der Röhrenknochen und damit verbundenen Minderwuchs (Katayama *et al.* 2009). Auch die Koa-Inversion ist eine chromosomale Aberration mit einem proximalen Bruchpunkt 791 kb upstream von *Trps1*. Koa-Mäuse exprimieren deutlich weniger *Trps1* in den betroffenen Geweben als wildtypische (Fantauzzo *et al.* 2008). Interessanterweise führt diese Aberration aber zu einem Ambras Syndrom-ähnlichen Phänotyp, also zu einer Hypertrichose. Bereits 2002 wurde ein Patient mit einem überlappenden Merkmalspektrum publiziert. Dieser wies ein langes Philtrum, eine schmale Oberlippe, multiple Exostosen und eine Hypertrichose auf (Wuyts *et al.* 2002). Molekulargenetische Analysen zeigten eine submikroskopische interstitielle Deletion in 8q24, die das *EXT1*-Gen nicht aber das *TRPS1*-Gen beinhaltet. Es ist

bekannt, dass Positionseffekte auf ein krankheitsrelevantes Gen oft Phänotypen hervorrufen, die sich von denen durch Loss-of-Function-Mutationen desselben Gens unterscheiden (Kleinjan und van Heyningen 2005). Man geht davon aus, dass dies darin begründet ist, dass das Gen von wichtigen gewebe- oder zeitspezifischen Regulatoren getrennt wird. Tatsächlich handelt es sich bei einer Vielzahl von Genen, die von solchen Positionseffekten betroffen sind, um solche, die Transkriptionsfaktoren codieren, die in spezifischen Zelltypen und zu distinkten Zeitpunkten während der Entwicklung aktiv sind, und somit einer komplexen Regulation bedürfen (Kleinjan und van Heyningen 1998, Kleinjan und van Heyningen 2005).

Insgesamt unterstützen all diese Forschungsergebnisse die Hypothese, dass die *TRPS1*-Expression durch weit upstream gelegene regulatorische Elemente geregelt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine partielle Duplikation des *TRPS1*-Gens als eine weitere TRPS-hervorrufende genetische Aberration bei einer Patientin mit einem TRPS I identifiziert. Diese liegt in Tandemlage vor und umfasst, neben dem nicht-codierenden Exon zwei, auch das erste codierende Exon drei, und führt somit zu einer Leserasterveränderung und vorzeitigen Translationstermination. Da auch schon auf Transkriptebene eine Reduktion des betroffenen Allels detektierbar war, scheint die partielle Duplikation bereits die Transkription zu stören bzw. das Transkript zu destabilisieren. Vermutlich unterliegt das betroffene allelische *TRPS1*-Transkript dem Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD, Frischmeyer und Dietz 1999). Wie schon bei der Patientin mit TRPS Typ II, reicht auch bei dieser Patientin die Reduktion der Transkription eines Allels für die Ausprägung der Krankheit aus. In Einklang mit den Befunden, dass auch Mosaikdeletionen von *TRPS1* hinreichend für die Ausprägung eines TRPS sind (Shanske *et al.* 2008, Lüdecke unveröffentlicht), führt auch die partielle Duplikation bereits als somatisches Mosaik zur Ausprägung eines TRPS-Phänotyps beim Vater der o.g. Patientin. Zusammenfassend sind die Prozesse, die durch den Transkriptionsfaktor TRPS1 reguliert werden, extrem sensitiv gegenüber Gendosisveränderungen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, die Wirkung des Transkriptionsfaktors TRPS1 besser zu verstehen und in Komplexe und Signalwege einzuordnen, um die Pathogenese der assoziierten Erkrankung aufzuklären.

Im ersten Teil sollten direkte Zielgene von TRPS1 identifiziert und verifiziert werden, um Einsicht in die zelluläre Funktion dieses einzigartigen Transkriptionsfaktors zu bekommen. Hierzu sollte zum einen die Methode der ChIP-Seq unter Verwendung von chondrogen differenzierten ATDC5-Zellen dienen. Vorab wurde die *Trps1*-Expression in diesem System auf Proteinebene untersucht. Da der *Trps1*-Level acht Tage nach Induktion zum chondrogenen Wachstum maximal ist, wurden eben solche Zellen als Ausgangsmaterial für die Chromatinimmunpräzipitation verwendet. Leider konnte die erhoffte Anreicherung von Zielgenpromotoren mittels PCR-basierter Kontrollen nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der unklaren Ausbeute der ChIP, wurde von der anschließenden Hochdurchsatzsequenzierung abgesehen. Da die Umstellung der Strategie und die damit verbundenen Vorarbeiten sehr zeitaufwändig sind, dauert dieser Projektteil zurzeit noch an. Zum anderen sollte mittels funktioneller Assays eine TRPS1-abhängige Regulation verschiedener Promotoren gezeigt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass diese offenbar ein spezialisiertes Zellsystem mit einem spezifischen Set an Cofaktoren bedarf. Nur in primären Chondrozyten der Maus konnte die Regulation des *STAT3*-Promotors durch TRPS1 verifiziert werden.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Regulation des *TRPS1*-Gens untersucht werden. Mithilfe von Patienten mit einem TRPS und ungeklärter Pathogenese, konnten bislang unbekannte 5'-UTR Exons von *TRPS1* identifiziert und mehrere daraus entstehende alternative Transkripte nachgewiesen werden. Ferner konnte per 5'-RACE ein alternativer Transkriptionsstart gefunden werden. Ein 1,7 kb großes Fragment aus der stromaufwärts dieses alternativen Transkriptionsstarts liegenden Region, hat Promotoraktivität in NIH/3T3-Zellen. Dieser alternative *TRPS1*-Promotor beinhaltet eine putative Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Gli3, der von immenser Bedeutung für das Knochenwachstum und die Skelettentwicklung ist. In Kooperation mit dem ZMB Essen wurden vergleichende Analysen der wildtypischen und in der Gli3-Bindestelle mutierten Promotorregion durchgeführt. Durch diese Experimente konnte nachgewiesen werden, dass der alternative *TRPS1*-Promotor in

