

Identifizierung und Charakterisierung des
menschlichen *TRPS1*-Gens

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität Essen

vorgelegt von

Parastoo Momeni

aus dem Iran

Mai 2001

Die der Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. G. Obe

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 2001

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht (in der Reihenfolge ihres Erscheinens):

Momeni P., Glöckner G., Schmidt O., von Holtum D., Albrecht B., Gillessen-Kaesbach G., Hennekam R., Meinecke P., Zabel B., Rosenthal A., Horsthemke B., Lüdecke H.-J. (2000) Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nature Genet* **24**: 71-74.

Lüdecke, H.-J., Schaper, J., Meinecke, P., Momeni, P., Groß, S., von Holtum, D., Hirche, H., Abramowicz, M.J., Albrecht, B., Apacik, C., Christen, H.-J., Claussen, U., Devriendt, K., Fastnacht, E., Forderer, A., Friedrich, U., Goodship, T.H.J., Greiwe, M., Hamm, H., Hennekam, R.C.M., Hinkel, G.K., Hoeltzenbein, M., Kayserili, H., Majewski, F., Mathieu, M., McLeod, R., Midro, A.T., Moog, U., Nagai, T., Niikawa, N., Ørstavik, K.H., Plöchl, E., Seitz, C., Schmidtke, J., Tranebjærg, L., Tsukahara, M., Wittwer, B., Zabel, B., Gillessen-Kaesbach, G., and Horsthemke, B. (2001). Genotypic and phenotypic spectrum in the tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *Am J Hum Genet* **68**: 81-91.

Für Pardis und Parviz

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Genetische Krankheiten mit fazialen Abnormalitäten	1
1.2	Die Trichorhinophalangealen Syndrome Typ I, Typ II und Typ III	4
1.3	Feinkartierung der TRPS I Chromosomenregion	5
1.4	Ziele der Arbeit.....	8
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Material	9
2.1.1	Chemikalien	9
2.1.2	Standard-Lösungen und –Medien	9
2.1.3	Vektoren.....	10
2.1.4	Enzyme.....	10
2.1.5	Bakterienstämme.....	10
2.1.6	Klone.....	11
2.1.7	Bibliotheken	11
2.1.7.1	cDNA-Bibliotheken	11
2.1.7.2	genomische Bibliotheken	12
2.1.8	cDNA	12
2.2	Methoden.....	12
2.2.1	Isolierung von DNA.....	12
2.2.1.1	Präparation von genomischer DNA aus Blut	12
2.2.1.2	Präparation von Hefe-DNA.....	13
2.2.1.3	Präparation von Phagen-DNA.....	13
2.2.1.4	Präparation von Plasmid- und PAC-DNA	14
2.2.1.5	Bestimmung der DNA-Konzentration	15
2.2.2	Restriktionsspaltung von DNA	15
2.2.3	Gelelektrophorese	16
2.2.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	16
2.2.4.1	Millipore-Methode	16
2.2.4.2	Microcon-Methode.....	17
2.2.4.3	QIAquick-Methode	17
2.2.5	Subklonierung von DNA-Fragmenten	17
2.2.5.1	Vektor-DNA.....	17
2.2.5.2	Insert-DNA.....	18
2.2.5.3	Ligation	18
2.2.5.4	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien.....	19

2.2.6	Southern-Blot-Analyse.....	20
2.2.6.1	Southern-Blot.....	20
2.2.6.2	Radioaktive Markierung von DNA.....	20
2.2.6.3	Hybridisierung.....	21
2.2.6.4	Autoradiographie	21
2.2.7	Northern-Blot-Analyse.....	21
2.2.8	Isolierung von Phagenklonen aus genomischen und cDNA-Bibliotheken	22
2.2.8.1	Bestimmung des Phagentiters.....	22
2.2.8.2	Ausplattieren, Filterabzüge und Hybridisierung der Phagenbibliothek.....	22
2.2.8.3	Geordnetes Ausplattieren von Phagenklonen.....	23
2.2.9	cDNA- und genomische-Bibliotheken.....	24
2.2.10	Sequenzierung von DNA	24
2.2.11	SSCP (Single-Strand Conformation-Polymorphism) Analyse.....	25
2.2.12	DNA-Amplifikation durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	26
2.2.12.1	Reverse Transkription und Amplifikation der cDNA (RT-PCR).....	26
2.2.12.2	Amplifikation von 3' und 5' cDNA-Enden (3'- bzw. 5'-RACE).....	27
2.2.13	Primer für spezifische Amplifikationen.....	28
3.	ERGEBNISSE	29
3.1	Charakterisierung der Transkripte in der minimalen TRPS Region	29
3.1.1	Charakterisierung der putativen Exons in PAC 8.....	29
3.1.1.1	Untersuchung der evolutionären Konservierung von PAC8 Exons.....	29
3.1.1.2	Expressionsanalyse von PAC 8 Exons mit Northern Blot und RT-PCR.....	34
3.1.2	Identifizierung des <i>TRPS1</i> -Gens	35
3.1.2.1	Isolierung des 1059bp ORFs in PAC 22.....	35
3.1.2.2	Isolierung des 123bp ORFs in PAC 22.....	37
3.1.2.3	RT-PCR mit den Primern PM 72 und PM 73.....	38
3.1.2.4	Identifizierung der 5' Exons des Transkripts.....	39
3.1.2.5	Identifizierung des 5' Endes des Transkripts.....	40
3.1.2.6	Verbindung der Exons	42
3.1.2.7	Isolierung der 3' nicht-translatierten Region (3'UTR).....	43
3.1.2.8	TRPS 1 Protein	46
3.2	Die molekulare Analyse von Patienten mit TRPS I.....	48
3.2.1	Sequenzierung der Patienten DNA	48
3.2.2	Mutationskontrolle.....	49
3.2.2.1	<i>ApoI</i> Schnittstelle (Mutation Nr.1).....	50
3.2.2.2	<i>NruI</i> Schnittstelle (Mutation Nr.2).....	50
3.2.2.3	<i>BstUI</i> Schnittstelle (Mutation Nr.5).....	52
3.2.2.4	<i>BspEI</i> Schnittstelle (Mutation Nr.6).....	52
3.2.2.5	SSCP (Mutationen 3 und 4).....	55

3.2.2.6	Verifizierung einer Spleiß-Mutation durch RT-PCR.....	56
3.3	Isolierung und Charakterisierung des murines <i>Trps1</i>	57
3.3.1	Isolierung der cDNA	57
3.3.2	Bestimmung der Exon-Intron Übergänge	62
3.3.3	Bestimmung der Expressionsmuster	63
3.4	Erstellung eines Mausmodells	64
3.4.1	Isolierung und Kartierung der Maus genomischen λ -Phagen Klons	64
3.4.2	Klonierung der Mauskonstrukte.....	67
3.4.2.1	Knock-out Konstrukt 1.....	68
3.4.2.2	Knock-out Konstrukt 2.....	71
3.4.2.3	Knock-out Konstrukt 3.....	72
3.4.2.4	Knock-in Konstrukt.....	72
4.	DISKUSSION	75
4.1	Analyse von PAC 8.....	75
4.2	Das Expressionsprofil des TRPS1 Gens	76
4.3	Das TRPS1 Protein	78
4.4	Mutationsanalyse der Patienten mit TRPS.....	81
4.5	Maus <i>Trps1</i>	87
5.	ZUSAMMENFASSUNG	89
6.	LITERATUR	91
7.	ANHANG	99

A	Adenin
aa	<i>amino acid</i> , Aminosäure
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AER	<i>apical ectodermal ridge</i> , apicale ectodermale Leiste
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	<i>copy DNA</i> , kopierte DNA
Ci	Curie
Contig	Klone mit überlappenden Inserts (contiguous = zusammenhängend)
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
CpG <i>islands</i>	CpG-reiche Inseln
cpm	<i>counts per minute</i> , Impulse pro Minute
Deletions SRO	<i>shortest region of deletion overlap</i> , kleinste Region alle überlappende Deletionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
(d)dNTP	(Di)2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tagged</i>
FISH	Floureszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
Insert	Passagierfragment eines rekombinanten Klons
kb	Kilobase
LGS	Langer-Giedion-Syndrom
Mb	Megabasenpaare
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i> , http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten RNA)
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungs-Signal
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offene Leseraster
PAC	künstliches P1-Chromosom
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu	<i>plaque forming unit</i> , Plaque bildende Einheit
Primer	Startmolekül für die DNA-Synthese
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i> , schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

sec	Sekunde
<i>single copy</i>	Einzelkopie
ssDNA	<i>salmon sperm</i> DNA, sonifizierte hitzedenaturierte Lachs-Sperma-DNA
T	Thymin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPS	Tricho-rhino-phalangeal-Syndrom
U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierte Region
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i> , künstliches Hefechromosom

1. EINLEITUNG

1.1 Genetische Krankheiten mit fazialen Abnormalitäten

Das Gesicht ist das wohl wichtigste Merkmal jedes Menschen. Von jeher hat es eine große Faszination auf den Menschen ausgeübt. In der Mythologie findet man viele Beispiele, Janus mit seinem doppelten Gesicht, der in die Zukunft wie in die Vergangenheit blickte, oder Cyclops, der Homer's Odysseus plagte. Das Gesicht kann uns etwas über die Vergangenheit, die Gegenwart und die Zukunft des Menschen sagen. Über die Krankheiten, die man gehabt hat, welche man mit sich trägt und welche möglicherweise in die nächste Generation übertragen werden.

Die craniofaziale Region neigt zu angeborenen Abnormalitäten (Gorlin et al., 1990). Die Dysmorphien können durch teratogene und genetische Faktoren verursacht werden. Durch die Klärung der morphogenetischen Signalwege kann man die normale Gesichtsentwicklung und die durch die Umwelt und genetische Faktoren verursachten Modifikationen besser verstehen (Whiting, 1997).

Die Entwicklung des Gesichts in Vertebraten ist ein dynamischer und komplexer Prozess. Der Prozess beginnt mit der Bildung von Zellen der Neuralleiste in dem sich entwickelnden Gehirn und ihrer Migration, um mit den mesodermalen Zellen die Gesichtsprimordia zu entwickeln. Die Interaktion von Signalmolekülen koordiniert die Entwicklung der Gesichtsprimordien von undifferenziertem Mesenchym zu einer Serie von Knochen und Knorpeln, die zusammen mit den anderen Geweben das adulte Gesicht bilden. Manche dieser Moleküle sind durch Analyse von Mausmutanten, craniofazialen Syndromen bei Menschen und Expressionsstudien während der Gesichtsentwicklung identifiziert worden (Francis-West et al., 1998).

Das Gesicht entwickelt sich aus 5 Fortsätzen: der frontonasalen Erhebung (*prominence*) und zwei maxillären und zwei mandibulären Erhebungen. Beim Menschen beginnt der Prozess etwa in der vierten Woche der Entwicklung und in der achten Woche ist ein erkennbares Gesicht zu sehen.

Klinische Dysmorphologie ist die Studie der abnormalen Entwicklung des Menschen, mit dem Schwerpunkt seltene Syndrome und die Fehlbildungen im Körper. Viele Syndrome sind mit mentaler Retardierung assoziiert. Dies weist darauf hin, daß die Gene, die die

körperliche Entwicklung beeinflussen, auch für die Entwicklung des zentralen Nervensystems wichtig sind (Winter, 1996).

Faziale Abnormalitäten können durch Mutation in Genen verursacht werden. Es ist aber unklar, welche Gewebe in welchem Stadium der Gesichtsentwicklung betroffen sind. Da die Gesichts- und Gehirnentwicklung entweder durch direkte Interaktionen oder durch sekundäre Effekte in Gehirn und Schädel miteinander verbunden sind, ist es nicht immer erkennbar, ob die durch eine Mutation in einem Gen verursachte Gesichtsabnormalität ein direkter Effekt auf die Gesichtsentwicklung gewesen ist oder ob ein sekundärer Effekt durch die abnormale Gehirnentwicklung vorliegt (Francis-West et al., 1998; Opitz und Gilbert, 1982; Couly und Le Dourain, 1985, 1987).

Man kennt viele Beispiele von Fehlbildungserkrankungen, bei denen Gesicht und Gliedmaßen betroffen sind. Klassische Beispiele sind Craniosynostosen wie Craniosynostose Typ Boston, Pfeiffer-Syndrom, Apert-Syndrom, Smith-Lemli-Opitz-Syndrom und Greig-Cephalopolysyndaktylie. Im Grunde ist die Entwicklung von Gesicht und Gliedmaßen sehr ähnlich. Die beiden Strukturen beginnen als undifferenzierte mesenchymale Zellen, die von epithelialen Zellen umgeben sind. Das Wachstum dieser Organe wird durch die Interaktion zwischen Mesenchym und Epithelium kontrolliert (Wedden et al., 1988; Tickle und Eichele, 1994). Wie die Gesichtsentwicklung mit frontonasalen-, maxillären- und mandibulären-Fortsätzen anfängt, beginnt die Entwicklung der Gliedmaßen vom paraxialen Mesoderm (Cohn et al., 1995). Kurz nachdem Gliedknospen zu sehen sind, wird ein Bereich, bekannt als *apicale ectodermale Leiste* (AER, *Apical Ectodermal Ridge*), entlang der *Apex* gebildet. Zur gleichen Zeit erwirbt eine Region im posterioren Bereich des Mesenchyms die Fähigkeit, anteroposterior die Bildung der Finger zu regulieren. Diese Geweberegion ist die Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA, *Zone of Polarizing Activity*) (Schneider et al., 1999). Es scheint, daß das craniofaziale Primordium eine ZPA hat, die äquivalent zur ZPA in Gliedmaßen ist (Helms et al., 1997). In Gliedmaßen ist ZPA eine Region des posterioren Mesenchyms, welche die anteroposteriore Achse in dem sich entwickelnden Gliedmaßen spezifiziert. Obwohl Gesicht und Gliedmaßen grundsätzlich zwei verschiedene Strukturen sind, fragt man sich, ob ihre Entwicklung durch den gleichen Mechanismus verläuft (Schneider et al., 1999).

Studien genetischer Syndrome, bei denen Gesicht und Gliedmaßen betroffen sind, sind der beste Weg, um diese Frage beantworten zu können. Das Greig-Cephalopolysyndaktilie Syndrom (GCPS, MIM 175700) ist eine autosomal dominanterbliche Krankheit, bei der

Gliedmaßen und die craniofaziale Entwicklung betroffen sind. Die betroffenen Patienten zeichnen sich durch die postaxiale Polydaktylie der Hände, preaxiale Polydaktylie der Füße, Macrocephalie mit einer prominenten Stirn, Hypertelorismus und eine breite Nase aus (Semenza, 1999). Als Locus für dieses Syndrom wurde das *GLI3* Gen auf 7p13 identifiziert (Vortkamp et al., 1991, 1995). *GLI3* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der Familie GLI-Krüppel Proteine, charakterisiert durch seine 5 Zinkfinger (Ruppert et al., 1988). Außer GCPS sind 4 weitere autosomal dominanterbliche Erkrankungen mit *GLI3* Mutationen assoziiert: Pallister-Hall Syndrom (PHS, MIM 146510) (Kang et al., 1997), postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A, MIM 147200) (Radhakrishna et al., 1997), postaxiale Polydaktylie Typ A und B (PAP-A/B) (Kucheria et al., 1981), und preaxiale Polydaktylie Typ-IV (PPD-IV, MIM 174700) (Baraitser et al., 1983). Da keine Genotyp-Phänotyp Korrelation zwischen Mutationen im *GLI3* Gen und Phänotypen der obengenannten Syndrome und keine klare Grenzen zwischen den Phänotypen existiert, werden alle *GLI3* Mutationen "GLI3 Morphopathien,, genannt (Radhakrishna et al., 1999).

Craniosynostose, die frühzeitige Verschluss einer oder mehrerer Schädelnähte, die zu abnormaler Schädelform führt, ist eine Erkrankung mit extrem heterogener Ätiologie und einer Häufigkeit von etwa 1 in 3000 Neugeborenen (Gorlin et al., 1990). Die bekannten Craniosynostose-Syndrome sind Craniosynostose Typ Boston (MIM 604757), Pfeiffer-Syndrom (MIM 101600), Apert-Syndrom (MIM 101200), Crouzone-Syndrom (MIM 123500), Jackson-Weiss-Syndrom (MIM 123150), Beare-Stevenson-Syndrom (MIM 123790), Muenke-Craniosynostose (MIM 134394), Shprinzen-Goldberg-Syndrom (MIM 182212) und Saethre-Chatzen-Syndrom (MIM 101400) (Wilkie, 1997). Die obengenannten Syndrome werden durch Mutationen in einem von 6 Genen, *MSX2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FBNI* bzw. *TWIST* verursacht. Die klinische Beobachtung zeigte, daß viele Craniosynostosen von Gliederabnormalitäten begleitet werden. Dadurch läßt sich vermuten, daß die craniofaziale und die Gliederentwicklung gemeinsame Signalwege benutzen.

Die Suche nach der Ursache genetischer Krankheiten und die Klärung der Mechanismen der menschlichen Entwicklung ist durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms erheblich beschleunigt worden. Eine Konsensus Sequenz von 2,91 Milliarden Basenpaaren des euchromatischen Humangenoms wurde mit verschiedenen Gen-Vorhersage Programmen analysiert und die Anzahl der Gene wurde zwischen 26000 und 38000

geschätzt, bedeutend weniger ist als die vorher geschätzten 50000 bis 100000 (Venter et al., 2001; Fields et al., 1994).

1.2 Die Trichorhinophalangealen Syndrome Typ I, Typ II und Typ III

Die wichtigsten Merkmale der Trichorhinophalangealen-Syndrome Typ I (TRPS I, MIM 190350), Typ II (TRPS II, MIM 150230) und TRPS III (TRPS III, MIM 190351) sind craniofaziale Dysmorphien und Skelettanomalien. Die Merkmale, die alle drei Typen gemeinsam haben, sind dünnes, langsam wachsendes Kopfhaar, medial buschige, lateral ausgedünnte Augenbrauen, eine knollige, birnenförmige Nase, ein langes, flaches Philtrum, ein fliehendes Kinn, eine schmale Oberlippe und abstehende Ohren. Die Patienten mit TRPS haben zapfenförmige Epiphysen an den Phalangen und sind von kleiner Statur. Giedion hat 1966 als erster das Trichorhinophalangeale (TRP)-Syndrom beschrieben (Giedion, 1966). Langer beschrieb in 1969 eine thoraco-pelvic-phalangeale Dystrophie, die außer den Symptomen von TRPS, mentale Retardierung und multiple kartilaginäre Exostosen aufwies (Langer, 1969). Die Erkrankung wurde Langer-Giedion-Syndrom (LGS) oder TRPS II genannt und die zuerst beschriebene wurde TRPS I genannt (Hall et al., 1974). TRPS I und III werden autosomal dominant vererbt und es gibt wenige Fälle von TRPS I Patienten mit zytogenetisch sichtbare Deletionen. Bei diesen Deletionen handelt es sich nur um *TRPS1* Gen. TRPS II ist ein Gengruppensyndrom, bei dem das *TRPS1*- und das *EXT1*-Gen betroffen sind. Alle TRPS II Patienten haben eine zytogenetisch sichtbare Deletion in der Region 8q24 die das *TRPS1* Gen und *EXT* Gen einschließen (Bühler und Malik, 1984). Im Gegensatz zu TRPS I, bei dem familiäre Fälle auftreten, gibt es bei dem TRPS II nur sporadische Fälle. Patienten mit einem typischen TRPS I Gesicht und schwererer Brachydaktylie, Wachstumsretardierung, aber ohne mentale Retardierung, wurden berichtet (Sugio und Kajii, 1984; Niikawa und Kamei, 1986). Die Patienten hatten keine multiplen kartilaginären Exostosen. Niikawa und Kamei (1986) schlugen vor, das dieses Form als TRPS III zu bezeichnen. Es sind andere Fälle von TRPS III Patienten berichtet worden mit genereller Verkürzung aller Phalangen und Metakarpalen ohne mentale Retardierung und multiple Exostosen (Nagai et al., 1994; Itin et al., 1996; Vilain et al., 1999).



Abbildung 1.1: Ein familiärer Fall von TRPS I mit drei Patientengenerationen. Der Indexpatient (Mitte), die Mutter (links) und die mütterliche Großmutter (rechts).