primären Chondrozyten der Maus über diese Bindestelle stillgelegt wird. Sollte sich durch weitere Experimente bestätigen, dass dies tatsächlich über die Bindung von Gli3 passiert, so wäre der erste Faktor identifiziert, der *TRPS1* direkt reguliert. Auch wenn sich dies nicht bestätigen sollte, wird die weitere Charakterisierung des Promotorkonstruktes möglicherweise dabei helfen, solche Faktoren zu bestimmen und *TRPS1* in die entsprechenden Signalwege einzuordnen. Dies wiederum wird dabei helfen, die molekularen Ursachen der Entstehung der Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrome aufzuklären und das phänotypische Spektrum der *TRPS* zu erweitern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue genetische Aberrationen identifiziert, die zur Ausprägung eines *TRPS*-Phänotyps führen. Erstere war eine Deletion von stromaufwärts des *TRPS1*-Gens gelegenen Elementen, die die Expression dieses Gens beeinflusst. Zweitere war eine partielle Duplikation, die den ORF zerreißt und die allelische Transkriptmenge reduziert. In beiden Fällen war schon die Reduktion der Transkriptmenge eines *TRPS1*-Allels hinreichend für die Ausprägung eines *TRPS*. Demnach scheint schon eine geringe Dosisveränderung kritisch zu sein. Dies weist darauf hin, dass eine strenge Regulation der *TRPS1*-regulierten Gene notwendig ist und unterstreicht somit die Wichtigkeit dieses Transkriptionsfaktors für eine normale Entwicklung.

## 6. Literatur

- Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgard R (2004) Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene* 330:101-114
- Ahn J, Ludecke HJ, Lindow S, Horton WA, Lee B, Wagner MJ, Horsthemke B, Wells DE (1995) Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet* 11:137-143
- Alaminos M, Davalos V, Ropero S, Setien F, Paz MF, Herranz M, Fraga MF, Mora J, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M (2005) EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res* 65:2565-2571
- Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y (1999) Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 23:354-358
- Arikawa-Hirasawa E, Wilcox WR, Le AH, Silverman N, Govindraj P, Hassell JR, Yamada Y (2001) Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene. *Nat Genet* 27:431-434
- Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y (1990) A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ Dev* 30:109-116
- Bernardini L, Palka C, Ceccarini C, Capalbo A, Bottillo I, Mingarelli R, Novelli A, Dallapiccola B (2008) Complex rearrangement of chromosomes 7q21.13-q22.1 confirms the ectrodactyly-deafness locus and suggests new candidate genes. *Am J Med Genet A* 146A:238-244
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85-89
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brega P (2005) Identification of downstream genes of the TRPS1 transcription factor. Inaugural-Dissertation, Universität Duisburg-Essen, Essen

- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (1998) osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260-1268
- Buiting K, Barnicoat A, Lich C, Pembrey M, Malcolm S, Horsthemke B (2001) Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* 68:1290-1294
- Chang GT, Jhamai M, van Weerden WM, Jenster G, Brinkmann AO (2004) The TRPS1 transcription factor: androgenic regulation in prostate cancer and high expression in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 11:815-822
- Chang GT, van den Bemd GJ, Jhamai M, Brinkmann AO (2002) Structure and function of GC79/TRPS1, a novel androgen-repressible apoptosis gene. *Apoptosis* 7:13-21
- Chen FH, Herndon ME, Patel N, Hecht JT, Tuan RS, Lawler J (2007) Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan. *J Biol Chem* 282:24591-24598
- Chen L, Fink T, Zhang XY, Ebbesen P, Zachar V (2005) Quantitative transcriptional profiling of ATDC5 mouse progenitor cells during chondrogenesis. *Differentiation* 73:350-363
- Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S (1999) Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem* 274:8143-8152
- de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K (2001) Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13:721-727
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-452
- Durrant I (1990) Light-based detection of biomolecules. *Nature* 346:297-298
- Floris C, Rassu S, Boccone L, Gasperini D, Cao A, Crisponi L (2008) Two patients with balanced translocations and autistic disorder: CSMD3 as a candidate gene for autism found in their common 8q23 breakpoint area. *Eur J Hum Genet* 16:696-704
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, *et al.* (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525-530
- Frischmeyer PA, Dietz HC (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8:1893-1900

- Frohman MA (1993) Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol* 218:340-356
- Fryns JP, Van den Berghe H (1986) 8q24.12 Interstitial deletion in trichorhinophalangeal syndrome type I. *Hum Genet* 74:188-189
- Gack S, Vallon R, Schmidt J, Grigoriadis A, Tuckermann J, Schenkel J, Weiher H, Wagner EF, Angel P (1995) Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth Differ* 6:759-767
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196:261-282
- Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G (1995) A PEBP2 alpha/AML-1-related factor increases osteocalcin promoter activity through its binding to an osteoblast-specific cis-acting element. *J Biol Chem* 270:30973-30979
- Giedion A (1966) Tricho-rhino-phalangeal syndrome. *Helv Paediatr Acta* 21:475-485
- Gomez-del Arco P, Koipally J, Georgopoulos K (2005) Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol* 25:2688-2697
- Graybeal LS, Baum VC, Durieux ME (2005) Anaesthetic management of a patient with tricho-rhino-phalangeal syndrome. *Eur J Anaesthesiol* 22:400-402
- Gunther T, Poli C, Muller JM, Catala-Lehnen P, Schinke T, Yin N, Vomstein S, Amling M, Schule R (2005) Fhl2 deficiency results in osteopenia due to decreased activity of osteoblasts. *Embo J* 24:3049-3056
- Hager GL, Elbi C, Johnson TA, Voss T, Nagaich AK, Schiltz RL, Qiu Y, John S (2006) Chromatin dynamics and the evolution of alternate promoter states. *Chromosome Res* 14:107-116
- Hall BD, Langer LO, Giedion A, Smith DW, Cohen MM, Jr., Beals RK, Brandner M (1974) Langer-Giedion syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser* 10:147-164
- Hassell J, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E (2002) Role of perlecan in skeletal development and diseases. *Glycoconj J* 19:263-267
- He J, Shao G, Zhou R (2003) Effects of the novel gene, LAPTM4B, highly expression in hepatocellular carcinoma on cell proliferation and tumorigenesis of NIH3T3 cells. *Beijing Da Xue Xue Bao* 35:348-352
- Hilton MJ, Sawyer JM, Gutierrez L, Hogart A, Kung TC, Wells DE (2002) Analysis of novel and recurrent mutations responsible for the tricho-rhino-phalangeal syndromes. *J Hum Genet* 47:103-106
- Horton WE, Jr., Feng L, Adams C (1998) Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biol* 17:107-115



- Hou J, Parrish J, Ludecke HJ, Sapru M, Wang Y, Chen W, Hill A, Siegel-Bartelt J, Northrup H, Elder FF, *et al.* (1995) A 4-megabase YAC contig that spans the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8q24.1: use in refining the location of the trichorhinophalangeal syndrome and multiple exostoses genes (TRPS1 and EXT1). *Genomics* 29:87-97
- Iozzo RV, Pillarisetti J, Sharma B, Murdoch AD, Danielson KG, Uitto J, Mauviel A (1997) Structural and functional characterization of the human perlecan gene promoter. Transcriptional activation by transforming growth factor-beta via a nuclear factor 1-binding element. *J Biol Chem* 272:5219-5228
- Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, Vuorio E, Heino J, Kahari VM (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 208:387-397
- Kaidonis X, Liaw WC, Roberts AD, Ly M, Anson D, Byers S (2010) Gene silencing of EXTL2 and EXTL3 as a substrate deprivation therapy for heparan sulphate storing mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet* 18:194-199
- Kaiser FJ (2003) Identifizierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors TRPS1. Inaugural-Dissertation, Universität Duisburg Essen, Essen
- Kaiser FJ, Brega P, Raff ML, Byers PH, Gallati S, Kay TT, de Almeida S, Horsthemke B, Ludecke HJ (2004) Novel missense mutations in the TRPS1 transcription factor define the nuclear localization signal. *Eur J Hum Genet* 12:121-126
- Kaiser FJ, Ludecke HJ, Weger S (2007) SUMOylation modulates transcriptional repression by TRPS1. *Biol Chem* 388:381-390
- Kaiser FJ, Moroy T, Chang GT, Horsthemke B, Ludecke HJ (2003b) The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor. *J Biol Chem* 278:38780-38785
- Kaiser FJ, Tavassoli K, Van den Bemd GJ, Chang GT, Horsthemke B, Moroy T, Ludecke HJ (2003a) Nuclear interaction of the dynein light chain LC8a with the TRPS1 transcription factor suppresses the transcriptional repression activity of TRPS1. *Hum Mol Genet* 12:1349-1358
- Kang S, Graham JM, Jr., Olney AH, Biesecker LG (1997) GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet* 15:266-268
- Kathrein KL, Chari S, Winandy S (2008) Ikaros directly represses the notch target gene Hes1 in a leukemia T cell line: implications for CD4 regulation. *J Biol Chem* 283:10476-10484
- Keys JR, Tallack MR, Zhan Y, Papathanasiou P, Goodnow CC, Gaensler KM, Crossley M, Dekker J, Perkins AC (2008) A mechanism for Ikaros regulation of human globin gene switching. *Br J Haematol* 141:398-406

- Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E, Winandy S, Viel A, Sawyer A, Ikeda T, Kingston R, Georgopoulos K (1999) Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 10:345-355
- Kitagawa H, Shimakawa H, Sugahara K (1999) The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *J Biol Chem* 274:13933-13937
- Klatt AR, Paulsson M, Wagener R (2002) Expression of matrilins during maturation of mouse skeletal tissues. *Matrix Biol* 21:289-296
- Klingmüller G (1956) Peculiar constitutional anomalies in 2 sisters and their relations to recent findings in evolutionary pathology. *Hautarzt* 7:105-113
- Koipally J, Georgopoulos K (2000) Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J Biol Chem* 275:19594-19602
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764
- Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A (2004) Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev Cell* 6:801-813
- Kronenberg HM (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423:332-336
- Kunath M, Ludecke HJ, Vortkamp A (2002) Expression of Trps1 during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns* 2:119-122
- Lachman RS, Krakow D, Cohn DH, Rimo DL (2005) MED, COMP, multilayered and NEIN: an overview of multiple epiphyseal dysplasia. *Pediatr Radiol* 35:116-123
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Juppner H, Segre GV, Kronenberg HM (1996) PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273:663-666