1.3 Feinkartierung der TRPS I Chromosomenregion

Für die Bestimmung der chromosomalen Region des Langer-Giedion-Syndroms (LGCR), wurde ein komplettes YAC-Contig für 8q24.1 konstruiert. Es wurde festgestellt, daß TRPS II ein Gengruppen-Syndrom ist und daß das *TRPS1* Gen proximal zum *EXT1* Gen liegt (Hou et al., 1995; Lüdecke et al., 1995). Die Klonierung von *EXT1* bewies, daß TRPS II ein Gengruppen-Syndrom ist, bei dem das *EXT1* und das *TRPS* Gen betroffen sind (Ahn et al., 1995). Multiple kartilaginäre Exostosen können auch isoliert, autosomal dominant vererbt werden. Die Deletions-SRO (*shortest region of deletion overlap*) von TRPS II wurde auf 2 Mb in 8q24.1 geschätzt (Lüdecke et al., 1991). Der Inversionsbruchpunkt von Patientin HB11480 mit TRPS I, (Lüdecke et al., 1995) und der Translokationsbruchpunkt von dem Patienten EA (Hou et al., 1995) definierten die proximalen und distalen Enden der minimalen TRPS I Genregion, die mit der TRPS II Deletions-SRO überlappt und auf etwa 900 kb geschätzt wurde (Abb. 1.2). Die Patientin HB11480 ist eine TRPS I Patientin mit einer parazentrischen Inversion $inv(8)$, die ursprünglich als $46,XX\ inv(8)(p21q22)$ beschrieben war. Die YACs A3B7 und A33F4 überspannen den 8q Inversionsbruchpunkt in dieser Patientin. Der Inversionsbruchpunkt von Patientin HB11480 liegt etwa 35-55 kb proximal vom Translokationsbruchpunkt der Patientin KS2166, der auch durch die YACs A3B7 und A33F4 abgedeckt wird. Der Inversionsbruchpunkt von der Patientin HB11480

wurde als das proximale Ende der minimalen *TRPS1* Genregion betrachtet. Die distalen Deletionsbruchpunkte der Patienten JL1386 und CR5568 kartieren in YAC 340B11 (Lüdecke et al., 1995; Brandt et al., 1997). Patient NS hat TRPS I und eine parazentrische Inversion, assoziiert mit einer 4 Mb interstitiellen Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 8. Der distale Deletionsbruchpunkt von diesem Patienten und der Insertionsbruchpunkt von Patient JS1380 kartiert zwischen YACs A3B7 und 30C3 (Sasaki et al., 1997; Lüdecke et al., 1995). Die Patientin JJ14227 hat den typischen TRPS Phänotyp ohne Exostosen (TRPS I). Sie hat eine submikroskopische interstitielle Deletion in YAC A3B7. Bruchpunkte der Patienten mit TRPS I sind auf eine große Region verteilt und konnten deshalb nur mit YAC Klonen abgedeckt werden. Die minimale *TRPS1* Genregion ist mehrmals durch die YAC Klone repräsentiert, aber die gesamte Region wird durch den 1,6 Mb CEPH MEGA YAC 919G10, der sich weit über das proximale Ende der minimalen *TRPS1* Genregion streckt, abgedeckt. Um die TRPS kritische Region nach dem Gen zu durchsuchen, wurde ein PAC Contig, das die Region überspannt, von Dr. Schmidt aus unserem Labor, konstruiert. Die PAC Klone 8 und 9 wurden mit LE1.3 (distales Ende von YAC A3B7) isoliert. Die PAC Klone 5 und 7 wurden mit YL2.2 (proximales Ende von YAC 340B11) isoliert. PAC 11 wurde mit dem SP6 Ende von PAC 9 isoliert und PAC 13 mit dem PAC 5T7 Ende. Der PAC Contig beinhaltet sechs überlappende Klone: PAC8, PAC9, PAC11, PAC13, PAC5, PAC7. PAC8SP6 präsentiert das proximale Ende des Contigs und PAC7SP6 präsentiert das distale Ende.

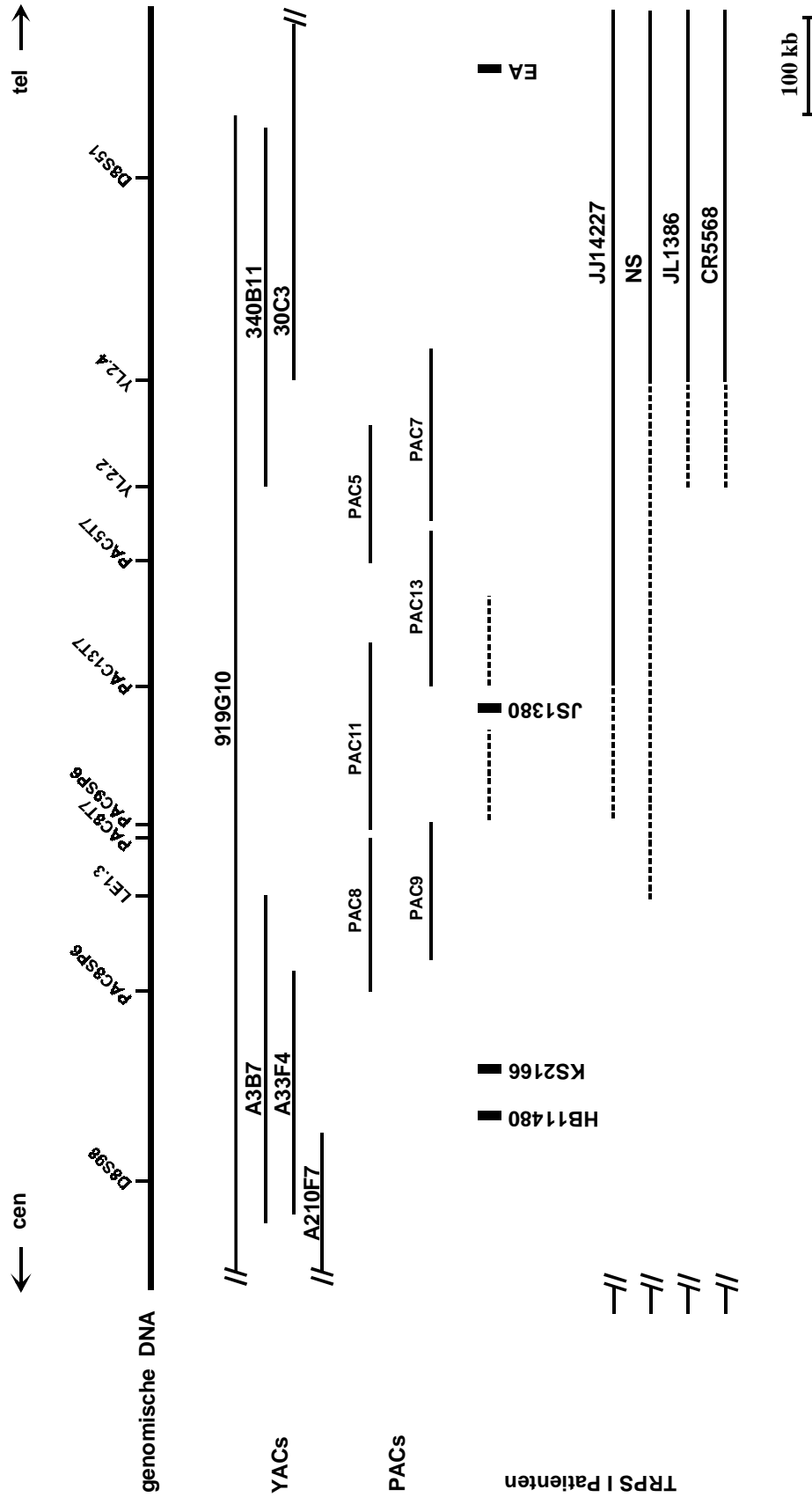


Abbildung 1.2: Die TRPS I Chromosomenregion mit YAC und PAC Klonen, Bruchpunkte in Patienten mit TRPS I und die DNA Marker (Lüdecke et al., 1999).

1.3 Ziele der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit waren in der Region keine EST (*Expressed Sequence Tagged*, exprimierten Sequenzen) Klone bekannt. Das PAC-Contig (Abb. 1.2) sollte sowohl in proximaler als auch in distaler Richtung ausgedehnt werden, um die proximalen Bruchpunkte von den Patienten HB11480 und KS2166 und die distale Bruchpunkte vom Patient EA abzudecken. Das PAC-Contig sollte als Grundlage dienen, um mittels positionalen Klonierung das *TRPS1* Gens zu identifizieren. Die PAC Klone sollten in Zusammenarbeit mit der Abteilung für molekulare Biotechnologie in Jena, im Rahmen des Humangenomprojekts, vollständig sequenziert werden. Die Sequenzen sollten durch die computergestützte Analyse nach Exons durchsucht werden. Die vorhergesagten Exons sollten mit konventionellen Methoden wie Durchmustern von cDNA-Bibliotheken isoliert und analysiert werden. Die Regionen, die als Positionskandidaten für das *TRPS1* Gen gehandelt werden, sollten bei den Patienten mit TRPS I nach Mutationen durchsucht werden. Nach der Isolierung und Charakterisierung des menschlichen Gens sollte das Mausgen isoliert werden. Dies ist die Voraussetzung, um ein Mausmodell zu konstruieren. Die Tiermodelle helfen im Allgemeinen bei der Klärung der Pathogenese von Krankheiten.

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Boehringer Mannheim, Merck (Darmstadt), Sigma (Heidelberg), Serva (Heidelberg) und GibcoBRL (Eggenstein) in *pro analysis* Qualität bezogen. Die Radiochemikalien wurden von den Firmen DuPont/NEN (Bad Homburg) und Amersham Pharmacia (Freiburg) bezogen.

2.1.2 Standard-Lösungen und -Medien

Standardlösungen:

CES:	1 M Sorbitol, 100 mM NaCitrat, 50 mM EDTA pH 8.0
Denhardts:	0.02% Ficoll, 0.02% Polyvinylpyrrolidon, 0.02% BSA
10xLadepuffer:	0.25% Bromphenolblau oder Xylenblau, 15% Ficoll, 10 mM EDTA
PBS:	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4 mM KH ₂ PO ₄
SM:	50 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂
SSC:	150 mM NaCl, 15 mM Na ₃ -Citrat
SSPE:	180 mM NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM EDTA pH 7.4
STE:	0.1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
TE:	10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA
TBE:	50 mM Tris-Borat, 4 mM EDTA pH 8.3
MMTB:	50 mM Tris pH 8.0, 80 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% SDS

Standardmedien:

AHC-Medium:	0.17% <i>Yeast Nitrogen Base</i> (Difco), 0.5% (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% <i>Casein Hydrolysate Acid</i> (USB), 20 µg/ml Adeninhemisulfat, 2% Glucose
LB-Medium:	1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl
LB-Platten:	LB-Medium, 1.2% Bacto-Agar (Difco), 100 µg/ml Ampicillin, 16 µg/ml X-Gal
LM-Medium:	1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl
NZY-Medium:	0.5% NaCl, 0.2% MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.5% Hefeextrakt, 1% NZ-Amin (ICN), pH 7.5 (mit NaOH)

NZY-Platten: NZY-Medium, 1.5% Bacto-Agar (Difco)

2.1.3 Vektoren

pET32	(Stratagene)
pPNT	(Stratagene)
pT7T3	(Pharmacia)
pBluescript II KS+	(Stratagene)

2.1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme:

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, New England BioLabs, GibcoBRL und Pharmacia bezogen.

weitere Enzyme:

Alkalische Phosphatase	(Boehringer Mannheim)
<i>AmpliTaq</i> -Polymerase	(Perkin Elmer)
Desoxyribonuklease I	(Boehringer Mannheim)
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	(Boehringer Mannheim)
Plasmid-Safe ATP-Dependent Dnase	(Epicentre Technologies)
Proteinase K	(Boehringer Mannheim)
reverse Transkriptase	(Boehringer Mannheim, GibcoBRL)
Ribonuklease A	(Boehringer Mannheim)
Ribonuklease T ₁	(Boehringer Mannheim)
T ₄ -DNA-Ligase	(Boehringer Mannheim)
Terminale Transferase	(Boehringer Mannheim, GibcoBRL)
<i>Yeast Lysate Enzyme</i> (YLE)	(ISN)

2.1.5 Bakterienstämme

E. coli DH5 : *endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA, gyrA96, relA1*

E. coli XL1-Blue: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacI^qZ M15, Tn10 (Tet^r)]*

E. coli XL1-Blue MRA: *Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac*

E. coli XL1-BlueMRA(P2): *Δ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi1, gyrA96, relA1, lac (P2)*

2.1.6 Klone

Tabelle 2.1: Verwendete Klone

ESTs	IMAGE	Vektor	Insertgröße	Gewebe
AA662457	1218102	PT7T3D-Pac	313	normale Prostata
H53479 H53854	202658	PT7T3D-Pac	2255	fötale Leber und Milz
AA596249	1052206	PT7T3D-Pac	428	Maus Darm
AA755979	1180313	PT7T3D-Pac		Maus Myotuben
PACs*	Name	Vektor	Insertgröße	Bibliothek
PAC5	M05168Q13	PCYPAC-2	120 kb	LLNLP704M05168Q13
PAC7	L1937Q13	PCYPAC-2	180 kb	LLNLP704L1937Q13
PAC8	M1557Q13	PCYPAC-2	160 kb	LLNLP704M1557Q13
PAC9	J0846Q13	PCYPAC-2	140 kb	LLNLP704J0846Q13
PAC11	H1437Q13	PCYPAC-2	180 kb	LLNLP704H1437Q13
PAC13	I0653Q13	PCYPAC-2	150 kb	LLNLP704I0653Q13
PAC22	H08136	PCYPAC-2	107 kb	RPCIP704H08136
PAC24	N08994	PCYPAC-2	160,5 kb	RPCIP704N08999
PAC30	B08825Q2	PCYPAC-2	116,69 kb	RPCIPB08825Q2

* Die PAC-Klone wurden über das *RessourcenZentrum/PrimärDatenbank (RZPD)*, Berlin, bezogen.

2.1.7 Bibliotheken

2.1.7.1 cDNA-Bibliotheken

Gewebe	Vektor	Wirtstamm (<i>E. coli</i>)	Herstellungsmethode	Bezugsquelle
Craniofaziales Gewebe	λ ZAP II	XL1 Blue	oligo(dT)/ <i>random-primed</i>	Stadler et al., 1992
Fötale Gehirn	λ gt10	C600 hfl	oligo(dT)- <i>primed</i>	Clontech HL1010b
Maus 17-Tage alte Embryo	λ gt10	C600 hfl	oligo(dT)/ <i>random-primed</i>	Clontech ML5000a

2.1.7.2 genomische Bibliotheken

Spezies	Vektor	Wirtstamm (<i>E. coli</i>)	Gewebe	Bezugsquelle
Maus	λ FIX II	XL1 Blue MRA	Leber	Stratagene
Maus	PPAC4	DH10B	Milz	RPCI21

2.1.8 cDNA

QUICK-ScreenTM Human cDNA Library Panel, K 1003-1, Lot # 6040232, Clontech

Mouse 17-day Embryo Marathon cDNA, Cat # 74-60-1, Lot # , Clontech

Human Fetal Brain Marathon-ReadyTM cDNA, Cat # 7402-1, Lot # 9010717, Clontech

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von DNA

2.2.1.1 Präparation von genomischer DNA aus Blut

Zur Präparation von genomischer DNA aus Blut wurde das Nucleon BACC2-Kit der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Dabei wurden 2-5 ml EDTA-Blut, das entweder frisch abgenommen war, oder bei -20°C lagerte, mit 40 ml Reagenz A für 4 min bei RT gemischt. Die Zellkerne wurden zentrifugiert (4 min 3500 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml des Reagenz B gelöst und nach Zugabe von 500 μ l Natrium-Perchlorat wurde die Lösung für 20 min bei 65 °C im Schüttelbad gemischt. Anschließend wurden 2 ml kaltes Chloroform zugegeben, der Ansatz für 10 min bei RT gemischt und für 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Von der Nucleon Silica-Suspension wurden 300 μ l vorsichtig zugegeben und für 3 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Phase über der Silica-Suspensionsschicht enthielt die DNA und wurde in ein neues Gefäß überführt. Nach einer Zentrifugation (3 min bei 3500 rpm) wurde der Überstand in ein neues Röhrchen gefüllt und zur Fällung der DNA mit 4 ml 100% Ethanol versetzt. Die DNA wurde mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette aus dem Ansatz gefischt, in 70% Ethanol gewaschen, 15 min an der Luft getrocknet und in 300 μ l TE gelöst.

2.2.1.2 Präparation von Hefe-DNA

Die Präparation von hochmolekularer Hefe-DNA erfolgte nach einer Methode von Carle und Olson (1984). 10 ml AHC-Medium wurden mit dem jeweiligen Hefestamm angeimpft und 3 Tage im Schüttelinkubator bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Die Hefezellen wurden bei 500 g abzentrifugiert, zweimal mit 10 ml 50 mM EDTA pH 8.0 gewaschen, in 1 ml CES resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur stengelassen. Nach weiterer Zugabe von 1 ml CES mit 70 mM DTT, 280 U/YLE (*yeast lysate enzyme*, Hefe lysierende Enzym) wurden die Hefezellen 2 h bei 37°C und 50 rpm inkubiert. Die Sphäroblasten wurden 10 min bei 500 g abzentrifugiert, Überstand in 0.7 ml frischem Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% Sarkosyl, 1 mg/ml Proteinase K) resuspendiert und 2 h bei 50 °C lysiert. Zum Abbau der RNA wurden 70 mg/ml RNase A und 1 µl RNase T₁ zugegeben und 2 h bei 37 °C und 50 rpm inkubiert. Nach einer Extraktion mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform (1:1) und zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform wurde die DNA mit dem 0.8 fachen Volumen Isopropanol gefällt und 20 min bei 13800 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

2.2.1.3 Präparation von Phagen-DNA

Der Wirtstamm wurde in 5 ml LM-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0.2% Maltose angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die phagensensitiven Bakterien wurden 15 min bei 850 g und 4 °C pelletiert und in 0.4fachem Volumen 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. 350 µl der Zellen wurden mit 350 µl Ca²⁺/Mg²⁺-Lösung (jeweils 10 mM CaCl₂ und MgCl₂) gemischt und die Phagenmenge zugegeben (10⁶-10⁸ pfu). Nach Inkubation von 15 min bei 37 °C wurde das Bakterien/Phagengemisch in 350 ml LM-Medium, 10 mM MgSO₄, 0.2% Maltose überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde 0.7 ml Chloroform hinzugegeben und die Kultur für 10 min bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (15 min bei 7500 rpm und 4 °C). Der Überstand wurde mit 21 g NaCl und 24.5 g PEG (MW 8000) gemischt, der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 17700 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Φ80-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄) gelöst und mit demselben Volumen Chloroform extrahiert. Die bakterielle DNA und RNA wurden durch Zugabe von 2 µg/ml DNase1, 2

mg/ml RNaseA und 40 U/ml RNaseT₁ und Inkubation über Nacht bei 37 °C abgebaut. Um die Phagenköpfe zu zerstören, wurde 1.4 ml SDS-Mix (2.5% SDS, 250 mM EDTA, 500 mM Tris-HCl pH 8.0) zugegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Lösung wurde einmal mit dem gleichen Volumen Phenol, einmal mit Phenol-Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform extrahiert. Die Phagen-DNA wurde durch Zugabe von 310 µl 5 M NaCl und 15.5 ml Ethanol gefällt. Schließlich wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, pelletiert, getrocknet und in 100 µl RNase-Lösung (50 µg/ml RNaseA, 80 Units/ml RNaseT₁) aufgenommen.

2.2.1.4 Präparation von Plasmid- und PAC-DNA

Die Bakterien wurden in dem jeweiligen Flüssigmedium (Plasmide: LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin; PACs: LB-Medium mit 40 µg/ml Kanamycin) über Nacht im Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific G26) bei 37 °C und 275 rpm kultiviert. Die Präparation erfolgte bis auf wenige Modifikationen nach dem Protokoll der Firma Qiagen, das auf der Methode von Birnboim und Doly (1979) beruht. Die Zusammensetzung der Puffer 1-3 ist in den Präparationsprotokollen für die analytische Präparation und die Präparation im großen Maßstab identisch.

Für die analytische Präparation wurde eine Bakterienkolonie über Nacht in 5 ml geeignetem Medium inkubiert. 1.5 ml der ÜNK wurden 5 min bei 15000 g zentrifugiert und das Pellet wurde in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Nach einer Zugabe von 300 µl Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl des Puffer 3 (3 M KOAc pH 5.5) zugegeben und 15 min bei 11500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 500 µl Ethanol hinzugegeben und die DNA wurde durch Zentrifugation (20 min bei Raumtemperatur und 11500 g) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl RNase-Lösung (50 µg/ml RNaseA, 20 Units RNase T₁ in H₂O) aufgenommen.

Um im großen Maßstab Plasmid- bzw. PAC-DNA zu gewinnen, wurden 500 ml Medium mit 5 ml einer ÜNK angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (10 min bei 9950 g und 4 °C), in 20 ml Puffer 1 resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 20 ml Puffer 2 zugegeben und 3 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde mit 20ml vorgekühlte Puffer 3 versetzt und 20 min auf Eis gestellt. Die

Zellreste wurden durch Zentrifugation (20 min bei 4 °C und 17700 g) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, erneut zentrifugiert (15 min bei 4 °C und 13800 g) und auf eine Qiagen 500 Ionenaustauschsäule gegeben, die zuvor mit 10 ml QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100) äquiliert wurde. Die an das Säulenmaterial gebundene DNA wurde mit 30 ml QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Ethanol) gewaschen und anschließend mit 5 ml bei 55 °C erwärmte QF-Puffer (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 15% Ethanol) eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 3.5 ml Isopropanol und Zentrifugation (20 min bei 14000 g und RT). Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl RNase-Lösung aufgenommen.