- Laricchia-Robbio L, Fazzina R, Li D, Rinaldi CR, Sinha KK, Chakraborty S, Nucifora G (2006) Point mutations in two EVI1 Zn fingers abolish EVI1-GATA1 interaction and allow erythroid differentiation of murine bone marrow cells. *Mol Cell Biol* 26:7658-7666
- Latchman DS (1990) Eukaryotic transcription factors. *Biochem J* 270:281-289
- Lee HM, Zhang H, Schulz V, Tuck DP, Forget BG (2010) Downstream targets of HOXB4 in a cell line model of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 116:720-730
- Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz i Altaba A (1997) Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124:2537-2552
- Lüdecke H, Horsthemke B (2008) TRPS1 and the Tricho-Rhino-Phalangeal Syndromes. In: *Inborn Errors of Development*. Charles J. Epstein, Robert P. Erickson and Anthony Wynshaw-Boris, pp 1664
- Lüdecke HJ, Johnson C, Wagner MJ, Wells DE, Turleau C, Tommerup N, Latos-Bielenska A, Sandig KR, Meinecke P, Zabel B, *et al.* (1991) Molecular definition of the shortest region of deletion overlap in the Langer-Giedion syndrome. *Am J Hum Genet* 49:1197-1206
- Lüdecke HJ, Schaper J, Meinecke P, Momeni P, Gross S, von Holtum D, Hirche H, *et al.* (2001) Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *Am J Hum Genet* 68:81-91
- Maeda K, Horikoshi T, Nakashima E, Miyamoto Y, Mabuchi A, Ikegawa S (2005) MATN and LAPTMs are parts of larger transcription units produced by intergenic splicing: intergenic splicing may be a common phenomenon. *DNA Res* 12:365-372
- Malik TH, Shoichet SA, Latham P, Kroll TG, Peters LL, Shivdasani RA (2001) Transcriptional repression and developmental functions of the atypical vertebrate GATA protein TRPS1. *Embo J* 20:1715-1725
- Malik TH, Von Stechow D, Bronson RT, Shivdasani RA (2002) Deletion of the GATA domain of TRPS1 causes an absence of facial hair and provides new insights into the bone disorder in inherited tricho-rhino-phalangeal syndromes. *Mol Cell Biol* 22:8592-8600
- Mann HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R (2004) Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias. *J Biol Chem* 279:25294-25298
- Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A, Tabin CJ (1996) Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol* 180:273-283

- McCarty AS, Kleiger G, Eisenberg D, Smale ST (2003) Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Mol Cell* 11:459-470
- Merriman HL, van Wijnen AJ, Hiebert S, Bidwell JP, Fey E, Lian J, Stein J, Stein GS (1995) The tissue-specific nuclear matrix protein, NMP-2, is a member of the AML/CBF/PEBP2/runt domain transcription factor family: interactions with the osteocalcin gene promoter. *Biochemistry* 34:13125-13132
- Momeni P (2001) Identifizierung und Charakterisierung des menschlichen TRPS1-Gens. Inaugural-Dissertation, Universität Duisburg-Essen, Essen
- Momeni P, Glockner G, Schmidt O, von Holtum D, Albrecht B, Gillissen-Kaesbach G, Hennekam R, Meinecke P, Zabel B, Rosenthal A, Horsthemke B, Ludecke HJ (2000) Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nat Genet* 24:71-74
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (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, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89:773-779
- Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Bailey DK, Kennedy GC, Ogawa S (2005) A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* 65:6071-6079
- Napierala D, Garcia-Rojas X, Sam K, Wakui K, Chen C, Mendoza-Londono R, Zhou G, Zheng Q, Lee B (2005) Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcriptional regulator of bone formation. *Mol Genet Metab* 86:257-268
- Napierala D, Sam K, Morello R, Zheng Q, Munivez E, Shivdasani RA, Lee B (2008) Uncoupling of chondrocyte differentiation and perichondrial mineralization underlies the skeletal dysplasia in tricho-rhino-phalangeal syndrome. *Hum Mol Genet* 17:2244-2254
- Nardmann J, Tranebjaerg L, Horsthemke B, Ludecke HJ (1997) The tricho-rhino-phalangeal syndromes: frequency and parental origin of 8q deletions. *Hum Genet* 99:638-643
- Nicole S, Davoine CS, Topaloglu H, Cattolico L, Barral D, Beighton P, Hamida CB, Hammouda H, Cruaud C, White PS, Samson D, Urtizberea JA, Lehmann-Horn F, Weissenbach J, Hentati F, Fontaine B (2000) Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet* 26:480-483
- Niikawa N, Kamei T (1986) The Sugio-Kajii syndrome, proposed tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. *Am J Med Genet* 24:759-760

- Nishioka K, Itoh S, Suemoto H, Kanno S, Gai Z, Kawakatsu M, Tanishima H, Morimoto Y, Hatamura I, Yoshida M, Muragaki Y (2008) Trps1 deficiency enlarges the proliferative zone of growth plate cartilage by upregulation of Pthrp. *Bone* 43:64-71
- Ohara O, Dorit RL, Gilbert W (1989) One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5673-5677
- Osawa A, Kato M, Matsumoto E, Iwase K, Sugimoto T, Matsui T, Ishikura H, Sugano S, Kurosawa H, Takiguchi M, Seki N (2006) Activation of genes for growth factor and cytokine pathways late in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Genomics* 88:52-64
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765-771
- Perrimon N, Hacker U (2004) Wingless, hedgehog and heparan sulfate proteoglycans. *Development* 131:2509-2511; author reply 2511-2503
- Piscopo DM, Johansen EB, Derynck R (2009) Identification of the GATA factor TRPS1 as a repressor of the osteocalcin promoter. *J Biol Chem* 284:31690-31703
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Radvanyi L, Singh-Sandhu D, Gallichan S, Lovitt C, Pedyczak A, Mallo G, Gish K, Kwok K, Hanna W, Zubovits J, Armes J, Venter D, Hakimi J, Shortreed J, Donovan M, Parrington M, Dunn P, Oomen R, Tartaglia J, Berinstein NL (2005) The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11005-11010
- Robert SC, Cooper JP (2007) A patient with tricho-rhino-phalangeal syndrome and mitral valve disease. *Int J Cardiol* 114:e129-130
- Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D (1998) Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem* 273:20397-20403
- Roth MB, Zahler AM, JA S (1991) A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J Cell Biol* 115:587-596
- Ruiz i Altaba A (1999) Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 126:3205-3216

- Salinovich O, Montelaro RC (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156:341-347
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Sasaki T, Tonoki H, Soejima H, Niikawa N (1997) A 4 Mb cryptic deletion associated with inv(8)(q13.1q24.11) in a patient with trichorhinophalangeal syndrome type I. *J Med Genet* 34:335-339
- Sauer F, Jackle H (1993) Dimerization and the control of transcription by Kruppel. *Nature* 364:454-457
- Schneppenheim R, Budde U, Dahlmann N, Rautenberg P (1991) Luminography--a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis. *Electrophoresis* 12:367-372
- Senyuk V, Sinha KK, Li D, Rinaldi CR, Yanamandra S, Nucifora G (2007) Repression of RUNX1 activity by EVI1: a new role of EVI1 in leukemogenesis. *Cancer Res* 67:5658-5666
- Shanske AL, Patel A, Saukam S, Levy B, Ludecke HJ (2008) Clinical and molecular characterization of a patient with Langer-Giedion syndrome and mosaic del(8)(q22.3q24.13). *Am J Med Genet A* 146A:3211-3216
- Shapiro MB, Senapathy P (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 15:7155-7174
- Shinomura T, Ito K, Kimura JH, Hook M (2006) Screening for genes preferentially expressed in the early phase of chondrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 341:167-174
- Shukunami C, Shigeno C, Atsumi T, Ishizeki K, Suzuki F, Hiraki Y (1996) Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J Cell Biol* 133:457-468
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445:881-885

- Sobotta W (2006) Lehrbuch Histologie. Vol 2. Auflage. Urban & Fischer Bei Elsevier
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13:2072-2086
- Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S (2002) Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 245:95-108
- Suemoto H, Muragaki Y, Nishioka K, Sato M, Ooshima A, Itoh S, Hatamura I, Ozaki M, Braun A, Gustafsson E, Fassler R (2007) Trps1 regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling. *Dev Biol* 312:572-581
- Sun L, Liu A, Georgopoulos K (1996) Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo J* 15:5358-5369
- Tanaka T, Nishida J, Mitani K, Ogawa S, Yazaki Y, Hirai H (1994) Evi-1 raises AP-1 activity and stimulates c-fos promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain. *J Biol Chem* 269:24020-24026
- Turner DL, Weintraub H (1994) Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* 8:1434-1447
- Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH (1991) GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352:539-540
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273:613-622
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, *et al.* (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120
- Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S (2002) Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 347:175-184
- Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, Paulsson M, Bateman JF, Heinegard D, Morgelin M (2003) Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J Biol Chem* 278:37698-37704
- Wülling M, Kaiser FJ, Buelens LA, Braunholz D, Shivdasani RA, Depping R, Vortkamp A (2009) Trps1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of Gli3. *Dev Biol* 328:40-53
- Wülling M, Vortkamp A (2010) Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol* 25:625-631

- Wuyts W, Roland D, Ludecke HJ, Wauters J, Foulon M, Van Hul W, Van Maldergem L (2002) Multiple exostoses, mental retardation, hypertrichosis, and brain abnormalities in a boy with a de novo 8q24 submicroscopic interstitial deletion. *Am J Med Genet* 113:326-332
- Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T (2004) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18:952-963
- Zhou W, Jiang Z, Li X, Xu F, Liu Y, Wen P, Kong L, Hou M, Yu J (2009) EMP3 overexpression in primary breast carcinomas is not associated with epigenetic aberrations. *J Korean Med Sci* 24:97-103
- Zou H, Wieser R, Massague J, Niswander L (1997) Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* 11:2191-2203



## 7. Anhang

**Tab. 2: Oligonukleotide für die Sequenzierung von Plasmiden**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
T7	5'-AATACGACATCACTATAG-3'	46°C
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'	48°C
RVprimer3min2	5'-TAGCAAAATAGGCTGTCC-3'	50°C
Luc2Seq	5'-CCGTCTTCGAGTGGGTAGAA-3'	50°C

**Tab. 3: Oligonukleotide für den Integritätstest von RNA-Proben**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
β-AktinF	5'-TTGCTATCCAGGCTGTGCTA-3'	56°C
β-AktinR	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	56°C

**Tab. 4: Oligonukleotide für die PCR-basierten Anreicherungstests nach Chromatin-immunpräzipitation**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
GapdhP_f2	5'-TGAGAGAGGCCAGCTACTC-3'	58°C
GapdhP_r2	5'-AGGGCTGCAGTCCGTATTTA-3'	58°C
STAT3_P1_f	5'-CTGTACTIONCCCAACATACAAGACGTG-3'	55°C
STAT3_P1_r	5'-GCTAACACACACAGAGAGAAAGCCC-3'	55°C
STAT3_P2_f	5'-AGACCCAGAGTGGAGTTACAAATG-3'	55°C
STAT3_P2_r	5'-CTGACACGAATACACAGTACTTGGC-3'	55°C
ChIP_mouseosteocalcin_for	5'-AGTCTCCGATTGTGGCCTCT-3'	58°C
ChIP_mouseosteocalcin_rev	5'-CTAATTGGGGGTCATGTGCT-3'	58°C
LB159	5'-TCGCAAAGGGCGTCTC-3'	48°C
LB160	5'-AGAGAGACCACCCAGGTAG-3'	48°C
Hspg2_M1_f	5'-ACATGGAGTGGATGTGAGCA-3'	52 °C
Hspg2_M1_r	5'-CGACTGTGCCTTTGTCTGG-3'	52 °C
Hspg2_M2_f	5'-GCTCCTCCAGAGAGCCTAGC-3'	52 °C
Hspg2_M2_r	5'-CCACCTCCAAACATTTAGCC-3'	52 °C