2.2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die DNA in Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm in dem Spektralphotometer Ultrospec III von Pharmacia gemessen. Die optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, beziehungsweise 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Bei proteinfreier DNA beträgt der Quotient aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm 1.8.

Alternativ wurde die DNA-Konzentration durch Auftragung eines Aliquots neben 12 µl λ HindIII-Größenstandard auf einem Agarosegel und anschließendem Vergleich der Intensitäten der Banden abgeschätzt. Dabei entsprach das 23 kb große Fragment des λ HindIII-Größenstandards einer DNA-Menge von 140 ng.

2.2.2 Restriktionsspaltung von DNA

Pro Restriktionsspaltung wurden 2 µg hochmolekulare DNA (genomische DNA, Hefe-, PAC- und Phagen-DNA) beziehungsweise 0.8 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit 10 bis 20 Units des jeweiligen Restriktionsenzym und dem erforderlichen Restriktionspuffer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl gemischt. Durch Zugabe von 0.1 µg/µl BSA wurden die Restriktionsenzyme stabilisiert. Die Restriktion von genomischer DNA und Hefe-DNA erfolgte für mindestens 6 h bei der empfohlenen Inkubationstemperatur des Enzyms; PAC-, Phagen- und Plasmid-DNA wurden für 1 bis 2 h inkubiert. Beim Schneiden der DNA durch zwei verschiedene Restriktionsenzyme mußte jeweils die optimale Salzkonzentration berücksichtigt werden: Zuerst wurde mit dem Enzym

geschnitten, das eine niedrigere Salzkonzentration benötigte, anschließend wurde die höhere Salzkonzentration in einem Reaktionsvolumen von 40 µl eingestellt, und das zweite Enzym zugegeben.

2.2.3 Gelelektrophorese

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden in Abhängigkeit ihrer Größe in einem 0.5%igen bis 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer gelöst und mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Als Laufpuffer diente 1xTAE-Puffer mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid. Die Elektrophoresekammern stammten von der Firma BRL, Modelle H5 und H6. Die restringierte DNA wurde mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Phagen-DNA wurde vor dem Auftragen 10 min bei 65 °C inkubiert, um Konkatemere zu zerstören. Pro Spur wurden 20 bis 40 µl DNA-Lösung bei 50 bis 100 Volt aufgetrennt. Als Größenstandard dienten die 1 kb Leiter (GibcoBRL), *MspI*-gespaltene pUC19 DNA (MBI) und *HindIII*-geschnittene Lambda-DNA (Boehringer). Die Gele wurden auf einem Transilluminator unter UV-Licht (302 nm) mit einer Belichtungszeit von 1 sec und der Blende von 5.6 fotografiert.

2.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die aus einer Restriktionsspaltung oder PCR stammten, wurden für die Sequenzierung und Subklonierung von unspezifischen DNA-Fragmenten, Nukleotiden, Primern, Proteinen und sonstigen Verunreinigungen befreit. Die Aufreinigung erfolgte nach einer der folgenden Methoden.

2.2.4.1 Millipore-Methode

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurden diese zunächst ausgeschnitten, in ein Filtergefäß „Ultrafree-MC 0.45 µm“ der Firma Millipore überführt. Die DNA-Fragmente wurden mindestens 1 h bei -70 °C inkubiert, 20 min bei 37 °C aufgetaut und 20 min bei 5600 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 20 µl H₂O wurde erneut 20 min bei 5600 g zentrifugiert. Die Agarose verblieb im Filter, und die DNA-Fragmente gelangen ins Filtrat und konnten für Subklonierungen eingesetzt werden.

2.2.4.2 Microcon-Methode

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten für Sequenzierreaktionen wurde das Volumen der PCR-Reaktion mit Merck H₂O auf 500 µl erhöht und in einen Filtereinsatz eines „Microcon-100 Mikrokonzentrators“ (Amicon) pipettiert. Nach Zentrifugation (15 min bei 500 g) wurde das Eluat, das Salze, Primer und Nukleotide enthält, verworfen, 500 µl H₂O zugegeben und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Der Filtereinsatz wurde umgedreht, in ein neues Gefäß überführt und 2 min bei 500 g zentrifugiert. Danach liegen die DNA-Fragmente in einem Volumen von ca. 20 µl vor.

2.2.4.3 QIAquick-Methode

Zur Präparation DNA aus dem Agarosegel wurde das QIAquick Spin Kit der Firma QIAGEN verwendet. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurden diese zunächst ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe des dreifachen Volumen Puffer QC (z.B. 300 µl Puffer auf 100 mg Gel), wurde das Gefäß bei 50°C für 10 min inkubiert bis das Gel sich gelöst hatte. Nach der Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol wurde die Lösung auf ein QIAquick-Säule pipettiert. Nach Zentrifugation (1 min bei 10000 g) wurde mit 500 µl Puffer QC und danach mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Das Eluat, das Salze, Agarose und Isopropanol enthält, wurde verworfen. Anschließend wurde 50 µl H₂O oder Puffer EB auf den Filter pipettiert und für 1 min inkubiert. Die Säule wurde in ein neues Gefäß überführt und 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Danach lagen die DNA-Fragmente in einem Volumen von ca. 30 µl vor.

2.2.5 Subklonierung von DNA-Fragmenten

2.2.5.1. Vektor-DNA

Bei der Subklonierung von DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsspaltung gewonnen wurden, dienen die Plasmide pT7/T3 (Pharmacia), pBluescript (pKS⁺, Stratagene) oder pET32 (Stratagene) als Vektoren. Bei einer symmetrischen Klonierung wurde der Vektor mit dem gewünschten Restriktionsenzym gespalten und anschließend, um die Religation des Vektors zu vermeiden, an den 5'-Enden mittels alkalischer Phosphatase (*Calf Intestine Phosphatase* (CIP), Boehringer) dephosphoryliert. Die Vektor-DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, mit 100% Ethanol gefällt, in 90 µl 10 mM Tris-HCl pH

8.3 und 10 µl 10x CIP-Puffer (500 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA) aufgenommen und 1 Unit CIP pro pmol Vektorenden zugegeben. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37°C sowie 15 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl H₂O, 8 µl STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) und 4 µl 10%igem SDS wurde 15 min bei 68 °C inkubiert und die Vektor-DNA anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung gereinigt.

Zur Subklonierung von PCR-Produkten wurde ein Vektor generiert, der an seinen 3'-Enden ein überhängendes ddT enthält (ddT-Vektor). Die *Taq*-Polymerase hängt bei der PCR-Reaktion unspezifisch einzelne dATPs an das 3'-Ende von Produkten an. Diese können daher in den ddT-Vektor kloniert werden. In einer Methode von Holton und Graham (1991) wurden zur Herstellung des Vektors 6 µg pBluescript mit *EcoRV* geschnitten, das Enzym hitzeinaktiviert, die DNA gefällt und mit 100 Units Terminaler Transferase in 40 µl 25 mM Tris-HCl pH 6.6, 200 mM KCacodylat, 250 µg/ml BSA, 1.5 mM CoCl₂, 10 µM ddTTP 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionslösungen stammten aus dem „Terminale Transferase Kit“ (Boehringer). Anschließend wurde der Vektor aufgereinigt.

Für eine gerichtete Klonierung wurde die Vektor-DNA mit zwei gewünschten Restriktionsenzymen geschnitten. Die Aufreinigung von Vektor-DNA bzw. den zu klonierenden DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Millipore- oder Microcon-Methode (2.2.6.1, 2.2.6.2).

2.2.5.2 Insert-DNA

Die DNA-Fragmente, die für die Subklonierung eingesetzt wurden, wurden mit Hilfe der Millipore- (2.2.6.1) oder der Microcon-Methode (2.2.6.2) aufgereinigt.

2.2.5.3 Ligation

Bei der symmetrischen Klonierung wurden 10 ng Vektor-DNA und der 100fache molare Überschuß an Insert-DNA eingesetzt. Bei einer gerichteten Klonierung reicht ein dreifacher molarer Überschuß an Insert-DNA aus. Die Ligationen wurden mit 5 Units T₄-DNA-Ligase in 20 µl 1 x Ligasepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) angesetzt und über Nacht bei 16 °C oder 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.5.4 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Bakterienzellen, die DNA aus der sie umgebenden Lösung aufnehmen können (kompetente Zellen), wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode (Maniatis et al., 1982) gewonnen. Eine Bakterienkolonie des *E. coli*-Stammes DH5 α wurde in 10 ml ϕ a-Medium (für 1 Liter: 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Trypton, 5 g MgSO₄, pH 7.6 [mit KOH]) bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis die Kultur eine OD₅₅₀ von 0.3 erreicht hatte. Von der Kultur wurden 5 ml in 100 ml ϕ a-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen eines OD₅₅₀-Wertes von 0.48 wurden je 25 ml der Kultur in vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, die Zellen für 15 min bei 1250 g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 10 ml kaltem TbfI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% Glycerin, pH 5.8 [mit 0.2 M HAc]) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wurden die Zellen 15 min bei 1250 g und 4 °C zentrifugiert und in 1 ml kaltem TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerin, pH 6.5 [mit KOH]) gelöst. Die Bakteriensuspension wurde mit vorgekühlten Pipettenspitzen in 100 μ l-Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in einem Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

Für eine Transformation wurden 50 μ l der kompetenten DH5 α -Zellen mit 4-5 μ l Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 min bei 42 °C) wurde der Ansatz kurz auf Eis gestellt, mit 450 μ l LB-Medium gemischt und 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Danach wurden je 50 μ l, 150 μ l und 300 μ l der Kultur auf LB-Indikatorplatten (100 μ g/ml Ampicillin, 40 μ g/ml X-Gal) verteilt, die eine Blau/Weiß-Selektion nach Sambrook et al. (1989) ermöglichen. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C waren weiße (mit Insertion von DNA in den Vektor) und blaue Kolonien (ohne Insertion von DNA in den Vektor) sichtbar. Von den weißen Kolonien wurde die DNA präpariert (2.2.1.5), mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Von den rekombinanten Klonen wurden Stammkulturen (500 μ l der ÜNK mit 500 μ l sterilem Glycerin) angelegt und bei -70 °C gelagert.

2.2.6 Southern-Blot-Analyse

2.2.6.1 Southern-Blot

Um DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran zu transferieren, wurde das Gel zur Denaturierung der DNA 30 min in Denaturierungslösung (0.25 M NaOH, 0.6 M NaCl) geschwenkt. Die einzelsträngige DNA wurde nach der Methode von Southern (1975) auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall) übertragen. Dazu wurde das Gel auf zwei Lagen 10 x SSC-getränkten Filterpapiers (3MM, Whatman) gelegt, deren überhängende Enden in ein Pufferreservoir von 500 ml 10x SSC eintauchten. Auf das Gel wurde eine in 2 x SSC getränkte Nylonmembran gelegt und darauf zwei in 2x SSC getränkte Filterpapiere sowie ein Stapel saugfähiges Zellstoffpapier. Die Konstruktion wurde mit einem Gewicht beschwert. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran kurz in 2 x SSC geschwenkt, getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung von 4 min bei 302 nm auf der Membran fixiert.

2.2.6.2 Radioaktive Markierung von DNA

Die DNA, die als Sonde für eine radioaktive Hybridisierung verwendet werden sollte, wurde mit der *random-oligo-priming*-Methode von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) markiert. Bei dieser Methode werden Hexanukleotide mit allen möglichen Nukleotidsequenzen (*random oligos*) als Primer für die Klenow-Polymerase eingesetzt. Letztere synthetisiert an der einzelsträngigen DNA-Sonde den komplementären Strang und baut dabei radioaktive Nukleotide ein. Die DNA wurde auf eine Konzentration von 1 ng/ μ l mit H₂O verdünnt und 15 ng der Sonde wurden mit 5 μ l OLB (*Oligo Labelling Buffer*) vermischt, 5 min gekocht, auf Eis gestellt und 1 Unit Klenow-Polymerase sowie 25 μ Ci [α^{32} P]dCTP [10 μ Ci/ μ l] zugegeben. Die Reaktion wurde entweder 4 h bei 37 °C oder über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden die nicht eingebauten Nukleotide mittels Dialyse von der radioaktiven Sonde getrennt. Dazu wurde der Ansatz mit 25 μ l 10 mM EDTA vermischt, auf Mikrofilter einer Porengröße von 0.5 μ m pipettiert und 30 min gegen H₂O dialysiert. Anschließend wurde die Sonde abgenommen, der Filter mit 50 μ l 10 mM EDTA gewaschen und der radioaktive Einbau durch Messung eines 5 μ l-Aliquots im Szintillationszähler (nach Cerenkov) gemessen.

OLB:	50 µl Lösung A + 125 µl Lösung B + 75 µl Lösung C
Lösung A:	0.5 ml 1.25 M Tris-HCl pH 8.0, 0.125 M MgCl ₂ + 9 µl β-Mercaptoethanol + je 2.5 µl 0.1 M dATP, dGTP, dCTP
Lösung B:	0.2 M HEPES pH 6.6
Lösung C:	50 OD pd(N) ₆ (Pharmacia) + 550 µl TE

2.2.6.3 Hybridisierung

Der Southern-Blot (2.2.8.1) wurde in einem 50 ml-Falconröhrchen mit 4 ml Hybridisierungslösung (4 x SSPE, 6% PEG M_r 15000-20000 SIGMA P2263, 2 x Denhardt-Lösung, 0.5% SDS, 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA) für 2 h bei 65 °C im Rotationsofen (Firma Bachofer) inkubiert. Danach wurden von der hitzedenaturierten Sonde 0.5 x 10⁶ bis 1.5 x 10⁶ cpm pro ml Hybridisierungslösung zugegeben und der Southern-Blot über Nacht im Rotationsofen bei 65 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde der Southern-Blot viermal bei RT mit 2 x SSC, 0.1% SDS gewaschen. Die Stringenz der anschließenden Waschschrirte richtete sich nach dem Hybridisierungsverhalten der radioaktiven Sonde (ca. 30 min bei 65 °C mit 2xSSC bzw. 0.1% SDS bis 0.1 x SSC bzw. 0.1% SDS). Zur Wiederverwendung eines hybridisierten Southern-Blot wurde die radioaktiv markierte Sonde durch Inkubation für 30 min in kochender 0.1% SDS-Lösung abgewaschen, der Blot getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und bei 4 °C gelagert.

2.2.6.4 Autoradiographie

Nach einer Hybridisierung wurden die gewaschenen Southern-Blots kurz getrocknet, auf eine Plastikunterlage gelegt, in Frischhaltefolie gepackt und in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie (Dupont Cronex lightning plus) gelegt. Die verwendeten Röntgenfilme (Fuji Xray RX) wurden auf die Southern-Blots gelegt. Die Exposition erfolgte je nach Signalstärke für 1 h bis 14 Tage bei -70 °C.

2.2.7 Northern-Blot-Analyse

Die verwendeten Northern-Blots wurden bei der Firma CLONTECH bezogen (*Human Multiple Tissue Northern (MTN) Blot*, *Human Fetal Multiple Tissue Northern (MTN) Blot II*, *Mouse embryo Multiple Tissue (MTNTM) Northern*, *Mouse RNA Master BlotTM*, *Human RNA Master BlotTM*). Die Hybridisierung erfolgte mit 1.5 x 10⁶ bis 3 x 10⁶ cpm der

hitzenedenaturierten Sonde und einer Hybridisierungslösung aus 5 x SSPE, 10 x Denhardts-Lösung, 2% SDS, 100 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA und 50% deionisiertem Formamid. Die Maus- und Human-RNA Master Blots wurden in der vorgewärmten Express Hyb Lösung (Clontech) mit 100 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA 30 min bei 42 °C prähybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wurde abgeschüttet und die Hybridisierung erfolgte in 5 ml Express Hyb Lösung, 5-10 x 10⁶ cpm/ml für 4h. Die Northern-Blots wurden zunächst bei RT gewaschen und danach, wie die Southern-Blots, je nach der verwendeten Sonde 30-45 min bei 50 °C im Schüttelwasserbad gewaschen (2 x SSC, 0.1% SDS). Die Expositionszeiten betragen 1 h (β-Aktin) bzw. 24 h (hp1).

2.2.8 Isolierung von Phagenklonen aus genomischen und cDNA-Bibliotheken

2.2.8.1 Bestimmung des Phagentiters

Zur Bestimmung des Phagentiters wurde von einem Aliquot der Phagenbibliothek eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁷ hergestellt. Die Wirtsstämme XL1-Blue MRA (P2), XL1-Blue MRA oder C600hfl wurden wie unter 2.2.1.4 beschrieben für eine Phageninfektion vorbereitet, und je 10 µl einer Verdünnung wurden mit 100 µl der phagensensitiven Zellensuspension 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml 50 °C warmem Softtop (NZY-Medium, 0.7% Agarose) wurden die Gemische auf kleinen NZY-Platten verteilt und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl der *plaque forming units* (pfu) wurde am nächsten Tag gezählt und der Titer (pfu/µl) bestimmt.

2.2.8.2 Ausplattieren, Filterabzüge und Hybridisierung der Phagenbibliothek

Aus der Phagenbibliothek wurden insgesamt 250.000 Phagenklone auf insgesamt fünf 300 ml NZY-Platten ausplattiert. Dabei wurde pro Platte 1 ml der phagensensitiven XL1-Blue MRA (P2)-Bakterienzellen mit 2000 pfu Phagen vermischt, 15 min bei 37 °C inkubiert, 40 ml 50 °C warmer Softtop hinzugegeben und das Gemisch auf der vorgewärmten Platte verteilt. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Platten mindestens 3 h bei 4 °C gekühlt, um den Agar für das Abziehen der Filter möglichst hart werden zu lassen. Auf jede der gekühlten Platten wurden 4 Nylonfilter (Biodyn A, Pall) der Größe 10.5 x 10.5 cm aufgelegt. Diese wurden mit einer tintegetränkten Kanüle durchstoßen, um die Position der Filter auf den Platten zu markieren. Der erste Filtersatz

wurde nach 2 min abgezogen, und nacheinander je 5 min auf Filterpapier (Whatman, 3MM) gelegt, das mit Denaturierungslösung (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) bzw. Neutralisierungslösung (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.0) getränkt war. Es wurden drei weitere Filtersätze abgezogen, die jeweils für 3, 4 und 5 min auf die Platten gelegt wurden. Die Filter wurden mit 3 x SSC gewaschen, um anhaftende Bakterien und Agarosereste zu entfernen, anschließend getrocknet und zur Fixierung der DNA für 2 h bei 80 °C gebacken. Die Hybridisierung der Filterabzüge der Phagenbibliothek erfolgte wie in 2.2.8.3 beschrieben, allerdings enthielt die Hybridisierungslösung kein PEG und aufgrund der Größe der Filter wurde in Haushaltsdosen aus Kunststoff hybridisiert. Vor der Prähybridisierung wurden die Filter 1 h mit 4 x SSC, 0.5% SDS bei 65 °C im Schüttelwasserbad gewaschen, um etwaige Agarosereste abzuwaschen. Je nach Anzahl der zu hybridisierenden Filter wurden zwischen 100 und 300 ml Hybridisierungslösung verwendet und die entsprechende Menge an radioaktiv markierter Sonde. Die Autoradiogramme wurden mit den NZY-Platten verglichen und die Plaques, die ein positives Hybridisierungssignal zeigten, wurden identifiziert und mit einer Pasteurpipette ausgestochen. Das Agarosestück wurde in 1 ml SM, 10 µl Chloroform überführt und bei 4 °C gelagert. Lagen die Plaques nicht sichtbar einzeln vor, wurden Verdünnungen der Phagensuspension auf 25 ml NZY-Platten ausplattiert, neue Filterabzüge (Rundfilter Biodyn A, Pall) hergestellt und mit derselben Sonde hybridisiert. Die positiven vereinzelt Plaques wurden anschließend isoliert.

Zur langfristigen Lagerung der vereinzelt Phagen wurden Stammkulturen hergestellt. Dabei wurden mit 20 µl der Phagensuspension 100 µl des Bakterienstammes XL1-Blue MRA vermengt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml LM-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0.2% Maltose zugegeben und das Gemisch über Nacht bei 250 rpm und 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 µl Chloroform zugegeben, die Kultur 10 min geschüttelt (275 rpm) und die Bakterien 15 min bei 850 g pelletiert. 1 ml des Überstandes wurde mit 50 µl Chloroform vermischt und bei 4 °C gelagert.

2.2.8.3 Geordnetes Ausplattieren von Phagenklonen

Etwa 100 µl einer phagensensitiven Bakteriensuspension des Wirtsstammes (XL1-Blue MRA) wurden mit 4 ml Softtop vermischt und auf kleine NZY-Platten verteilt. Aus den Phagen-Stammkulturen wurden Phagen mit einem Zahnstocher auf die Platte übertragen. So wurden etwa 60 verschiedene Phagen auf eine NZY-Platte geordnet übertragen. Nach

der Inkubation über Nacht bei 37 °C waren Phagenplaques auf dem Bakterienrasen sichtbar. Von den Platten wurden jeweils vier Filterabzüge hergestellt (2.2.10.4) und diese für weitere Hybridisierungen verwendet.

2.2.9 cDNA- und genomische-Bibliotheken

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei cDNA-Bibliotheken aus menschlichem fötalem Hirn der Firma Clontech, Craniofazial und eine genomische-Bibliothek aus Lebern 8 Wochen alter Mäuse der Firma Stratagene verwendet. In der cDNA-Bibliothek von Clontech liegen die cDNA-Inserts in dem Phagenvektor λ gt10 vor und als Wirtsstamm wurde LE392 verwendet. In der genomischen-Bibliothek von Stratagene liegen die Inserte im Lambda FIX II Vektor vor und als Wirtsstamm wurde XL1-Blue MRA verwendet. Das Vorgehen entsprach der für die Phagenbibliothek in 2.2.10.4. beschriebenen Methode.

2.2.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von PCR-Produkten, Plasmid-DNA und PAC-DNA wurde von Diane von Holtum, Stephanie Groß, Martina Klutz und mir selbst an dem „A377 Sequencer“ der Firma Applied Biosystems (ABI) durchgeführt. Dabei wurden fluoreszenzmarkierte Terminatoren im *PrismTM BigDyeTM TerminatorCycle Sequencing ReadyReactionKit* von ABI nach den Angaben des Herstellers verwendet. Plasmid-Inserts wurden mit den jeweiligen vektorspezifischen Primern M13 *sequencing* 17mer, M13 *reverse* 17mer, M13 *reverse* 24mer (Boehringer); T3 17mer und T7 17mer (Stratagene) bei einer Annealing-Temperatur von 45 °C sequenziert.

In einer 20 μ l Sequenzreaktion wurden 8 μ l Terminator Ready Reaktion Mix BigDye, 3.2pmol Primer, und als Template 200-500ng PAC-, Phagen-DNA eingesetzt. Die PCR-Produkte und Plasmid Klone wurden in 10 μ l Reaktionen mit 2 μ l BigDye, 5pmol Primer, und 30-90 ng PCR-Produkt oder 50-100ng Plasmid-DNA angesetzt. Die Reaktionszeiten waren wie folgt: Nach einer initialen Denaturierung von 5 min bei 94 °C folgten 35 Zyklen aus je 15 sec Denaturierung bei 95 °C, 15 sec Annealing und 30 sec Elongation bei 72 °C und anschließend eine verlängerte Syntheseperiode von 7 min bei 72 °C. Die Annealingtemperatur richtete sich nach der Zusammensetzung der in einer PCR-Reaktion kombinierten Primer. Die PCR-Reaktionen wurden mit ultrareinem Wasser (Merck) auf 100 μ l verdünnt, nach der Zugabe von 2 μ l Dextranblau (20mg/ml), 10 μ l 3M Natriumacetat,

und 250µl Ethanol abs. wurde kurz gevortext und 15min bei 14000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde 3 mal mit 70% Ethanol gewaschen und im Dunkeln getrocknet. Anschliessend wurden die Proben in 4µl (PACs in 1.5µl) Ladepuffer (für 36 Proben, 200µl Formamid, 40µl 25mM EDTA) aufgenommen, für 2min bei 90 °C erhitzt und bis zum Auftragen auf Eis gestellt.

Die Sequenzierreaktionen für die Sequenzen bis 500 bp wurden auf kurze Gele (36 cm), und für Sequenzen bis 750bp auf lange Gele (48cm) aufgetragen. Die 36cm langen Sequenziergele wurden aus 18g Harnstoff, 7.5ml 30% Acrylamid Lösung, 6ml 10xTBE und 23ml dd H₂O zusammengesetzt und die 48cm lange Sequenziergele aus 21g Harnstoff, 7.1ml 30% Acrylamid Lösung, 6ml 10xTBE und 21ml dd- H₂O. Nach der Entgasung der Lösung wurde 20µl TEMED und 350µl 10%-ige Ammoniumpersulfat zugegeben und zwischen zwei Gelplatten gegossen. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Sequenzanalyseprogramm MICROGENIE Version 7.0 (Beckman) und mit dem Programm DNASTar. Die Sequenzähnlichkeiten wurden mit dem Programm DNASTar bestimmt. Die Suche nach Sequenzhomologien erfolgte in DNA- und Proteindatenbanken (EMBL-*GenBank*).

2.2.11 SSCP (Single-Strand Conformation-Polymorphism) Analyse

Einzelsträngige DNA (ssDNA) bildet unter renaturierenden Bedingungen nicht vorhersehbare, intramolekulare Sekundärstrukturen, die durch die Sequenz festgelegt werden. Da in einem mutiertem Allel eine andere Sequenz vorliegt, wird dieses Allel bei der Renaturierung auch eine andere Konformation einnehmen. Bei der SSCP-Analyse wird daher das PCR-Produkt nach Amplifikation denaturiert und sofort auf ein renaturierendes Gel aufgetragen. Die mutanten Allele machen sich durch einen Band-Shift bemerkbar. Die Mutationen bzw. Polymorphismen werden dadurch erkannt, aber nicht charakterisiert. Die renaturierenden Polyacrylamidgele setzten sich aus 9% Polyacrylamid (49/1), 0.6x TBE Puffer, 10% (v/v) Glycerol (Merck) oder 10% (w/w) Sucrose zusammen (für 4 Gele: 56.25 ml Acrylamid 40%, 22.5 ml Bisacrylamid 2%, 15.0 ml TBE, 28.7 ml Glycerol 87%, ad 250 ml Ampuwa, 1500 µl Ammoniumpersulfat, 150µl Temed) und wurden senkrecht zwischen Glassplatten der Firma Pharmacia Biotech (2x Glassplatten 18x24 cm Code Nr. 80-6190-01, 1x Trennplatte 18x24 Code Nr. 80-6190-20) gegossen. Zu 3µl PCR Produkt wurde 3µl Denaturierungspuffer (deionisiertes Formamid, 0.025% Xylene Cyanol) gegeben und kurz vor dem Laden 2 min bei 90 °C denaturiert und sofort auf Trockeneis/Isopropanol

abgekühlt. Nachdem die Proben auf das Gel geladen sind, wird die Elektrophorese in einer Kammer mit 0.6x TBE, zuerst 30 min bei 50V, dann bei 200-300V mindestens 16h bei 4 °C durchgeführt. Die Gele werden 2x in 10% (v/v) Ethanol, 0.5% (v/v) Essigsäure gewaschen mit deionisiertem Wasser gespült und für 20 min in 0.2% (w/v) AgNO₃ gefärbt. Zuletzt werden die Gele in 1.5% (w/v) NaOH, 0.4% (v/v) Formaldehyd entwickelt und schließlich fotografiert.

2.2.12 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki et al., 1985) wird für die Vervielfältigung (Amplifikation) von spezifischen DNA-Fragmenten eingesetzt. Ausgehend von einer geringen Menge an DNA können hohe Konzentrationen der Ziel-DNA produziert werden. Die Reaktionen wurden mit Hilfe der thermostabilen *AmpliTaq*-Polymerase von Perkin Elmer in dem „PCR 9600 System“ oder „PCR 2400 und 9700 System“ derselben Firma durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Komplexität wurden von genomischer DNA 100 ng, von Hefe-DNA 50 ng und von Phagen- und Plasmid-DNA je 1 pg in einer 50 µl-Reaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt außerdem 2,5 Units *AmpliTaq*-Polymerase, je 0,2 bis 1 µM Primer, 200 µM dNTPs und 1 x Reaktionspuffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1,5 mM MgCl₂, 0,001% Gelatine). Die Reaktionszeiten waren wie folgt: Nach einer initialen Denaturierung von 5 min bei 94 °C folgten 35 Zyklen aus je 15 sec Denaturierung bei 95 °C, 15 sec Annealing und 30 sec Elongation bei 72 °C und anschließend eine verlängerte Syntheseperiode von 7 min bei 72 °C. Die Annealingtemperatur richtete sich nach der Zusammensetzung der in einer PCR-Reaktion kombinierten Primer.

2.2.12.1 Reverse Transkription und Amplifikation der cDNA (RT-PCR)

Die RNA aus verschiedenen menschlichen Geweben wurde mit Hilfe von *random* Hexameren revers transkribiert und die entstandene cDNA mit den jeweiligen spezifischen Primern amplifiziert (Wang et al., 1989). Die verwendeten Reagenzien stammten aus dem „*GeneAmp* RNA PCR Kit“ der Firma Perkin Elmer. Die RNA aus fötalem Gehirn wurde von der Firma Clontech bezogen. Die RNA von Maus ES Zellen wurde von Holger Karzunki (Abt. Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Die RNA aus peripheren Leukozyten oder lymphoblastoiden Zelllinien von TRPS-Patienten, hat Dr. H. J. Lüdecke präpariert.

Der Reaktionsansatz für die Transkription war in einem Endvolumen von 20 µl folgendermaßen: 125 ng RNA, 5 mM MgCl₂, je 1 mM dNTPs, 1 Unit/µl RNase Inhibitor, 2.5 Units/µl reverse Transkriptase, 2.5 µM *random* Hexamere, 1 x PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3). Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und die RNA anschließend im PCR System 9700 in drei Schritten revers transkribiert: 15 min 42 °C, 5 min 99 °C und 5 min 5 °C. Zu dem Ansatz wurden 4 µl 25 mM MgCl₂, 8 µl 10x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3), 5 Units *AmpliTaq*-Polymerase, je 0,2 µM der spezifischen Primer (Tab. 2.3) und H₂O bis zu einem Endvolumen von 100 µl hinzugegeben und die cDNA im PCR System 9700 amplifiziert. Die Reaktionszeiten waren wie unter 2.2.14 beschrieben. Zur Kontrolle auf eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA wurde ein Reaktionsansatz ohne reverse Transkriptase durchgeführt und zur Kontrolle auf eine Kontamination der Reaktionslösungen wurde ein zweiter Ansatz ohne RNA und reverse Transkriptase durchgeführt.

2.2.12.2 Amplifikation von 3' und 5' cDNA-Enden (3'- bzw. 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 (Frohmann et al., 1988; Ohara et al., 1989; Loh et al., 1989). Zunächst wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und an die Enden jeweils eine Adaptersequenz angehängt. Dadurch können die Enden der mRNA in einer PCR mit einem spezifischen Primer für den Adapter und einem genspezifischen Primer amplifiziert werden. Für die beide 3'- und 5'-RACE wurde ein (Marathon-ReadyTM cDNA) der Firma Clontech verwendet. Dieses beinhaltet humane cDNA (Marathon-ReadyTM cDNA), die an RNA aus fötalem Hirn hergestellt wurde. Nach dem Protokoll der Hersteller setzte sich ein Reaktionsansatz von 50 µl wie folgt zusammen: 5 µl der Marathon-ReadyTM cDNA (0.1 ng/µl), 1 µl des Adapter-Primers AP (10 µM), 1 µl des genspezifischen Primers (10 µM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl Advantage cDNA Polymerase Mix (50fach; enthält *KlenTaq*-1 DNA Polymerase, eine Polymerase für die 3'→5' Proofreading Aktivität und TaqStart Antikörper für HotStart PCR)(Advantage cDNA PCR Kit, Cat # K1905-y, Lot #9040738 oder Advantage-GC cDNA PCR Kit, Cat # K1907-y, Lot # 9030515, Clontech), 5 µl 10 x cDNA PCR-Puffer und 36 µl H₂O. Nach einer initialen Denaturierung (30 sec 94 °C) folgten 5 Zyklen aus je 5 sec Denaturierung bei 94 °C und 4 min Annealing und Synthese

bei 72 °C; 5 Zyklen aus je 5 sec Denaturierung bei 94 °C und 4 min Annealing und Synthese bei 70 °C und 25 Zyklen aus je 5 sec Denaturierung bei 94 °C und 4 min Annealing und Synthese bei 68 °C. Als Kontrolle wurde eine Reaktion in Abwesenheit des AP-Primers durchgeführt. Dadurch sollte festgestellt werden, ob der AP-Primer unspezifisch an die cDNA bindet.

2.2.13 Primer für spezifische Amplifikationen

Die Primer wurden mit Hilfe des OligoTM-Programms (version 4.1, National Bioscience) oder des on-line Programms PRIMER3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi/>) ausgesucht. Sie sollten hochspezifisch für die Zielsequenz sein und keine Dimere mit sich und mit dem anderen PCR-Primer bilden.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Transkripte in der minimalen TRPS Region

Das Contig mit den PAC Klonen 8-7 (Abb.1.2) wurde in Jena vollständig sequenziert. Erste Computeranalysen der PAC Sequenzen deuteten darauf hin, daß das 600 kb Contig eine geringe Anzahl vorhergesagter Exons beinhaltet bzw. die Region sehr genarm ist. Der PAC8 Klon, der am proximalen Ende des Contigs liegt, wurde aus folgenden Gründen genauer analysiert: 1) der 145,388 kb Klon beinhaltet 107 vorhergesagte Exons, fünf davon sind von mehreren Computerprogrammen vorhergesagt worden, 2) PAC8 beinhaltet 3 CpG Inseln, 3) Ein Teil der Deletion der Patientin JJ ist auf PAC 8 lokalisiert.

3.1.1 Charakterisierung der putativen Exons in PAC 8

Die 145,388 kb Sequenz von PAC 8 wurde uns für die Analyse zur Verfügung gestellt. Die Sequenz wurde mit dem RUMMAGE-DP Programmpaket (Glöckner et al., 1998) analysiert (Abb. 3.1). Das RUMMAGE-DP Programm beinhaltet 26 Programme, die zur Vorhersage von repetitiven Elementen, Exons, Proteinmotiven und der Homologiesuche in Datenbanken dienen. Von 107 vorhergesagten Exons wurden 31 ausführlich analysiert. Die ausgesuchten putativen Exons lagen nicht in *Alu*- oder anderen Repeat-Regionen und sollten möglichst von mehreren Programmen vorhergesagt worden sein, zu einer Gengruppe (*Cluster*) gehören und Proteinmotive beinhalten (Abb. 3.1). Für die 31 Exons wurden jeweils Primerpaare aus den flankierenden Introns ausgesucht (Tabelle 7.1). Um für jedes Exon eine Sonde zu entwickeln, wurde mit diesen Primern an der PAC8-DNA PCRs durchgeführt. Die Qualität der Sonden wurde auf Southern Blots getestet, die mit *EcoRI* und *HindIII* restringierte menschliche genomische DNA enthielten.

3.1.1.1 Untersuchung der evolutionären Konservierung von PAC8 Exons

Exprimierte oder regulatorische DNA-Sequenzen sind häufig zwischen verschiedenen Spezies homolog, d.h. sie sind evolutionär konserviert. Die 31 PAC8-Sonden wurden mit

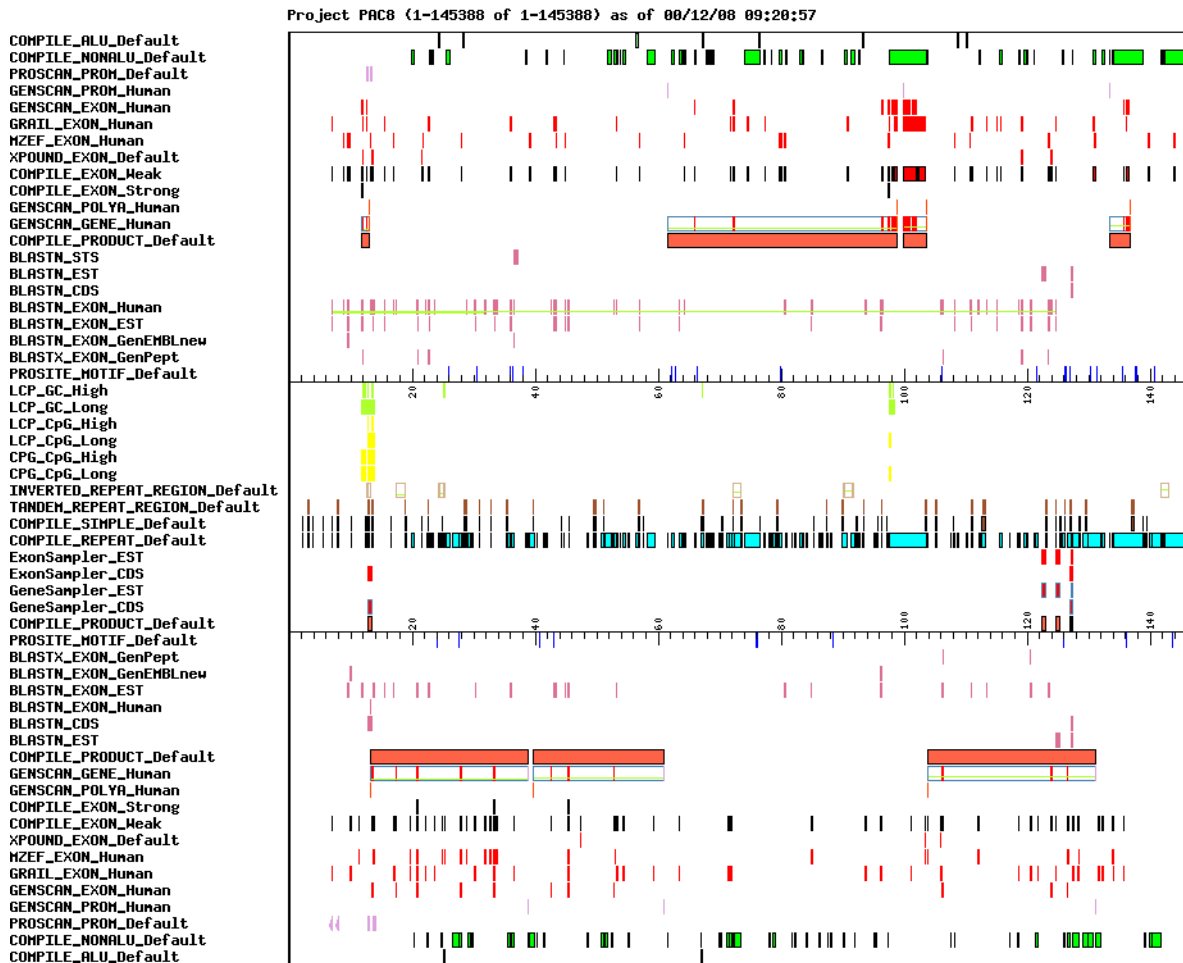


Abb. 3.1: Die grafische Darstellung der RUMMAGE Analyse des PAC 8 Contigs. Das obere und untere Teil zeigen plus und minus Strang. Das mittlere Teil stellt die Strang-unabhängigen Parameter wie CpG Inseln dar. Jeder Strang wird mit den entsprechenden Such-Programmen nach Repeat-, Promotor- und Exonstrukturen gesucht. Außerdem wird in der Datenbank nach ESTs und bekannten Motiven gesucht. Die Treffer jedes Suchprogramms werden in Form von einem Viereck dargestellt.

Southern Blots hybridisiert, die mit *Hind*III bzw. *Eco*RI restringierte DNA verschiedener Säuger enthielten (Zoo Blots). Die evolutionäre Konservierung von PAC8-Exon8 und PAC8-Exon9 ist auf der Abbildung 3.2 zu sehen. Elf Exons waren in 5 verschiedenen Spezies konserviert (Tabelle 3.1).