**Tab. 5: Oligonukleotide für die Klonierung potentieller *TRPS1*-Zielgenpromotoren**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
EMP3-f3	5'-CCTTCTCACCCTCCCTCTG-3'	58°C
EMP3_rev	5'-GCTGGAGTCGGAGTCTTGTC-3'	58°C
EXTL2_for	5'-TGGCATTAAGCAAACAGTGC-3'	56°C
EXTL2_rev	5'-AGTAGGGCCAGCCGATTTAT-3'	56°C
LAPTM4B_for	5'-TTATAGGCATGCACCACCAC-3'	59°C
LAPTM4B_forS	5'-AGCGAGGATGTCCTTGACAC-3'	56°C
LAPTM4B_rev	5'-CAAGCACCCGGTGAGTAAAT-3'	56°C + 59°C
MATN4(70)_for	5'-AAAGTATGGGAGGTGGCAGA-3'	56°C
MATN4(70)_rev	5'-AGAAAAGCAACAGTATTTACAGTGC-3'	56°C
PTHLH(61)_for	5'-TCGAGGTTCAAAGGTTGACA-3'	59°C
PTHLH(61)_rev	5'-AACC GGCTACTCCA ACTGTG-3'	59°C
STAT3_for	5'-AAACAGAGGCCAGCTCTTGA-3'	56°C
STAT3_rev	5'-CTGTTTCTCCGGCAGAGG-3'	56°C
human_osteocalcin_for	5'-GCCAGAGGCAGTGTCAAGA-3'	57°C
human_osteocalcin_rev	5'-GGCTGCTGCTCAGGACTC-3'	57°C

**Tab. 6: Oligonukleotide für die Bruchpunktkartierung**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
mapping_for1	5'-CTGAGGAAGGAGGATTCGTG-3'	55°C
mapping_for2	5'-CACAAATTT CAGGACATCCACT-3'	55°C
mapping_for3	5'-TAGTGTGCAAACCCCTGAGA-3'	55°C
mapping_for4	5'-CAGGAGGTTGGGAACACATT-3'	55°C + 57°C
mapping_for5	5'-CCCCCAAAGCTTAAACTCA-3'	55°C
mapping_for6	5'-TTCATCAGCCTGGGTCATCT-3'	55°C
mapping_for7	5'-TCAGGAGACAGGTTTGTTC-3'	55°C
mapping_for8	5'-GGGATTTAAACCCGTTGCTT-3'	55°C
mapping_rev1	5'-AAAGCATTGGAGCCATCAAC-3'	55°C
mapping_rev2	5'-CTCACCCAGCCAACGAATA-3'	55°C
mapping_rev3	5'-CCTGCGTGACAGAGTGAGAC-3'	55°C
mapping_rev4	5'-GCCCATATTGGGGAAAATC-3'	55°C
mapping_rev5	5'-TCTGGTGTCTGCATAGAGC-3'	55°C + 57°C
mapping_rev6	5'-TGCAACCTTCAAGGATTCT-3'	55°C + 57°C
mapping_Seq_forA	5'-AATGAAATTTGTTATTGTGTTGGA-3'	55°C
mapping_Seq_forB	5'-GGCCATGATTTACCCTTTGA-3'	55°C
mapping_Seq_revA	5'-TTCATCCCTGCCAAGAGAGT-3'	55°C
mapping_Seq_revB	5'-CCCCTGGATTCAAAAGTCAA-3'	55°C
mapping_Seq_revC	5'-CATGGGCCAGATCTTACGTT-3'	55°C

**Tab. 7: Oligonukleotide für die quantitative Analyse der allelischen Transkription**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
rs800899_forw	5'-TTGGCTAATATGTACTGGGGAAA-3'	58°C
rs800899_rev	5'-TGAAACATGGCCAATGAGAG-3'	58°C
SnaPshot800899_f2	5'-TACATATTATACTAAAGCAGTACTGGAC-3'	50°C

**Tab. 8: Oligonukleotide für die RT-PCR bzgl. alternativer *TRPS1*-Transkripte**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
TRPS1_-140kb_for	5'-CTGGAGTTTTTCATGGCGTTT-3'	54°C
TRPS1_Exon3_rev	5'-TTTGTTCTTTCCAGATACCTTGC-3'	54°C
TRPS1_5'RACE_SP 1	5'-TGGGGTTTTCAAATCTTTCC-3'	60-58°C
TRPS1_5'RACE_SP 2	5'-AAACGCCATGAAACTCCAG-3'	60-58°C
TRPS1_5'RACE_SP3a	5'-TGAAAACTCCAGTGTATTTTTCTCTTAC-3'	56°C
TRPS1_5'RACE_SP3b	5'-TGAAAACTCCAGTGTATGTTTCTCTTAC-3'	56°C