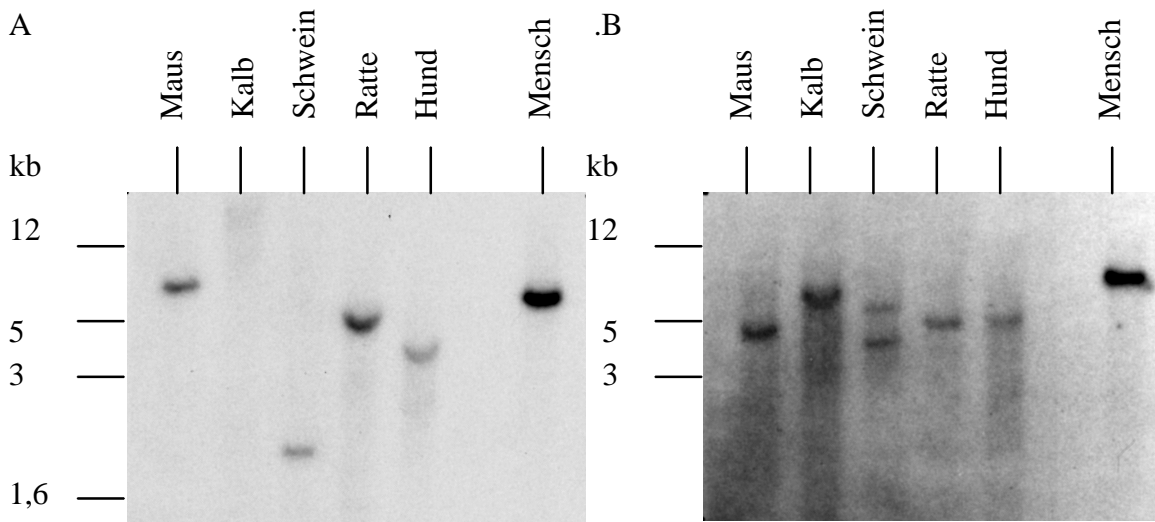


Abb. 3.2: Evolutionäre Konservierung der Einzel-Kopie-Exons 8 und 9 , die 517 bp von einander entfernt sind. Die DNA verschiedener Säugetiere (Maus, Kalb, Schwein, Ratte, Hund und Mensch) wurde mit *HindIII* (A) bzw. *EcoRI* (B) restringiert, auf 0.7%igen Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembran immobilisiert und mit den Sonden Exon 8 und Exon 9 aus dem PAC 8 hybridisiert. A) PAC8-Exon8 B) PAC8-Exon9. Blots wurden mit einer Stringenz von 2 x SSC/0.1% SDS für 15 min bei 65 °C gewaschen. Als Größenstandard diente 1 kb DNA Leiter.

Tabelle 3.1: (siehe nächste Seite) PAC8 Exons Analyse. Für jedes Exon wurde ein Amplimer entwickelt, das gegen Blots mit *EcoRI*- bzw. *HindIII*-verdauter menschlicher genomischer DNA und *HindIII*-verdaute Zooblots hybridisiert wurde. Im Fall von Exon 9 konnte nur mit *EcoRI*-verdaute DNA ein Signal detektiert werden. Die Größe der hybridisierenden Fragmente ist in der Spalte, Southern Blot Fragment, angegeben. Zugehörigkeit zu einem Gengruppe und die Unterscheidung der Exonstärke, bezieht sich auf die Computer Analyse. Ein Minuszeichen in der Northern Blot Spalte deutet darauf hin, daß keine Signale auf dem Blot zu erkennen waren. rep.: repetitive.

Tabelle 3.1: Analyse putativer Exons aus PAC8

Exon	Primer	Fragment Länge[bp]	Exon Länge [bp]	stark/schwach	Gen-gruppe	Southern Blot Fragment [kb]	Northern Blot	EST
2	PM59 PM60	258	78	schwach	-	Hund: 3,5 Mensch: <i>HindIII</i> 5 <i>EcoRI</i> 12		
3	PM57 PM58	248	66	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 4,4 <i>EcoRI</i> 23		
8	PM13 PM14	298	204	stark	+	Maus: 9,6 Kalb: 14 Schwein: 2,2 Ratte: 6,6 Hund: 5 Mensch: <i>HindIII</i> 9,5	Human adult Herz, Plazenta, Lunge, Leber, skel. Muskel, Niere, Pankreas 5 kb Mausembryo -	AA 958752 Maus Brustdrüse
9	PM31 PM32	323	150	schwach	+	Mause: 5,5 Kalb: 8 Schwein: 7/5 Ratte: 6 Hund: 6 Mensch: 10	Human adult Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, skel. Muskel, Niere, Pankreas 2,5/ 5/ 7/ 7,5/ 9,5/ 12 kb	
14	PM35 PM36	288	92	schwach	+	Maus: 9 Rat: 6,6 Hund: 2,5 Mensch: <i>HindIII</i> 6,6/ 23	Human adult - Mausembryo -	AA 763386 Maus Brustdrüse
17	PM37 PM38	278	68	schwach	+	Ratte: 8 Hund: 2,3 Mensch: <i>HindIII</i> 8		
18	PM1 PM2	238	58	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 12		
19	PM39 PM40		174	stark	+	Ratte : 3,2 Hund: 1.8 Mensch: <i>HindIII</i> 10		
22	PM41 PM42	171	76	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 8 <i>EcoRI</i> 9,6/ 2,8		
23	PM21 PM22	230	139	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 9,6		
24	PM43 PM44	201	63	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 7		
27	PM3 PM4	253	153	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 2,9		
31	PM23 PM24	216	139	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 3 <i>EcoRI</i> 6,6		

Tabelle 3.1: (Fortsetzung) Analyse putativer Exons aus PAC8

Exon	Primer	Fragment Länge[bp]	Exon Länge [bp]	stark/schwach	Gen-gruppe	Southern Blot Fragment [kb]	Northern Blot	EST
34	PM5 PM6	273	133	stark	+	Mensch: <i>HindIII</i> 2,3 <i>EcoRI</i> 3		
45	PM15 PM16	372	197	schwach	-	Hund: 1,6 Mensch: <i>HindIII</i> 3,5		
48	PM17 PM18	379	260	schwach	-	Maus: 9,6/2,3 Kalb: 4 Schwein: 6,6 Ratte: 2,3 Hund: 3,5 Mensch: <i>HindIII</i> 3,5	Human adult - Mausembryo -	
49	PM45 PM46	326	189	schwach	+	Maus: rep Kalb: 4 Schwein: 5 Ratte: rep Hund: rep Mensch: <i>HindIII</i> 22/3,5 <i>EcoRI</i> 23		
59	PM47 PM48	231	57	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 9,6/ 5		
60- 61	PM25 PM26	527	67+195	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 5,5/1,3 <i>EcoRI</i> 3		
64- 65	PM9 PM10	658	93+184	schwach	-	Maus:, Ratte: Hund: rep. Mensch: <i>HindIII</i> 4,4		
68	PM49 PM50	155	89	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 4,5 <i>EcoRI</i> 23		
75	PM11 PM12	256	137	stark	-	Mensch: <i>HindIII</i> 6,6		
78- 79	PM27 PM28	652	137+168	schwach	+	Maus: 9,6 Schwein: 3 Hund: 4,4 Mensch: <i>HindIII</i> 5,5 <i>EcoRI</i> 2,5	Human adult - Mausembryo -	
87	PM51 PM52	289	184	schwach	+	Mensch: <i>HindIII</i> 4,8 <i>EcoRI</i> 3,5		AA 721004 NCI-CGAP-SS1 Homo sapiens cDNA

Tabelle 3.1: (Fortsetzung) Analyse putativer Exons aus PAC8

Exon	Primer	Fragment Länge[bp]	Exon Länge [bp]	stark/schwach	Gen-gruppe	Southern Blot Fragment [kb]	Northern Blot	EST
90	PM53 PM53	343	241	schwach	+	Kalb: 6 Ratte: 4 Mensch: <i>HindIII</i> 4	Human adult - Mausembryo -	
93- 94- 95	PM29 PM30	797	131 +58 +223	schwach	+	Maus: 15 Kalb: 4 Schwein: 4,5 Ratte: 6,5 Hund: 6,5 Mensch: <i>HindIII</i> 5	Human adult - Mausembryo -	AA 893238 Ratten Niere

3.1.1.2 Expressionsanalyse von PAC 8 Exons mit Northern Blot und RT-PCR

Um zu überprüfen, ob die elf evolutionär konservierten Sequenzen tatsächlich exprimierte Exons sind, wurden sie mit handelsüblichen Northern Blots der Firma Clontech, die RNA aus multiplen menschlichen fötalen und adulten Geweben und embryonalen Maus-Geweben repräsentieren, hybridisiert. Dabei wurde bei Exon 8 ein 5 kb Transkript ausschließlich in RNA aus adulten Gewebe identifiziert (Abb. 3.3 A). Bei Exon 9 zeigte sich ein komplexes Muster von multiplen Banden, darunter auch ein 5 kb Transkript wie bei Exon8 (Abb. 3.3 B). Die Exons konnten nicht durch PCR an cDNA aus verschiedenen Geweben (siehe 2.1.8 QUICK-screen human cDNA library) miteinander verbunden werden.

Durch PCR am cDNA-Panel der Firma Clontech (Material 2.1.8), wurde versucht, die Exons, die vermutlich zu einem Gen gehören, miteinander zu verbinden (Tabelle 7.2). PCR an Plazenta cDNA mit den Primern B4F7L107 in Exon 19 und PM6E34nesL in Exon 34 ergab ein 232 bp umfassendes PCR Produkt. Die Primer PM1E18U und PM6E34nesL amplifizierten an Plazenta cDNA ein 365 bp PCR Produkt. Durch Reamplifikationen und weitere Untersuchungen wie Southern Blot-Analyse und Sequenzierung stellten sich die Produkte als Artefakt heraus. Die Untersuchung der PAC8 Exons wurde in diesem Stadium nicht weiter verfolgt, weil die Datenbankanalyse der Sequenzen von proximal gelegenen PAC-Klonen (PACs 22 und 24) diese als bessere Kandidaten für das *TRPS1* Gen auswies.

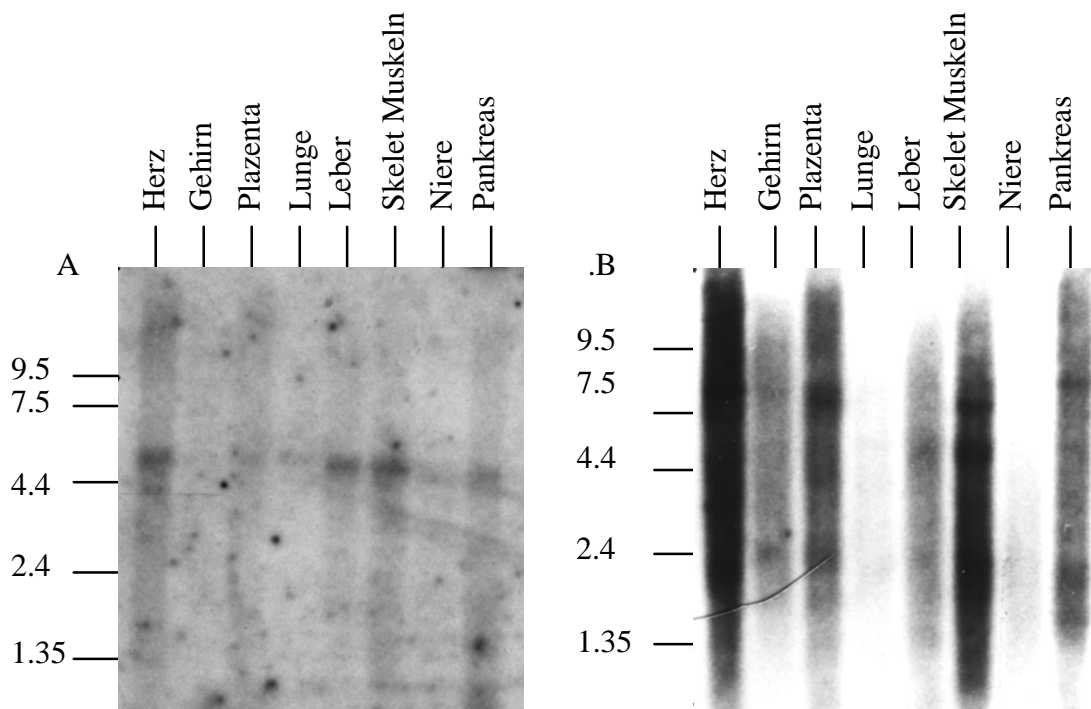


Abb. 3.3: Expressionsmuster der PAC8 Exons. Northern Blots der Firma Clontech mit RNA aus den adulten Geweben wurden mit den PAC8Exon8 (A) und PAC8Exon9 (B) Sonden hybridisiert. Die Blots wurden bei einer Stringenz von 3x SSC/0.1% SDS, für 10 min bei 50°C gewaschen und 11 (A) bzw. 9 (B) Tage exponiert.

3.1.2 Identifizierung des *TRPS1*-Gens

Da der Translokationsbruchpunkt und der Inversionsbruchpunkt von zwei Patientinnen mit *TRPS1*, KS2166 und HB11480 (Abb. 3.10) proximal vom PAC8-7 Contig liegen, wurde diese Region in die Gensuche einbezogen. Zunächst wurde PAC-Klon 24 mit dem proximalen PAC 8 Ende isoliert. PAC22 wurde mit Hilfe des Markers D8S98 isoliert. Die Lücke zwischen PAC22 und PAC24 wurde mit PAC30 geschlossen.

3.1.2.1 Isolierung eines 1059 bp Leserahmens in PAC 22

BlastX Datenbank Homologiesuche mit einem Contig von PAC22 Sequenz ergab einen offenen Leserahmen (ORF) von 1059 bp, der für zwei Zinkfinger-Domänen vom C₂H₂-Typ kodiert, die am Ende des ORFs liegen. Der ORF beginnt nach einem Spleiß-Akzeptor und endet mit drei in Leseraster liegenden Stop Kodons ohne Spleiß-Donor Stelle am 3'Ende. Die Zinkfinger-Domäne hatte 285 Treffer in BlastX Homologiesuche in Datenbank, mit höchster Ähnlichkeit zur C-terminalen Zinkfinger Domäne der IKAROS Transkriptions

Faktor Familie, die eine Protein bindende Funktion haben (Momeni et al., 2000). Die Zinkfinger Domänen des ORFs haben 52% Identität mit den Zinkfingern des menschlichen IKAROS und 38% mit denen der Maus (Abb. 3.4). Außerdem beinhaltet die Aminosäuresequenz ein basisches Motiv, RRRTRKR, das hohe Ähnlichkeit zu einem Kernlokalisierungssignal (NLS, *Nuclear Localization Signal*) hat (Boulikas, 1994). Für die Bestimmung der Transkriptgröße wurden zwei Sonden entwickelt, die Sonde PM63-62 an der 5' Seite der Zinkfinger Domäne und PM67-66, die Zinkfinger-kodierende Region beinhaltet (Tabelle 7.3). Hybridisierung mit den Northern Blots aus fötalen Geweben zeigten zwei Transkripte von 7 und 10,5 kb in Gehirn, Lunge und Niere, aber nicht in Leber (Abb. 3.6 A). Zur Kontrolle der Qualität und Mengenverhältnisse der RNA-Spuren wurden die Blots mit der Sonde HERC2 (Ji Y. et al, 1999) hybridisiert (Abb. 3.6 C).

Häufigste aa		C E H C R V L F L D H V M Y T I H M G C H G F R D P																									
		10										20															
TRPS1 H. sapiens	1	C	V	H	C	G	I	V	F	L	D	E	V	M	Y	A	L	H	M	S	C	H	G	D	S	G	P
Trps1 M. musculus	1	E	V	H	C	G	I	V	F	L	D	E	V	M	Y	A	L	H	M	S	C	H	G	D	S	G	P
IKAROS H. Sapiens	1	C	E	H	C	R	V	L	F	L	D	H	V	M	Y	T	I	H	M	G	C	H	G	F	R	D	P
Ikaros M. musculus	1	C	E	H	C	R	V	L	F	L	D	H	V	M	Y	T	I	H	M	G	C	H	G	F	R	D	P
ikaros P. marinus	1	C	E	H	C	R	V	L	F	L	D	H	V	M	Y	T	I	H	M	G	C	H	G	F	R	D	P
ikaros-like T. rubripes	1	C	L	H	E	H	I	L	F	L	D	H	V	M	F	T	I	H	M	G	C	H	G	F	H	Q	F
Helios H. sapiens	1	C	L	H	E	Q	V	I	F	L	D	H	V	M	Y	T	L	H	M	G	C	H	G	F	R	D	P
Helios M. musculus	1	C	E	H	C	R	V	L	F	L	D	H	V	M	Y	T	I	H	M	G	C	H	G	Y	R	D	P
helios R. eglanteria	1	C	E	H	C	R	V	L	F	L	D	H	V	M	Y	T	I	H	M	G	C	H	G	Y	R	D	P
Aiolos M. musculus	1	E	E	H	C	R	V	L	F	L	D	H	V	M	Y	T	I	H	M	G	C	H	G	F	R	D	P
Eos M. musculus	1	E	D	H	C	H	V	L	F	L	D	Y	V	M	F	T	I	H	M	G	C	H	G	F	R	D	P
hunchback D. melanogaster	1	C	E	H	C	R	I	L	F	L	D	H	V	M	F	T	I	H	M	G	C	H	G	F	R	D	P
hunchback D. sechellia	1	C	K	Y	C	D	I	F	F	K	D	A	V	L	Y	T	I	H	M	G	Y	H	S	C	D	D	V
Spalt-Major D. melanogaster	1	C	K	Y	E	D	I	F	F	K	D	A	V	L	Y	T	I	H	M	G	Y	H	S	C	D	D	V
Spalt-Major D. virilis	1	C	Q	Y	E	N	I	A	E	G	D	A	V	L	Y	T	I	H	M	G	Y	H	G	F	H	N	E

Häufigste aa		F E C N I C G Y R S Q D R Y E F S S H I A R G E H																													
		30										40										50									
TRPS1 H. sapiens	27	F	Q	C	S	I	C	Q	H	L	C	T	D	K	Y	D	F	T	T	H	I	Q	R	G	L	H					
Trps1 M. musculus	27	F	Q	C	S	I	C	Q	H	L	C	T	D	K	Y	D	F	T	T	H	I	Q	R	G	L	H					
IKAROS H. Sapiens	27	F	E	C	N	M	E	G	Y	H	S	Q	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	T	R	G	E	H					
Ikaros M. musculus	27	F	E	C	N	M	E	G	Y	H	S	Q	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	T	R	G	E	H					
ikaros P. marinus	27	F	E	C	N	M	E	G	Y	H	S	Q	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	T	R	G	E	H					
ikaros-like T. rubripes	27	F	E	C	N	I	C	G	Y	S	S	Q	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	S	R	G	E	H					
Helios H. sapiens	27	F	E	E	N	V	C	G	H	R	S	R	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	I	R	G	E	H					
Helios M. musculus	27	L	E	C	N	I	C	G	Y	R	S	Q	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	V	R	G	E	H					
helios R. eglanteria	27	L	E	C	N	I	C	G	Y	R	S	Q	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	V	R	G	E	H					
Aiolos M. musculus	27	F	E	C	N	I	C	G	Y	R	S	H	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	V	R	G	E	H					
Eos M. musculus	27	F	E	C	N	M	E	G	Y	R	S	H	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	A	R	G	E	H					
hunchback D. melanogaster	27	F	E	C	N	I	C	G	Y	H	S	Q	D	R	Y	E	F	S	S	H	I	V	R	G	E	H					
hunchback D. sechellia	27	F	K	C	N	M	E	G	E	K	C	D	G	P	V	G	L	F	V	H	M	A	R	N	A	H					
Spalt-Major D. melanogaster	27	F	K	C	N	M	E	G	E	K	C	D	G	P	V	G	L	F	V	H	M	A	R	N	A	H					
Spalt-Major D. virilis	27	F	T	E	N	M	C	G	V	E	C	S	D	K	V	S	F	F	L	H	I	A	E	V	S	H					

Abb. 3.4: Legende siehe nächste Seite.

Abb. 3.4: Sequenzvergleich der zwei C₂ H₂ Zinkfinger Domänen des 1059 bp ORFs von Mensch und Maus, mit Zinkfinger Domänen aus 13 bekannten Proteinen aus der Datenbank.

3.1.2.2 Isolierung von 123 bp ORF in PAC22

BlastX Datenbank Homologiesuche mit einer Teilsequenz von PAC22 Sequenz ergab einen 123 bp großen ORF mit einer Zinkfinger-Domäne vom C₂C₂ Typ. Dieser ORF ist von Spleiß-Akzeptor und -Donor Stellen flankiert. Die Zinkfinger-Domäne hat 170 Treffer in BlastX Homologiesuche in Datenbank gezeigt mit der höchsten Ähnlichkeit zur DNA-bindenden Domäne der GATA-Transkriptionsfaktorfamilie (Abb.3.5). Um das Expressionsmuster des ORFs zu bestimmen, wurde die Sonde PM64-65 (Tabelle 7.3) entwickelt. Hybridisierung von Northern Blots aus fötalen Geweben zeigten zwei Transkripte von 7 und 10,5 kb in Gehirn, Lunge und Niere, aber nicht in Leber (Abb.3.6). Die beiden Sonden, PM67-66, aus dem 1059 bp ORF, und PM65-64 erkennen gleich große Transkripte in den gleichen Geweben.