**Tab. 9: Oligonukleotide für die Klonierung der *TRPS1*-Promotorkonstrukte**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
TRPS1upstream promoter_for2	5'-TGGCTTGTCTCTGCCTATAAAA-3'	59°C
TRPS1_5'RACE_2_SP3	5'-GCATGCCATGTACTAGAAAAGC-3'	59°C
TRPS1upstream promoter_Seq1	5'-TGCCAAAGACATGATGTTGC-3'	55°C
TRPS1normal promoterFOR	5'-TTTTGGAGGCTAGCACTTCATCTTCGGCTCT-3' <i>NheI</i>	56°C
mutabl.-nor2b57/3b57_rev	5'-CCTCCCCCACCCTTATATAA-3'	56°C
TRPS1normalpromoter_Seq1	5'-AGCACCCATTGAGTTTCTGG-3'	55°C
mutabl.-norRV_for	5'-GGTAATGTTTTATGCATTGTTGATCT-3'	55°C
mutabl.-norRV_rev	5'-CCAATTAACGACGCAGGAT-3'	55°C
TRPS1normalpromoter_Seq2_b	5'-ACGTTACAGACGGGAGGT-3'	55°C
mutabl.-nor2b57/3b57_for	5'-TTTTGGTGCTGCTGGTTTCT-3'	55°C

**Tab. 10: Oligonukleotide für die *in vitro*-Mutagenese**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
Exon6B	5'-CCGTAACAGGGACTGGGATTC-3'	55°C
3Exon6A	5'-Phosphat-ACTCCAGGCCTTTAAACATC-3'	55°C
TRPS1up_Gli3bs mutagenesis_rev	5'-CTGGTGGAGTCCACCTACCCACAAACTGTC-3'	60°C
TRPS1up_Gli3bs mutagenesis_for	5'-GACAGTTTGTGGGTAGGTGGACTCCACCAG-3'	60°C

**Tab. 11: Oligonukleotide für die quantitative PCR**

Bezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
TRPS1qPCR5	5'-TGTGAGCCCTTGAAGTCTCC-3'	60°C
TRPS1qPCR6	5'-GTGCAGGCCATATCTTGAGG-3'	60°C
UPL34	5'-AGAGGCAG-3'	---

Tab. 12: Im Rahmen dieser Arbeit generierte und genutzte Plasmide

Bezeichnung	Definition
pGL3basic-HSPG2	ca. 2,7 kb <i>KpnI/XhoI</i> -Subklonierungsfragment des <i>HSPG2</i> -Promotorbereichs in pGL3basic [ <i>luc+</i> ] (zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Kaiser, Humangenetik UK Lübeck; vgl. Iozzo <i>et al.</i> 1997)
pGL3basic-HSPG2-fl	pGL3basic-HSPG2, ca. 150 bp <i>NcoI</i> -Fragment deletiert (vgl. Iozzo <i>et al.</i> 1997)
pGL3basic-HSPG2-core	pGL3basic-HSPG2-fl, ca. 2,1 kb <i>Ecl136II/PvuII</i> -Fragment deletiert (vgl. Iozzo <i>et al.</i> 1997)
pGL4.10-HSPG2-fl	ca. 2,6 kb <i>KpnI/NcoI</i> -Fragment aus pGL3basic-HSPG2-fl in <i>KpnI/EcoRV</i> -restringiertem pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pGL4.10-HSPG2-core	ca. 500 bp <i>KpnI/NcoI</i> -Fragment aus pGL3basic-HSPG2-core in <i>KpnI/EcoRV</i> -restringiertem pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCRII-TOPO-EMP3	1980 bp PCR-Produkt aus <i>EMP3</i> -Promotorbereich in pCRII-TOPO
pGL4.10-EMP3	ca. 2 kb <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO-EMP3 in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCRII-TOPO-EXTL2	2092 bp PCR-Produkt aus <i>EXTL2</i> -Promotorbereich in pCRII-TOPO
pGL4.10-EXTL2	ca. 2,1 kb <i>BamHI/XhoI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO-EXTL2 in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCRII-TOPO-LAPTM4B	2026 bp PCR-Produkt aus <i>LAPTM4B</i> -Promotorbereich in pCRII-TOPO
pGL4.10-LAPTM4B	ca. 2,1 kb <i>HindIII/XbaI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO-LAPTM4B in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCRII-TOPO-LAPTM4B-s	674 bp PCR-Produkt aus <i>LAPTM4B</i> -Promotorbereich in pCRII-TOPO
pGL4.10-LAPTM4B-s	ca. 700 bp <i>HindIII/XbaI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO-LAPTM4B-s in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCRII-TOPO-MATN4(70)	1927 bp PCR-Produkt aus einem der <i>MATN4</i> -Promotorbereiche in pCRII-TOPO
pGL4.10-MATN4(70)	ca. 2 kb <i>BamHI/XhoI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO-MATN4(70) in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCRII-TOPO-PTHLH(61)	2250 bp PCR-Produkt aus einem der <i>PTHLH</i> -Promotorbereiche in pCRII-TOPO
pGL4.10-PTHLH(61)	ca. 2,3 kb <i>KpnI/XhoI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO-PTHLH(61) in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCRII-TOPO-STAT3	2159 bp PCR-Produkt aus <i>STAT3</i> -Promotorbereich in pCRII-TOPO
pGL4.10-STAT3	ca. 2,2 kb <i>HindIII/XbaI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO-STAT3 in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCRII-TOPO-humanosteocalcin	280 bp PCR-Produkt aus <i>BGLAP</i> -Promotorbereich in pCRII-TOPO
pGL4.10-humanosteocalcin	ca. 300 bp <i>KpnI/XhoI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO-humanosteocalcin in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pcDNA-TRPS1	vollständige cDNA der codierenden Region von <i>TRPS1</i> in pcDNA4 (Kaiser 2003)
pcDNA-TRPS1 deltaExon6	pcDNA-TRPS1, Exon 6 des <i>TRPS1</i> -ORF in frame deletiert
pCRII-TOPO-TRPS1upstream promoterH1	1728 bp PCR-Produkt aus alternativem <i>TRPS1</i> -Promotorbereich in pCRII-TOPO
pGL4.10-TRPS1upstream promoterH1	ca. 1,8 kb <i>SacI/XhoI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO <i>TRPS1</i> upstreampromoterH1 in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCRII-TOPO-TRPS1normal promoterH1	1510 bp PCR-Produkt aus unmittelbarem <i>TRPS1</i> -Promotorbereich in pCRII-TOPO
pGL4.10-TRPS1normal promoterH1	ca. 1,5 kb <i>BamHI/NheI</i> -Fragment aus pCRII-TOPO- <i>TRPS1</i> upstreampromoterH1 in pGL4.10 [ <i>luc2</i> ]
pCS-MT-Gli3A	vollständige cDNA der codierenden Region des humanen <i>GLI3</i> in pCS-MT (Lee <i>et al.</i> 1997, zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Wülling, ZMB Essen)