Häufigste aa

		C	A	N	C	Q	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	N	G	D	P	V	C	N	A	C
		10										20														
TRPS1 H. sapiens	1	C	A	N	C	L	T	T	K	T	S	L	W	R	K	N	A	N	G	G	Y	W	C	N	A	C
Trps1 M. musculus	1	E	A	N	C	L	T	T	K	T	S	L	W	R	K	N	A	N	G	G	Y	W	C	N	A	C
GATA-2 H. sapiens	1	C	A	N	C	Q	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	N	G	D	P	V	C	N	A	C
GATA-3 H. sapiens	1	C	A	N	C	Q	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	N	G	D	P	V	C	N	A	C
GATA-4 H. sapiens	1	C	A	N	C	Q	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	E	G	E	P	V	C	N	A	C
GATA-6 H. sapiens	1	C	A	N	E	H	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	E	G	E	P	V	E	N	A	C
GATA-2 M. musculus	1	C	A	N	C	Q	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	N	G	D	P	V	C	N	A	C
GATA-4 M. musculus	1	C	A	N	C	Q	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	E	G	E	P	V	C	N	A	C
XGATA-2 X. laevis	1	C	A	N	C	Q	T	S	T	T	T	L	W	R	R	N	A	N	G	D	P	V	C	N	A	C
XGATA-3 X. laevis	1	E	A	N	C	Q	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	N	G	D	P	V	C	N	A	C
GATA-2 G. gallus	1	C	A	N	C	Q	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	N	G	D	P	V	C	N	A	C
GATA-4 G. gallus	1	C	A	N	C	H	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	E	G	E	P	V	C	N	A	C
GATA-C D. melanogaster	1	C	A	N	C	K	T	T	T	T	T	L	W	R	R	N	A	S	G	E	P	V	C	N	A	C
GATA S. pombe	1	C	A	N	E	S	T	K	T	S	L	W	R	K	D	R	H	E	Q	T	V	E	N	A	C	

Abb. 3.5: Sequenzvergleich der zwei C₂C₂ Zinkfinger Domänen des 123 bp ORFs von Mensch und Maus, mit den Zinkfinger Domänen aus 12 bekannten Proteinen aus der Datenbank.

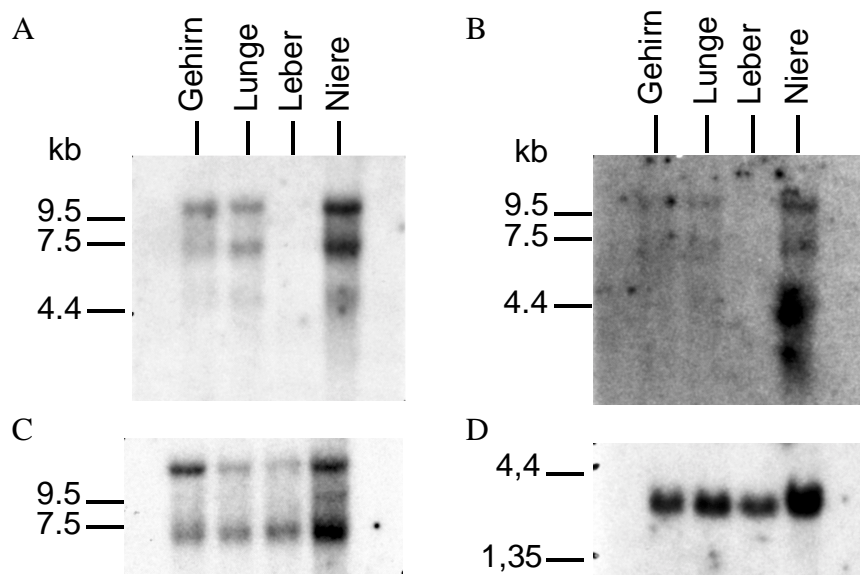


Abb. 3.6: Expressionsmuster der 1059 bp und 123 bp umfassenden ORFs. Northern Blots der Firma Clontech, die 2 μ g poly(A)⁺-RNA aus 4 fötalen Geweben enthalten, wurden mit den radioaktiv markierten Sonden PM67-66 aus dem ORF 1059 bp (A) und PM65-64 aus dem ORF 123 bp (B) über Nacht bei 42°C hybridisiert. Es wurde mit einer Stringenz von 3xSSC/ 0.1% SDS, 50°C für 10 min gewaschen. Die Blots wurden 2 Tage (A) bzw. 4 Tage (B) exponiert. Zur Kontrolle der RNA-Qualität und -Quantität wurden die Blots mit der Sonde HERC2 (Ji, Y., 1999)(Abschnitt C) und β -actin (Abschnitt D) rehybridisiert.

3.1.2.3 RT-PCR mit den Primern PM72 und PM73

Die oben genannten ORFs stammen aus zwei verschiedenen PAC 22-Teilsequenzen. Um zu klären, ob noch weitere ORFs dazwischen liegen, wurde eine RT-PCR mit PM72 (123 bp ORF) und PM73 (1059 bp ORF) (Tabelle 7.4) an RNA aus fötalem Gehirn durchgeführt. Das Produkt war 163 bp groß (Abb.3.7). Das wies darauf hin, daß es zwischen den beiden Exons keine weiteren Exon gibt. Die Verbindung der beiden Exons wurde durch die Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigt.

Abb. 3.7: (nächste Seite) RT-PCR Analyse an RNA aus fötalem Gehirn mit den spezifischen Primern PM72 und PM73. Ein spezifisches Produkt von 163 bp wurde amplifiziert. M) Als Größenstandard diente MspI gespaltene pUC19 DNA. 1) RNA+Reverse Transkriptase, 2) Reverse Transkriptase ohne RNA, 3) RNA ohne Reverse Transkriptase.

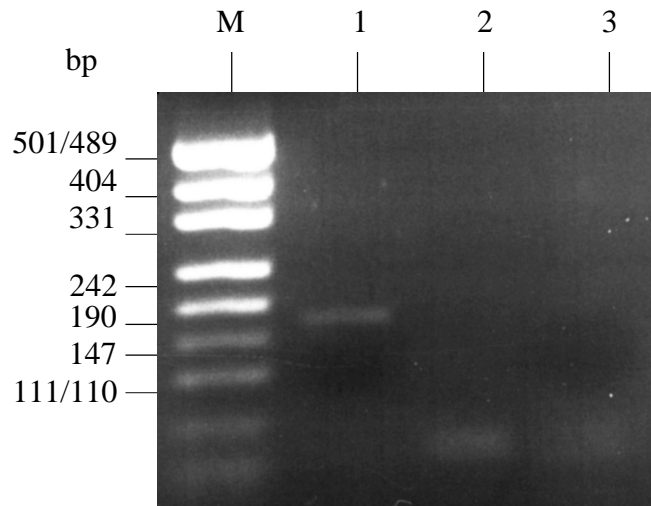


Abb. 3.7: Legende siehe vorherige Seite.

3.1.2.4 Identifizierung der 5' Exons des Transkripts

Um die weitere cDNA Sequenz des Transkriptes bzw. Exons 5' von den identifizierten Exons zu isolieren, wurde eine cDNA Bibliothek aus fötalem Gehirn der Firma Clontech durchgemustert. Auf sechs 21x21 cm NZY Platten wurden insgesamt $1,5 \times 10^6$ Phagen ausplattiert. Die Filter wurden mit der Sonde PM67-66 hybridisiert. Ein positiver Klon wurde isoliert und aufgereinigt. Durch die Hybridisierung mit den Sonden PM67-66 und PM65-64 wurde festgestellt, daß beide vorher identifizierten ORFs in dem Klon vorhanden sind (Abb. 3.9, C2). PCR mit den Vektor spezifischen Primern λ gt-10 U-L am Phagen-Eluat ergab ein 1,43 kb Fragment. Die Sequenz des Klons enthielt 977 bp des 1059 bp ORFs, den kompletten 123 bp-ORF und 247 bp eines neuen ORFs. Es wurden Primerpaare in die neue Sequenz gelegt und an den PAC Klonen 22 und 24 PCR gemacht. Die PCR war für den PAC24 positiv. Das Gen überspannt damit den Inversionsbruchpunkt und den Translokationsbruchpunkt. Deshalb haben wir weitere Teilsequenz aus PAC24 untersucht. Die unbekannte 247 bp Sequenz gehörte zu einem 604 bp ORF mit konservierten Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Stellen. In den gesamten Sequenzen haben wir noch zwei weitere ORFs von 1130 bp und 929 bp mit konservierten Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Stellen gefunden. Evolutionäre Konservierung der 1130 bp und 929 bp Exons wurde durch die Zooblots untersucht (Abb. 3.8).

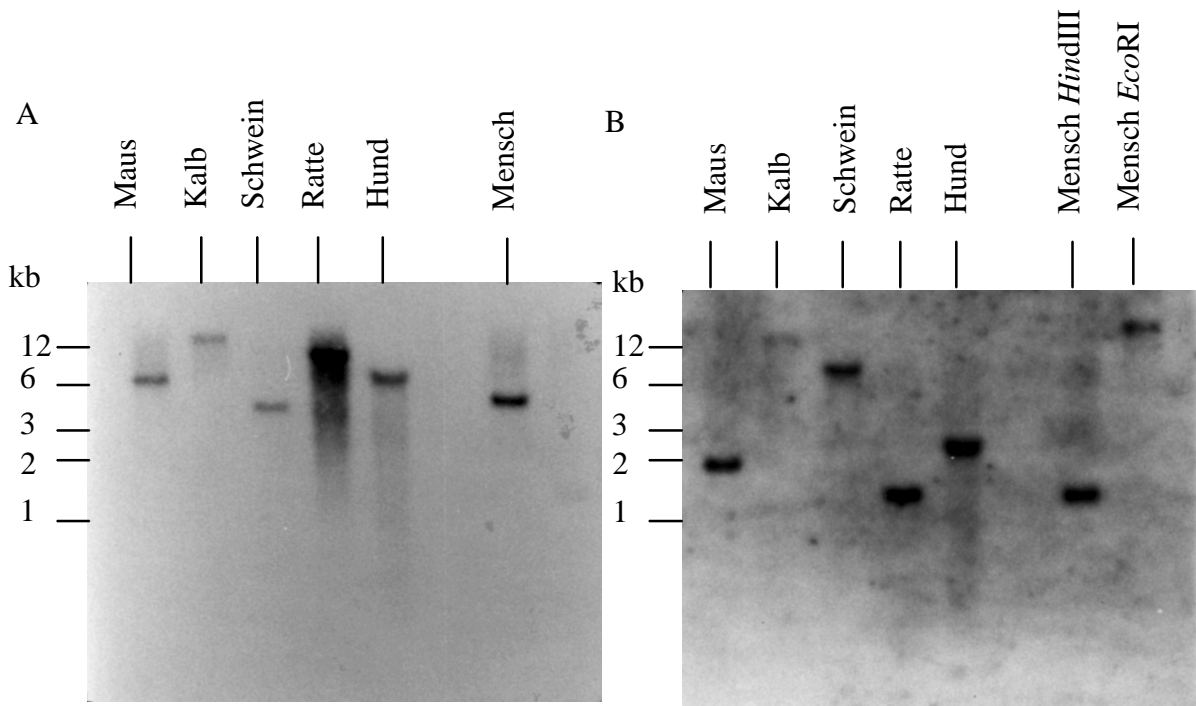


Abbildung 3.8: Evolutionäre Konservierung der Einzelkopie-ORFs mit 929 und 1130 bp. Die DNA verschiedener Säugetiere (Maus, Kalb, Schwein, Ratte, Hund und Mensch) wurde mit *HindIII* bzw. *EcoRI* restringiert, auf 0.8%igen Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembran immobilisiert und mit den Sonden PM89-88 für den 929 bp ORF und PM104-105 für den 1130 bp ORF aus dem PAC 24 hybridisiert. A) PM89-88 B) PM104-105. Blots wurden mit einer Stringenz von $2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$ für 15 min bei 65°C gewaschen. Als Größenstandard diente 1 kb DNA Leiter.

3.1.2.5 Identifizierung des 5' Endes des Transkripts

Die cDNA Bibliothek aus fötalem Gehirn wurde mit der Sonde PM94-91 aus dem 929 bp ORF hybridisiert. Der 1478 bp umfassende isolierte Klon beinhaltete 161 bp des 1130 bp ORFs, den kompletten 929 bp ORF und 377 bp einer unbekannt Sequenz. Ein Sequenzvergleich mit der vorhandenen genomischen Sequenz zeigte konservierte Spleiß-Donor- aber kein Spleiß-Akzeptor-Stellen und keinen ORF. Upstream der Spleiß-Donor Stelle befindet sich ein CG reiche Region, die vermutlich eine CpG Insel ist. Die CpG Inseln sind Bereiche des Genoms mit über 50% G+C Gehalt und einer Länge von mehr als 200 bp (Gardiner-Garden und Frommer, 1987). Etwa 50% des Genoms der Genpromotoren von Säugern enthalten CpG-Inseln (Antequera und Bird, 1993). Aus oben genannten Gründen kann man annehmen, daß es sich um das erste Exon des Gens handelt. 5' RACE mit dem AP1-Primer für die 5'-Adaptor-Sequenz der „Marathon-ready“ cDNA und dem 3'Primer PM129 für den 929 bp ORF ergab multiple Banden, die nicht zu der Isolierung

des kompletten Exons 1 führen konnten. Um das putative Exon 1 mit dem 929 bp ORF zu verbinden, wurde eine RT-PCR mit den spezifischen Primern PM144 und PM145 im Exon1 und PM129 im 929 bp ORF an „Marathon-ready“ cDNA aus fötalem Gehirn durchgeführt. RT-PCR mit den Primern PM144 und PM129 ergab zwei Produkte von 884 bp (Abb. 3.8, RT1a) und 726 bp (Abb. 3.9, RT1b). Bei der RT-PCR mit den Primern PM145 und PM129 wurden zwei Produkte von 735 bp (RT2a) und 577 bp (RT2b) amplifiziert. Die einzelnen PCR-Produkte wurden isoliert und sequenziert. Die PCR-Produkte RT1a und RT1b, ebenso wie RT2a und RT2b (Abb. 3.9) unterscheiden sich in 158 bp zwischen Exon 1 und dem 929 bp ORF. In RT1b und RT2b fehlt das 158 bp große Fragment. Die Marathon-cDNA beinhaltet zwei Populationen des Transkripts. Das 158 bp Exon wird von Spleiß-Akzeptor und -Donor Stellen flankiert. Exon 2 enthält ein putatives Startcodon, allerdings mit geringer Ähnlichkeit zur Kozak-Consensus-Sequenz (Kozak, 1999). Dadurch würden 13 Aminosäuren am N-Terminus angehängt.

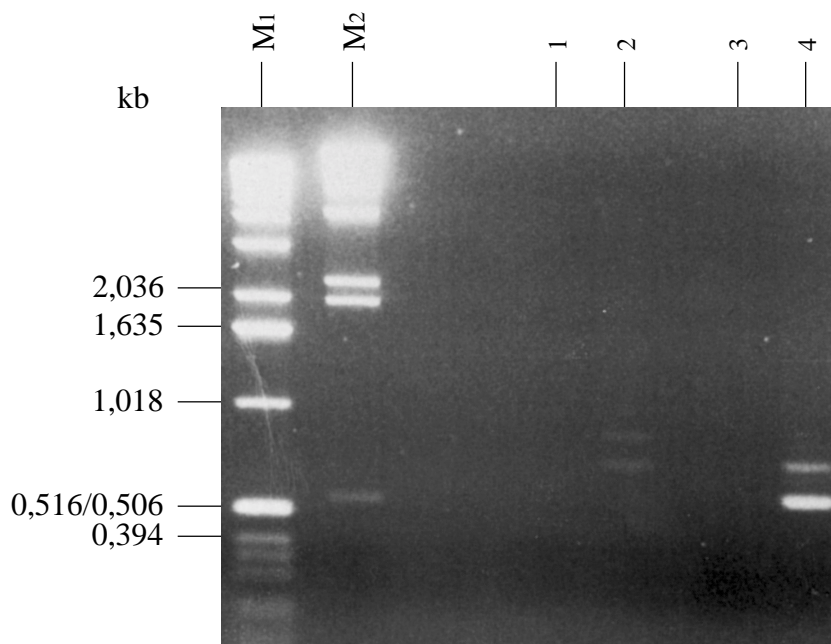


Abb. 3.9: RT-PCR Analyse an Marathon cDNA aus fötalem Gehirn mit den Primern PM144/129 (Spuren 1 und 2) und Primern PM145/129 (Spuren 3 und 4). In Spur 1 Leerkontrolle für RT1, Spur 2 RT1-a 884 bp, RT1-b 726 bp. In Spur 3 Leerkontrolle für RT2, Spur 4 RT2-a 735 bp und RT2-b 577 bp. Als Größenstandard dienen die 1 kb DNA Leiter (M1) und der λ -Hind (M2) Marker.

3.1.2.6 Verbindung der Exons

Um die Reihenfolge der Sequenzen zu bestimmen, habe ich Exon-verbindende PCRs durchgeführt. Mit den Primern PM101 in dem 1130 bp ORF und PM83 in dem ORF isoliert aus dem cDNA Klon C2, wurde ein RT-PCR an der RNA aus dem fötalem Gehirn durchgeführt. Das 469 bp lange Produkt RT10 (Abb. 3.10) wies darauf hin, daß 1) zwischen den Exons kein anderes Exon liegt, 2) die konservierten Spleiß-Stellen bestätigt wurden, 3) das Exon, aus dem Primer PM83 stammt, 604 bp lang ist. Eine weitere RT-PCR wurde mit den Primern PM97 (im 929 bp ORF) und PM121 (im 1130 bp ORF) durchgeführt (RT3, Abb. 3.10), mit der Reihenfolge der Exons bestimmt werden konnte. Der 1,43 kb umfassende DNA Klon C1 (Abb 3.10) enthielt 152 bp von 1130 bp ORF, den gesamten 929 bp ORF und 277 bp des 478 bp großen Exons. Flankierend zu diesem Exon, das am 5´Seite des 929 bp ORFs liegt, wurde keine Spleiß-Akzeptor Stelle gefunden. Mit den Primern PM97 und PM121 wurde eine RT-PCR an fötalen Gehirn RNA durchgeführt. Die Sequenzierung des 239 bp Produkts (RT3) bestätigte die Verbindung zwischen den ORFs 929 bp und 478 bp. Die Reihenfolge der Exons und ihren flankierende Spleiß-Stellen sind in der Tabelle 3.2 präsentiert.

Tabelle 3.2: *TRPS1* Gen Exon/ Intron Übergänge

Exon		Sequenz der Exon/ Intron Übergänge				Intron	
Nr.	Größe bp	3´-Spleißakzeptor		5´-Spleißdonor		Nr.	Größe [bp]
1	≥478			AACAG	gtaagt	1	44973
2	158	ttttgcag	ATGTA	TACAA	gtatgt	2	3543
3	929	ctttgcag	ATATG	TGCAG	gtttgt	3	14130
4	1130	ttctccag	GTGAC	TACAG	gtgagg	4	16268
5	604	ttctccag	GAGAG	TACGG	gtagga	5	168548
6	123	tgtttcag	AGGCG	ACTCG	gtaaga	6	3245
7	6589	ctctgcag	ACTCC				
Konsensussequenz		yyyyncag	G	AG	gtragt		
Intronsequenz wurde mit Kleinbuchstaben und Exonsequenz wurde mit Großbuchstaben gezeigt. r = Purinbase, y = Pyrimidinbase, n = Purin- oder Pyrimidinbase							

3.1.2.7 Isolierung der 3' nicht-translatierten Region (3'UTR)

Die EST-Datenbank-Suche mit 5530 kb genomischer Sequenz 3' der ORFs ergab 4 EST Cluster. Repräsentativ für das erste EST-Cluster (EC1, Abb.3.10) sind die EST-Klone AA662457 IMAGE Klon 1218102 aus den Geweben Brust Tumor, Magen Adenocarcinoma, gesamt Embryo und Kopf. EC1 überlappt mit dem ORF. Das nicht-klassische Poly Adenylierungssignal ATTTAAA (4504-4509) könnte zu der Isolierung der EST-Klone in EC1 geführt haben. EC2 präsentiert EST Klone isoliert aus dem gesamten Embryo, Prostata, fötalen Herz und Melanozyten. Die H53479/H53854, IMAGE Klon 202658, und R83254/H50546 sind für die EST-Klone in EC2 repräsentativ. Das EST-Cluster 3, repräsentiert durch AA470941/AA470973 und IMAGE Klon 771530, beinhaltet EST Klone aus Kolontumor, Prostata, Gehirn, Uterus, fötalen Herz und gesamten Embryo. Am 3' Ende des Clusters, in genomische DNA befindet sich ein Bereich aus 13 A's der vermutlich durch die Anlagerung des Oligo (dT) Primers zur Isolierung dieser EST Klone geführt haben. EC4 beinhaltet EST Klone aus Ovarialtumor und Gehirn, repräsentiert durch R54192/R54193 und IMAGE Klon 41822. Die EST Klone in EC2 und EC4 benutzen das konservierte Polyadenylierungssignal AATAAAA (Abb.3.10). Die 4 EST-Cluster zeigen komplette Kolinearität mit der genomischen Sequenz. Um die gesamte cDNA zu isolieren, habe ich durch die *Long Range* PCR die Lücken in der Sequenz geschlossen. In diesem Experiment wurden mit Hilfe des Advantage Polymerase Mix an „Marathon-ready“ cDNA aus fötalem Gehirn als Matrize lange Fragmente amplifiziert (Abb. 3.10, RT15-16-18). Mit den Primern PM148 im Exon 5 und PM154 in der 3'UTR, an der 5'Seite des EC4s, wurde ein 5707 kb umfassendes Fragment (RT 15) amplifiziert. Durch die Sequenzierung dieses Fragmentes, konnte die gesamte 5530 bp 3'UTR ermittelt werden. Die 3'UTR weist 3 unter Einhaltung des Leserasters Stop Kodons nach dem Ende des ORFs auf. Die 3'nicht translatierte Region beinhaltet 5 konservierte Polyadenylierungssignale AATAAAA. In Hinblick auf die zu identifizierenden Transkripte durch Northern Blot von 7 und 10,5 kb, werden wahrscheinlich nur die zweite (nt 6190-6195) und die fünfte (nt 9348-9353) benutzt. Die EST-Cluster EC2 und EC4 (Abb. 3.10) bestätigen diese Annahme. Die 3'UTR beinhaltet 16 Kopien eines AUUUA Motivs. Dieses Motiv ist die Erkennungsstelle für die mRNA-Degradierung durch die proteosomale Endonuklease Aktivität (Jarrousse et al., 1999). In Tabelle 3.3 sind die RT-PCR Produkte RT 1-18 ausgestellt.