**Tab. 13: Chromosomale Lokalisation klonierter potentieller Promotorregionen im menschlichen Genom (NCBI36/hg18)**

Bezeichnung	Lokalisation	Größe
HSPG2-fl	>chr1:22136294-22138925	2631 bp
HSPG2-core	>chr1:22136294-22136840	547 bp
EMP3	>chr19:53518677+53520656	1980 bp
EXTL2	>chr1:101132796-101134887	2092 bp
LAPTM4B	>chr8:98855087+98857112	2026 bp
LAPTM4B-s	>chr8:98856439+98857112	674 bp
MATN4(70)	>chr20:43367691-43369617	1927 bp
PTHLH(61)	>chr12:28013890-28016139	2250 bp
STAT3	>chr17:37793823-37795981	2159 bp
human_osteocalcin	>chr1:154478346+154478625	280 bp
TRPS1upstreampromoter	>chr8:116891271-116892998	1728 bp
TRPS1normalpromoter	>chr8:116750097-116751606	1510 bp

**Tab. 14: Chromosomale Lokalisation der Promotorregionen, die auf Anreicherung mittels TRPS1-ChIP getestet wurden, im murinen Genom (NCBI36/mm8)**

Bezeichnung	Lokalisation	Größe
Gapdh_2	>chr6:125131232-125131385	154 bp
Stat3_P1	>chr11:100756684-100756932	249 bp
Stat3_P2	>chr11:100756303-100756555	253 bp
Bglap	>chr3:88464711-88464821	111 bp
Ptch1	>chr13:63575652-63575831	180 bp
Hspg2_M1	>chr4:136740348+136740577	230 bp
Hspg2_M2	>chr4:136740586+136740741	156 bp

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Herrn Prof. Bernhard Horsthemke möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken die vorliegende Arbeit an seinem Institut anzufertigen. Des Weiteren bedanke ich mich für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, seine stets offene Tür und seine wertvollen Ideen und Anregungen zum Verlauf der Arbeit.

Bei Herrn Dr. Hermann-Josef Lüdecke bedanke ich mich für die Projektleitung, die spannende Aufgabenstellung, die wissenschaftlichen Diskussionen und seine geduldige und engagierte Unterstützung.

Bei Frau Prof. Andrea Vorkamp, Frau Dr. Manuela Wüling, Frau Verena Schneider und dem Rest des ZMB-Teams bedanke ich mich für die unkomplizierte und gute Kooperation.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die nette Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Außerdem bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und die zahlreichen Ideen und Hilfestellungen.

Ein ausdrücklicher Dank geht an Frau Dr. Karin Buiting für ihr Interesse am Fortgang des Projektes, für ihre große Hilfsbereitschaft und guten Ratschläge.

Frau Regina Kubica und Frau Melanie Heitmann danke ich für ihre hervorragende technische Unterstützung und helfenden Hände. Außerdem danke ich Frau Stephanie Groß für das, auch schon vor der Akkreditierung bestehende, sehr gute Labormanagement.

Mein herzlichster Dank geht an Herrn Dr. Sven Fischer, Frau Inga Nowak, Herrn Dr. Nicholas Wagner, Frau Melanie Heitmann, Frau Dr. Deniz Kanber und Frau Dr. Kirsten Cremer für die fabelhafte freundschaftliche Atmosphäre, die allzeit offenen Ohren, die jederzeit gewährte Unterstützung und die lieben, aufmunternden Worte im Laboralltag.

Mein besonderer Dank gilt all den Menschen, die mich auf meinem Weg bis hierher begleitet haben, meiner Familie und Freunden, allen voran meiner Mutter Marina und meinen Geschwistern Pierre, Daniel und Stella für den stetigen Zuspruch und die willkommenen Ablenkungen vom Arbeitsalltag.

Meinem Verlobten Markus Rickert gebührt mein größtmöglicher Dank für seine Unterstützung in allen Lebenslagen, seine Geduld, sein Vertrauen in mich und für einfach alles!

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Rolle des Transkriptionsfaktors TRPS1 in der Skelettentwicklung“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Stephanie Gkalypoudis befürworte.

Essen, den 17.01.2011

---

Unterschrift des wissenschaftlichen Betreuers/  
Mitglieds der Universität Duisburg-Essen  
(Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

## **Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 17.01.2011

---

Unterschrift der Doktorandin  
(Stephanie Gkalypoudis)

## **Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, dass ich gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät oder Fachbereich abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 17.01.2011

---

Unterschrift der Doktorandin  
(Stephanie Gkalypoudis)