Tabelle 3.3: *TRPS1* RT-PCR Produkte

Name des Fragments	5'Primer		3'Primer		Größe des Produkts [bp]
	Name	Exon	Name	Exon	
RT1a-b	PM144	1	PM129	3	884+726
RT2a-b	PM145	1	PM129	3	735+577
RT3	PM121	2	PM97	3	239
RT4	PM108	3	PM109	3	399
RT5	PM90	3	PM101	4	1078
RT6	PM89	3	PM83	5	1790
RT7	PM89	3	PM81	5	1937
RT8	PM109	3	PM83	5	1971
RT9	PM106	4	PM107	4	447
RT10	PM101	4	PM83	5	535
RT11	PM104	4	PM83	5	1001
RT12	PM101	4	PM73	7	1067
RT13	PM101	4	PM61	7	1242
RT14	PM148	5	PM147	7, 3'UTR	3495
RT15	PM148	5	PM154	7, 3'UTR	5707
RT16	PM149	5-6	PM154	7, 3'UTR	5506
RT17	PM72	6	PM73	7	163
RT18	PM146	7	PM147	7, 3'UTR	2699

Abb. 3.10: (nächste Seite) A) Genomische Struktur des *TRPS1* Gens. Die PAC Klone 24, 30 und 22 überlappen das *TRPS1* Gen. Die senkrechten Linien zeigen die etwaige Position der chromosomalen Bruchpunkte der Patienten KS2166 und HB11480. Die 7 Exons sind als schwarze Balken dargestellt. B) Struktur der *TRPS1* cDNA. Die offenen Boxen repräsentieren die Exons. Die Start und Stop Kodons, sowie 3 Polyadenylierungs Signale und ein Poly (A) Schwanz in der 3'UTR sind gezeigt. Ein vermutlich nicht genutztes Start Kodon ist in Klammern gezeigt. Die cDNA wird durch RT-PCR Produkte (RT), die cDNA Klone (C) und EST Cluster (EC) präsentiert. Der dünne Strich in RT1-a, TR2-a und C1 demonstriert die Abwesenheit des alternativen Exons 2.

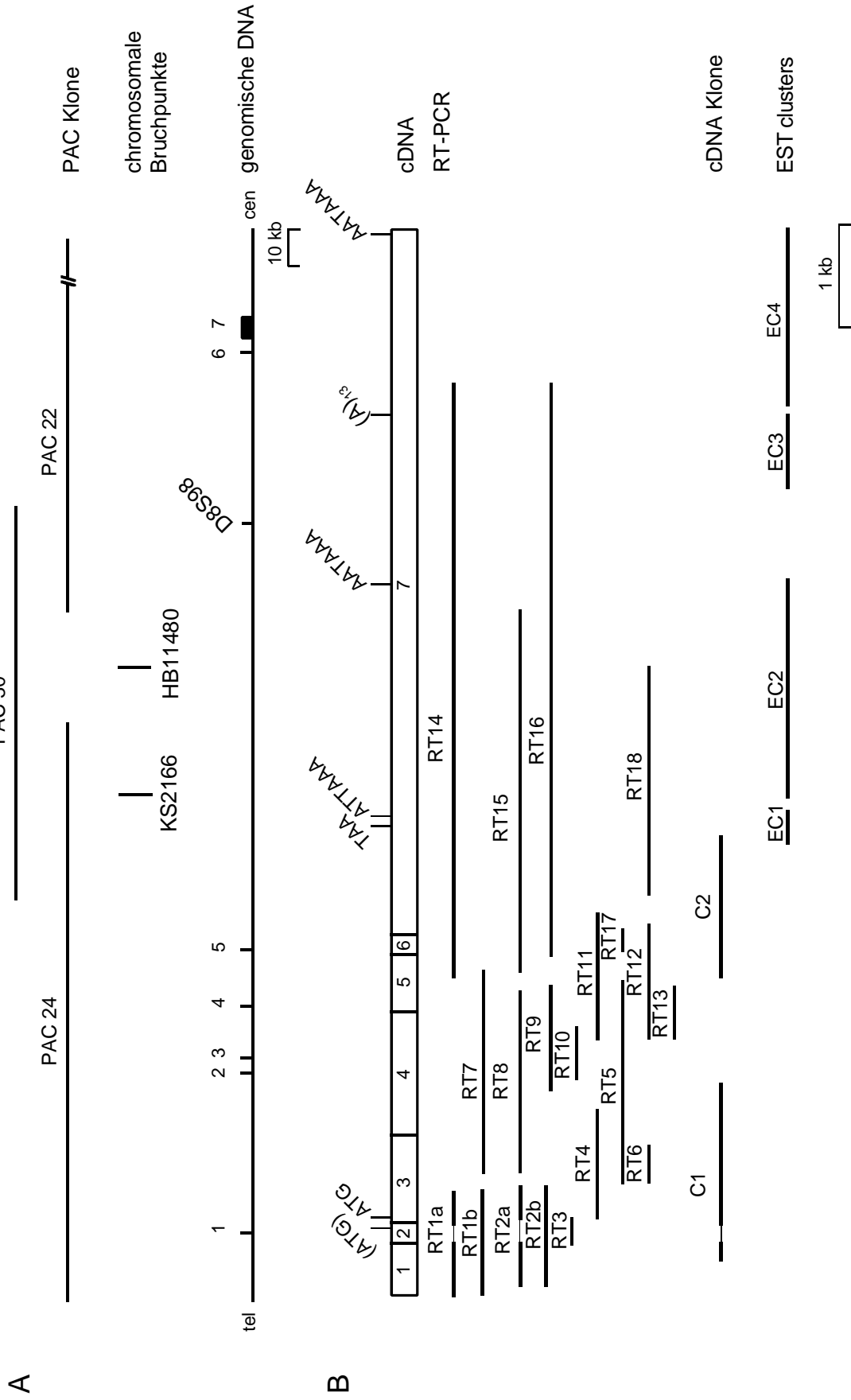


Abb 3.10: Legende siehe vorherige Seite.

3.1.2.8 TRPS1 Protein

Das *TRPS1* Gen überspannt 260,500 bp genomischer DNA. Das Gen besteht aus 7 Exons, davon 5 kodierend (3-7) und 2 nicht kodierend (1 und 2). Die Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Stellen sind konserviert (Tabelle 3.2) (Shapiro und Senapathy, 1987). Die 5' nicht translatierte Region umfaßt mindestens 480 bp ohne Exon 2 und 638 bp mit Exon 2. Die cDNA ist 10011 bp mit 3,843 bp ORF und 5,530 bp 3' nicht translatierte Region (Abb. 3.10). Das Gen kodiert für ein 1281 aa Polypeptid mit einem errechneten Molekulargewicht von 141580 Dalton und einem leicht basischen pI von 7,495. TRPS 1 hat 9 Zinkfinger von 4 verschiedenen Typen in Exons 3 bis 7. Die ersten drei Zinkfinger-Motiven (Zf 1: 224-247 in Exon 3, Zf 2: 335-358 und Zf 3: 436-459 in Exon 4) sind vom C₂H₂ Typ und haben eine Konsensussequenz von C₂X₁₄H₂ ohne ähnliche Sequenzen in der Proteindatenbank. Die nächsten drei Zinkfinger-Motive (Zf 4: 616-637 in Exon 4, Zf 5: 668-689 in Exon 4-5, Zf 6: 694-715 in Exon 5) entsprechen dem C₂H₂-Typ mit der Konsensussequenz C₂X₁₂H₂. Die Zinkfinger Domänen 4 und 6 haben Ähnlichkeiten mit einigen Proteine. Der Zinkfinger 7 in Exon 6 (Zf 7: 896-920) gehört der C₂C₂ Gruppe mit der Konsensussequenz CXNCX₁₇CNXC an. Diese Zinkfinger-Domäne hat 164 Treffer in der Proteindatenbank, die ausschließlich GATA DNA-bindende Transkriptionsfaktoren betreffen (Abb. 3.5). Die Zinkfinger Domänen 8 und 9 (Zf 8: 1217-1237 und Zf 9: 1245-1267) sind vom C₂H₂ Typ mit 285 ähnlichen Zinkfinger-Proteinen in der Proteindatenbank und haben die höchste Ähnlichkeit zu den zwei C-terminalen Zinkfingern von IKAROS Transkriptionsfaktoren. Die C-terminale TRPS1 Zinkfinger-Domäne zeigt außerdem Ähnlichkeit zu *Drosophila melanogaster* Proteinen wie Hunchback, Krüppel und Spalt-Major (Abb. 3.4). Der putative GATA-bindende C₂C₂ Zinkfinger in Exon 6 wird von zwei Kernlokalisierungssignalen (NLS, *Nuclear Localization Signals*) flankiert. Das erste Signal (LRRRRRG) ist in Exons 5 und 6 in Position 886-891 und das zweite Motiv (RRRTRKR) liegt in Exon 7 in der Position 946-952. Diese Hexa- bzw. Heptapeptide sind basische Motive, die typisch für große nukleäre Transkriptionsfaktoren sind (Boulikas, 1994). Die Analyse des TRPS Proteins läßt vermuten, daß es ein Transkriptionsfaktor ist, der 9 Zinkfinger von unterschiedlichen Typen hat. Die gesamte *TRPS1* cDNA- und Aminosäure-Sequenz wird in Abb. 3.11 präsentiert.

```
TGTTTTCATAGTGCATGTTTCATTTCTACTCACAACATGTTCTTGGTGTATTTCTTATGCAAACAATCTTCAGGCAGCAAAGATGTCGTGTTACATCTAAACTTGAATAATAAAGTTTAC  
CACCAGTTACACA
```

9360
9373

Abb. 3.11: Sequenz des *TRPS 1* Gens (10011 bp). Die Basen-Nummerierung der 638 bp umfassenden 5'UTR erfolgte mit negative Zahlen. Der 3843 bp ORF beginnt ab der dritten Base des Exon 3 und kodiert für 1281 Aminosäuren. Die 9 Zinkfinger Domänen sind grau schattiert und die NLS sind eingerahmt. In 3'UTR (Nr. 3844-9373) sind die Polyadenylierungssignale fettgedruckt und die mRNA Degradierungs-Signale sind unterstrichen.

3.2 Die molekulare Analyse von Patienten mit TRPS I

3.2.1 Sequenzierung der Patienten DNA

Für die Mutationsuche wurden 15 überlappende Amplimere entwickelt, die die gesamte kodierende Region und flankierende Intronbereiche jedes Exons beinhalten (Tabelle 7.5). DNA von 10 TRPS I Patienten mit normalen Chromosomen, die mit Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) mit YAC A3B7 untersucht worden waren (Lüdecke et al. 1995), wurde sequenziert. Es wurden insgesamt 6 Mutationen, 3 familiäre Fälle und 3 sporadische Fälle identifiziert (Tabelle 3.4) (Momeni et al., 2000). Die Stammbäume von 4 Patienten in dem die Mutationen isoliert sind sowie die Elektropherogramme der Sequenzierung der Indexpatienten ist in der Abb. 3.12 präsentiert.

Tabelle 3.4: TRPSI Mutation

N.	Familiär	Exon	Mutation	aa Austausch	Primer	Anmerkung*
1	+	4	1014 C→A	C338X	PM139/140	+ApoI
2	+	4	1831 C→T	R611X	PM106/107	-NruI
3	+	5	2406-2407insG	Leseraster-Verschiebung	PM80/81	
4	-	5	2441-2442insT	Leseraster-Verschiebung	PM80/81	
5	-	5	2518 C→T	R840X	PM87/86	-Bstul
6	-	7	3360-3361insGGAG	Leseraster-Verschiebung	PM76/77	+BspEI

* Die letzte Spalte zeigt eine Restriktionsschnittstelle, die durch die jeweilige Mutation entweder entstanden ist (+) oder verloren wurde (-).

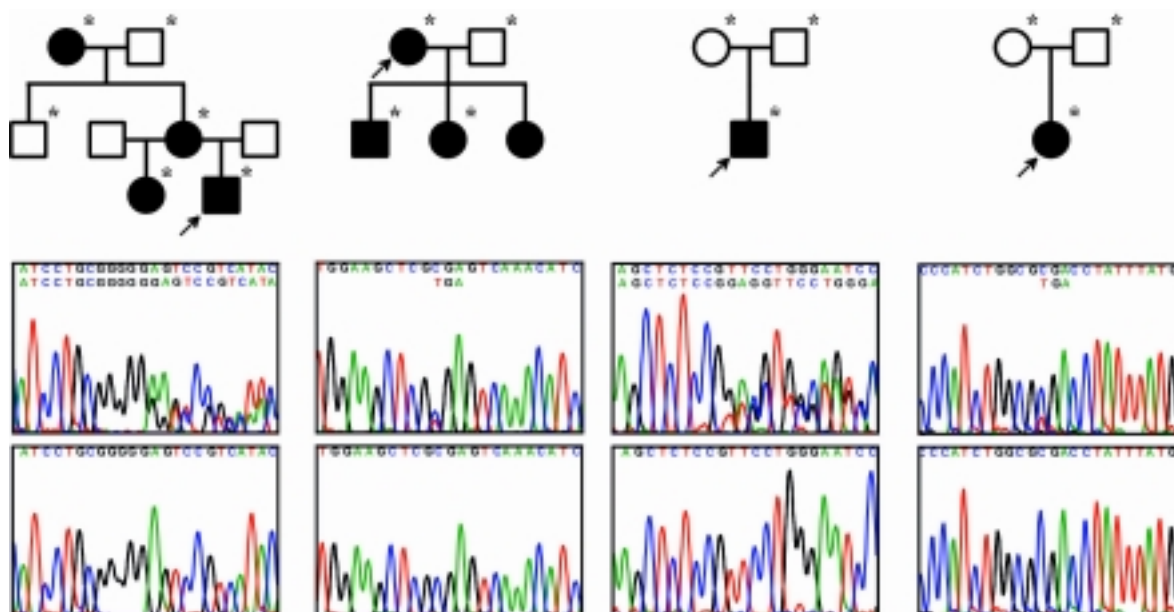


Abb. 3.12 Stammbaum und Mutationsanalyse von 4 TRPS I Patienten. Die oberen Kästen unter jedem Stammbaum zeigen die Elektropherogramme der Sequenzierung der Amplimere der Indexpatienten (mit Pfeil gezeigt). Die unteren Kästen zeigen die gleiche DNA-Region bei Normalpersonen. Die Abschnitte A-D entsprechen den Mutationen 3, 2, 6 und 5 in Tabelle 3.4.

3.2.2 Mutationskontrolle

Nachdem die Mutationen in 6 TRPS I Patienten durch die Sequenzierung identifiziert wurden, sollte kontrolliert werden, ob es sich dabei um einen neutralen Polymorphismus

handelt oder um eine Mutation, die nur bei den Patienten auftritt. Für jede Mutation wurden 80 Chromosomen aus 40 Normalpersonen untersucht. Die Mutation 1014 C→A wurde durch Sequenzierung kontrolliert. Da die Sequenzierung eine aufwendige Methode ist, wurden die Mutationen Nr. 2, 5 und 6 durch die erworbene bzw. die verlorene Enzymschnittstellen verifiziert. Die Mutationen Nr. 3 und 4 wurden durch SSCP-Analyse kontrolliert.

3.2.2.1 *ApoI* Schnittstelle (Mutation Nr. 1)

Durch die Mutation Nr. 1 (Tabelle 3.4) C→A wurde die Wildtypsequenz CAATTT zu AAATTT geändert, was zur Entstehung der *ApoI* Schnittstelle R AATT Y führt. 15 Basen 5' von der durch die Mutation neu kreierten *ApoI* Schnittstelle ist eine andere *ApoI* Schnittstelle, die die Verifizierung der Mutation durch die Schnittstelle verhindert (die 15 Basen sind nicht auf dem Agarosegel sichtbar). Zur Kontrolle wurde an der DNA der Patientin und 40 Normalpersonen mit den Primern PM139-140 PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden vollständig sequenziert. In keiner der Normalpersonen wurde die Mutation gefunden.

3.2.2.2 *NruI* Schnittstelle (Mutation Nr. 2)

Die Mutation Nr.2 C→T im 447 bp Amplimer PM106/107 ändert die *NruI* Schnittstelle TCGCGA zu TCGTGA, wodurch die Schnittstelle verloren geht. Als Kontrolle wurden 40 PM106/107 Amplimere von Normalpersonen und von der Index-Patientin mit *NruI* verdaut (Abb. 3.13). Bei den Normalpersonen wurde das 447 bp Amplimer an der Position 341 geschnitten. Dadurch wurde zwei Fragmente von 341 bp und 106 bp sichtbar. Da die Patientin für die Mutation heterozygot ist, hat sie ein Wildtypallel, das mit *NruI* geschnitten werden kann und ein mutantes Allel, das die Schnittstelle verloren hat (Abb.3.14: 447 bp Bande).

Abb. 3.13: (siehe nächste Seite) *NruI* Restriktionsverdauung des PM139/140 Amplimers von 40 Normalpersonen und der Indexpatientin (Tabelle 3.4 Nr.2) auf einem 2%igen Agarosegel. Die 447 bp Bande repräsentiert das mutante Allel und die 341 bp und 106 bp Banden stellen die restringierten Wildtypallele dar. pUC19 Marker diente als Größenstandard. NP: Normalperson, P: Patient.

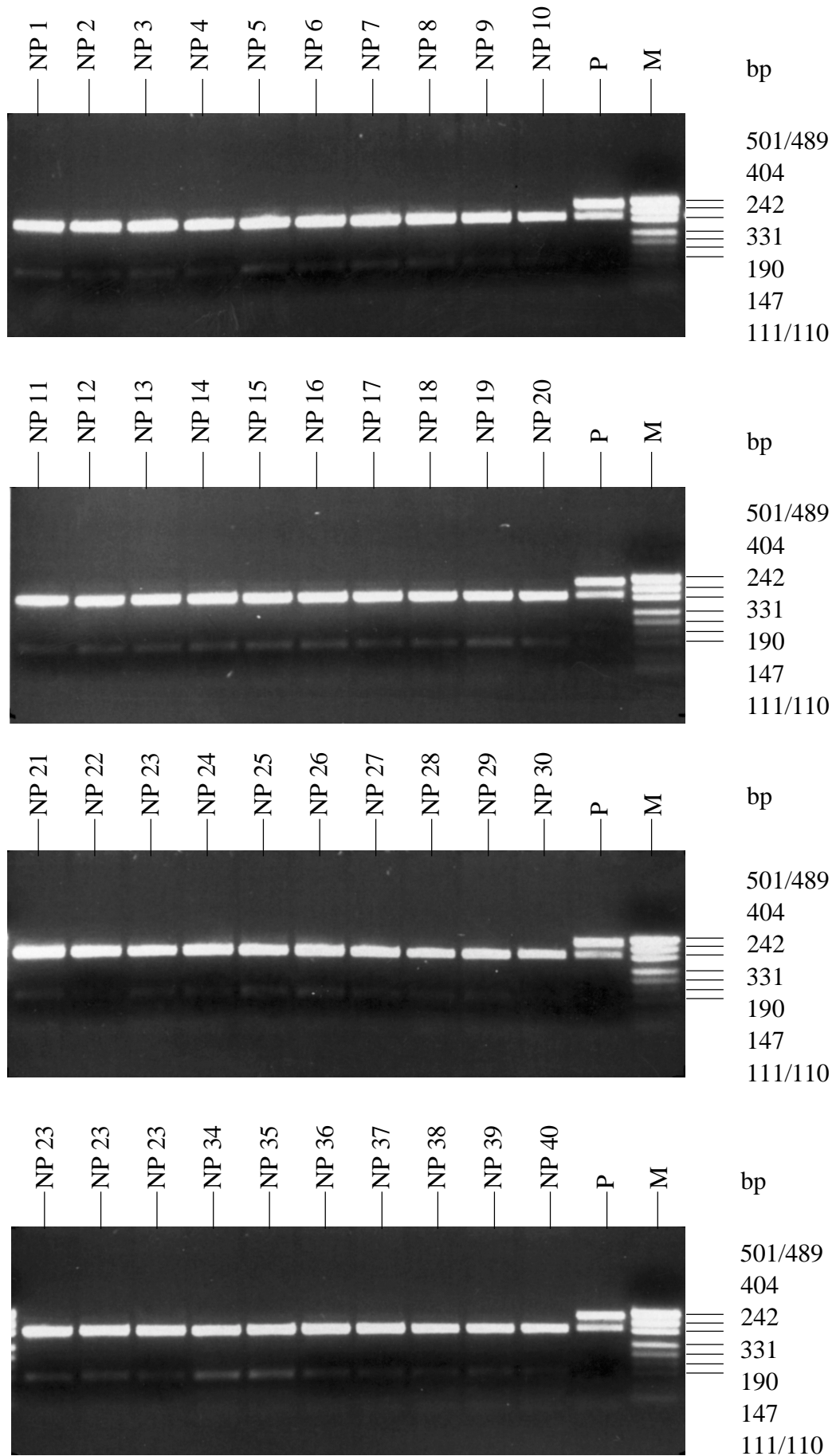


Abb. 3.13: Legende siehe vorherige Seite.

3.2.2.3 *Bst*UI Schnittstelle (Mutation Nr. 5)

Die Mutation Nr. 5 C→T, im PCR-Produkt PM87/86 ändert die *Bst*UI Erkennungssequenz CGCG zu CGTG und dadurch geht die Schnittstelle verloren. Das Enzyme *Bst*UI schneidet den 355 bp umfassenden Amplimer an Position 162 mit zwei Restriktionsprodukten von 162 und 193 bp. Da die Patientin für die Mutation heterozygot ist, ergibt der Restriktionsverdauung drei Banden, 162 und 193 bp Banden für das Wildtypallel und die 355 bp Bande für das mutante Allel, auf dem die *Bst*UI Schnittstelle verloren gegangen ist.

Abb. 3.14: (Seite 53) *Bst*UI Restriktionsverdauung vom PM87/86 Amplimer von 38 Normalpersonen und der Indexpatientin (Tabelle 3.4 Nr. 5) auf einem 2%igem Agarosegel. Die 355 bp Bande in Spur P repräsentiert das mutante Allel und die 162 und 193 bp Banden das Wildtypallel. Als Größenstandard diente PUC19 Marker. NP: Normalperson, P: Patient, M: Marker.

3.2.2.4 *Bsp*EI Schnittstelle (Mutation Nr. 6)

Die Mutation Nr. 6 (Tabelle 3.4) ist eine 4 Basen Insertion an cDNA Position 3360-3361. Die Insertion führt zu einer Leseraster-Verschiebung, die in einem frühzeitigem Stopkodon resultiert. Durch die Insertion von GGAG entsteht die *Bsp*EI Schnittstelle TCCGGA. Durch diese Schnittstelle lassen sich die mutante Allele vom Wildtypallele unterscheiden. Das 564 bp PM76/77 Amplimer wird im mutanten Allel an Position 364 geschnitten und das mutante Allel bleibt ungeschnitten.

Abb. 3.15: (Seite 54) *Bsp*EI Restriktionsverdauung des PM76/77 Amplimers von 40 Normalpersonen und des Indexpatienten (Tabelle 3.4 Nr. 6) auf einem 2%igen Agarosegel. Die 564 bp Bande in der P-Spur zeigt das Wildtypallel und die 364 und 204 bp Banden das mutante Allel. Als Größenstandard diente PUC19 Marker. NP: Normalperson, P: Patient.

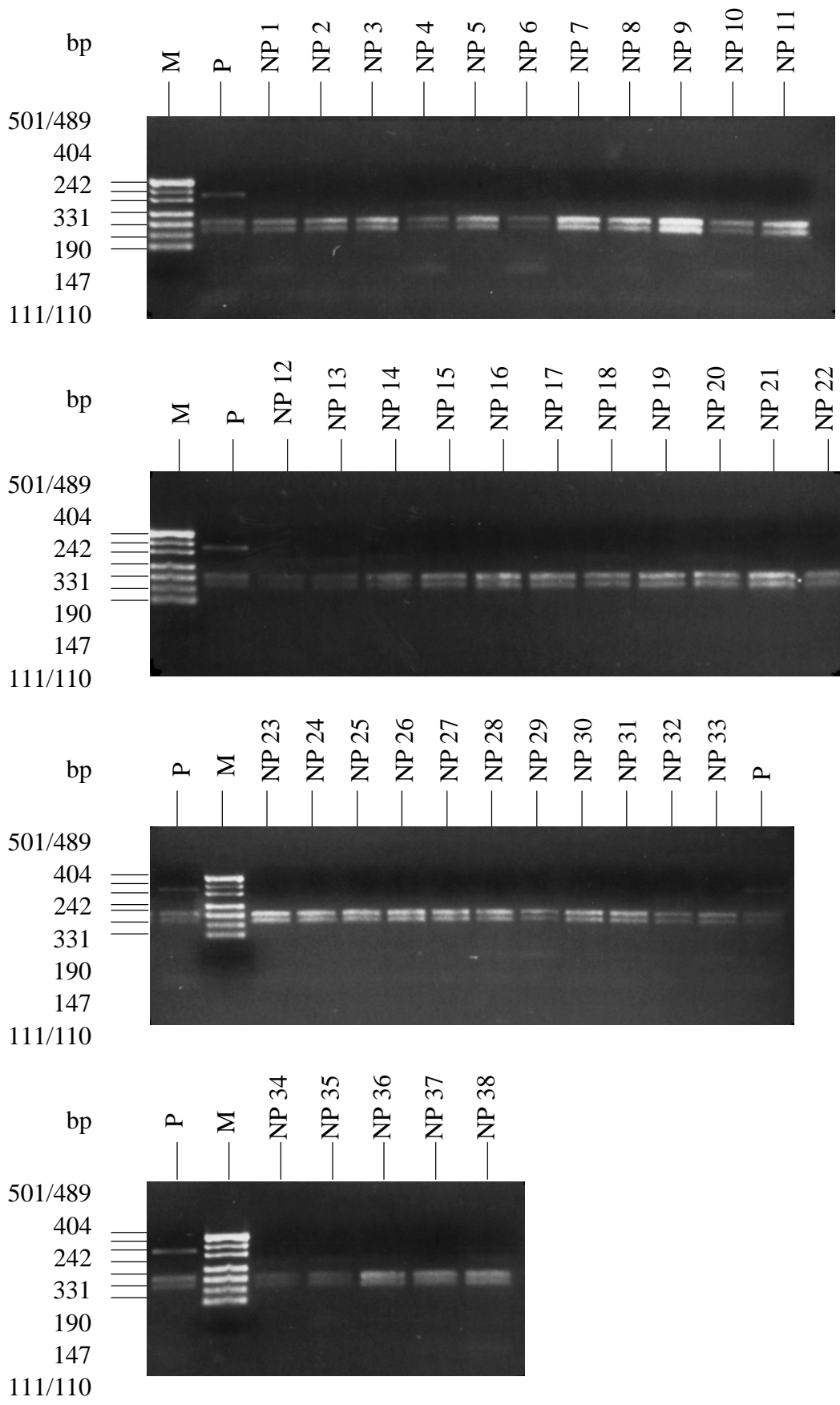


Abb. 3.14: Legende Siehe Seite 52.

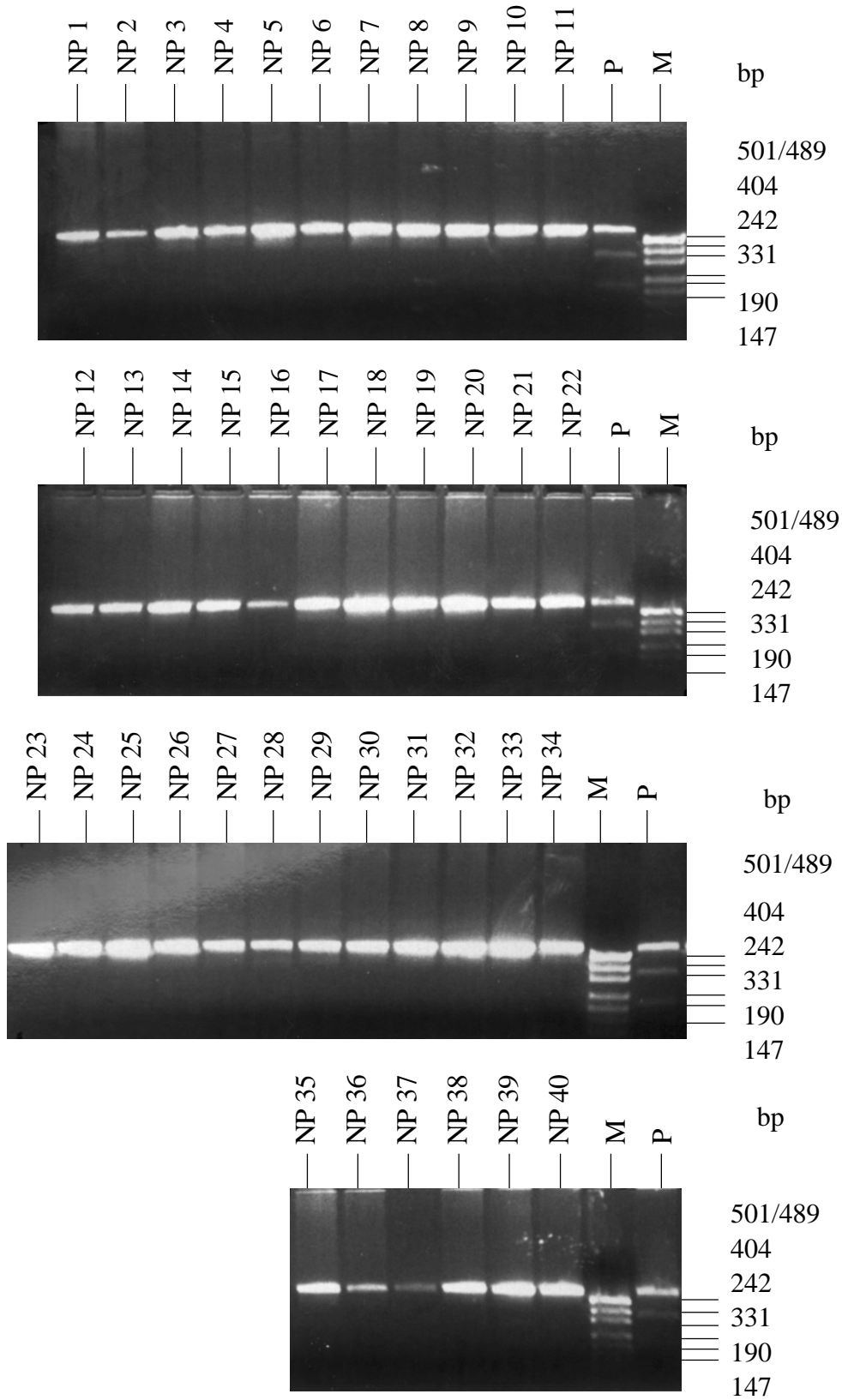


Abb. 3.15: Legende Siehe Seite 52.

3.2.2.5 SSCP-Analyse (Mutationen Nr. 3 und Nr. 4)

Die Mutationen Nr. 3 und Nr. 4 wurden im Amplimer PM80-81 identifiziert. Beide Mutationen sind ein-Basenpaar-Insertionen, die zur Leseraster-Verschiebung führt. Die PM80/81 PCR-Produkte von 38 Normalpersonen und des Patienten wurden durch SSCP-Analyse (2.2.15) untersucht. Beide Mutationen konnten durch die Konformationsänderungen auf dem SSCP Gel, im Vergleich mit den Normalpersonen, verifiziert werden.

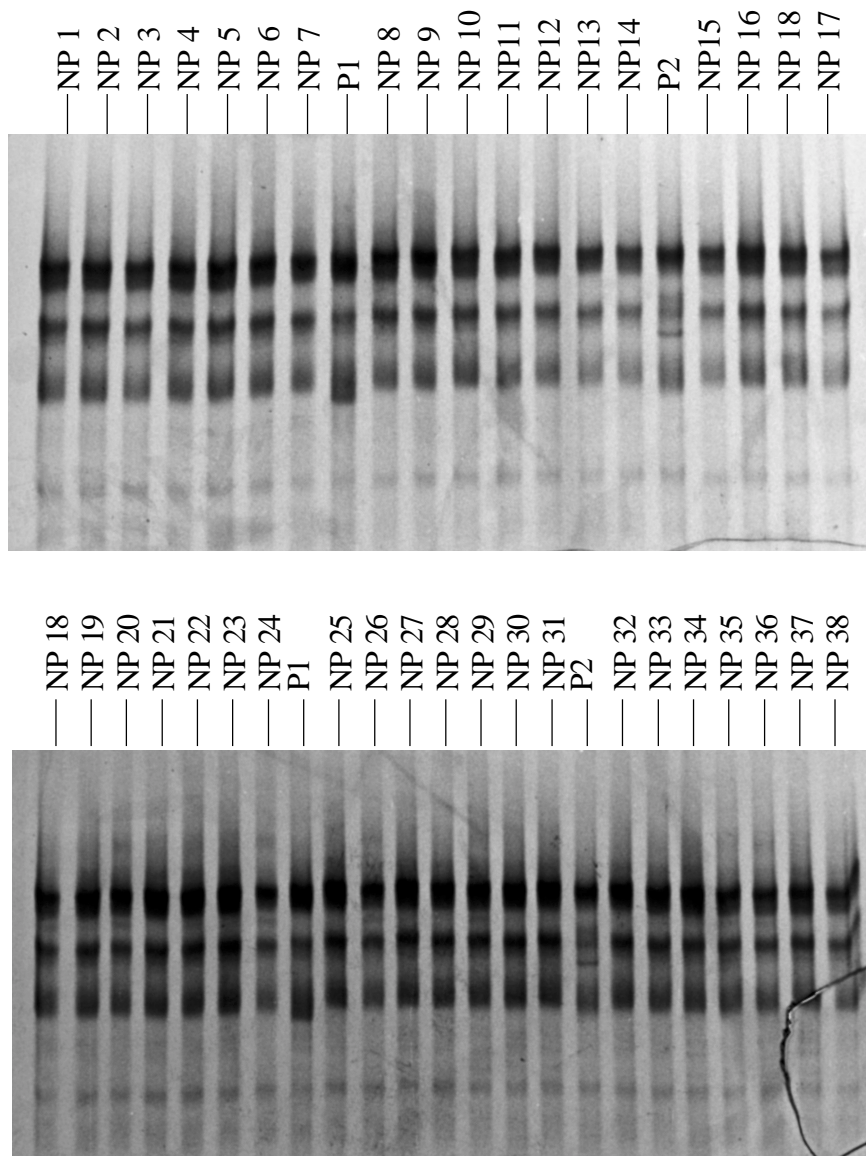


Abb. 3.16: Die PCR-Produkte PM80-81 von 50 Normalpersonen und die beiden Patienten (Tabelle 3.4, Nr. 3-4) wurden wie im Abschnitt 2.2.13 beschrieben, vorbereitet und auf das Gel aufgetragen. Die Patienten DNA zeigen Bandenmuster, die sich von denen der Normalpersonen unterscheiden. NP: Normalperson, P1: Patient Nr. 3, P2: Patient Nr. 4.

3.2.2.6 Verifizierung einer Spleiß-Mutation durch RT-PCR

Die Spleißmutation, die von Dr. Lüdecke identifiziert worden ist (Lüdecke et al., 2001), ist eine Basensubstitution, IVS6+1G→T, die die Spleiß-Donor-Stelle ändert und zum Überspringen von Exon 6 führt. RT-PCR an RNA aus Leukozyten der Patientin mit den Primern PM101 (Exon 4) und PM73 (Exon 7) ergab ein Produkt von 1067 bp, das in normalen Allel zu erwarten ist, und weiterhin ein 944 bp Produkt, in dem die 123 bp von Exon 6 fehlen. Dies wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte mit Primer PM85 (Exon 5) bestätigt.

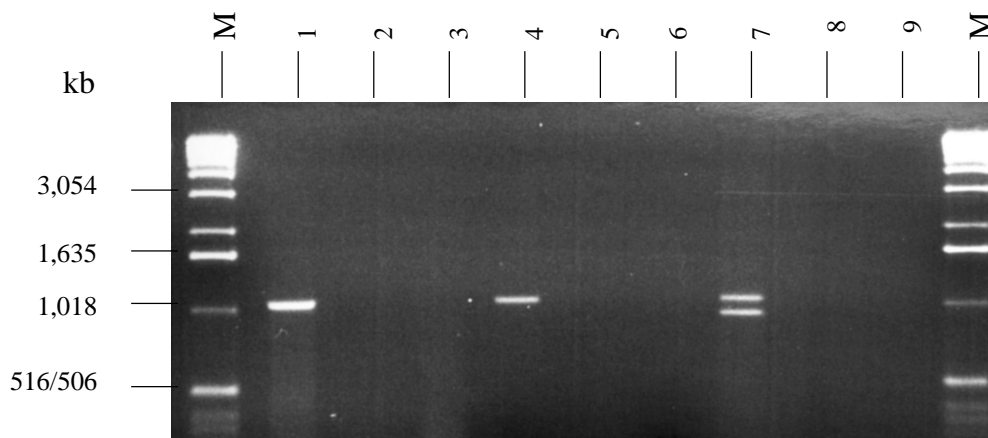


Abb. 3.17: RT-PCR an Patienten-RNA mit den Primern PM101 und PM73 auf einem 1%igen Agarosegel. Die 1067 bp große Bande stammt von dem Wildtypallel und die 944 bp Bande von dem mutierten Allel, bei dem Exon 6 fehlt. M, 1 kb DNA Leiter, 1) Patient mit der Mutation 2755G→A, 4) Patient mit der Mutation 2681T→A, 7) Patient mit der Spleiß-Mutation (Lüdecke et al., 2001). Die Kontroll-Spuren 2, 4 und 8 enthielten Reverse-Transkriptase ohne RNA. Die Kontroll-Spuren 3, 6 und 9 enthielten RNA aus jeweiligem Patient, ohne Reverse-Transkriptase. Die Kontroll-Spuren dienten als Kontrollen für die Kontamination.

3.3 Isolierung und Charakterisierung des murines *Trps 1*

3.3.1 Isolierung der cDNA

Eine Bibliothek aus cDNA von einer 17 Tage alten Maus (Clontech; Material und Methoden Tabelle 2.1.7.1) wurde mit den menschlichen Hybridisierungssonden PM94-91 aus Exon 3 und PM67-66 aus Exon 7 hybridisiert. Dabei wurden 7 Klone isoliert (Abb. 3.18, mC1-7). Die Klone wurden mittels vektorspezifischen Primern und internen Primern durchsequenziert. Wie auf der Abbildung zu sehen ist, wurde in keinem cDNA-Klon das Ortholog zum menschlichen Exon 2 gefunden. Eine 5'RACE an cDNA eine 17 Tage alten Maus-Embryos (Marathon-ready cDNA; Material und Methoden, 2.1.8) mit den Primern M20U226 (5'CCAAGATCAACTCTGCAAAC3') und M20L369 (5'CTAGCAACGTTTCTCAGAGG 3') ergab ein Fragment (Abb. 3.18, mRT1-5'RACE) von 144 bp, in dem ebenfalls das *TRPS1* Exon 2 fehlte. Sequenzsuche mit der menschlichen *TRPS 1* 3'UTR in einem murinen EST-Datenbank ergab EST-Klone, mit deren Hilfe Primer m3'UTR1-6 entworfen wurden (Tabelle 3.5; Tabelle 7.6). *Long-Range-PCR* an murine Marathon-ready cDNA ergab 5 Produkte die in der Tabelle 3.5 präsentiert werden (Abb. 3.18; mRT2-6).

Abb. 3.18: (nächste Seite) Ein Vergleich zwischen dem menschlichen *TRPS1* Gen und dem murinen *Trps1* Gen. Die Exons sind durch schwarze Balken dargestellt worden. Die grauen Balken zeigen die Kernlokalisierungssignale und die gestreiften Balken die Zinkfinger. Die isolierten cDNA Klone sind mit mC1-7 gezeigt worden. Die PCR-Produkte sind mit mRT1-6 gezeigt worden. Die V-förmigen Linien bei mC1-3 und mRT1 deuten darauf hin, daß das menschliche Exon 2 bei diesen Fragmenten fehlte. Die Maus EST-Klone sind in drei Clustern zusammen gefaßt.

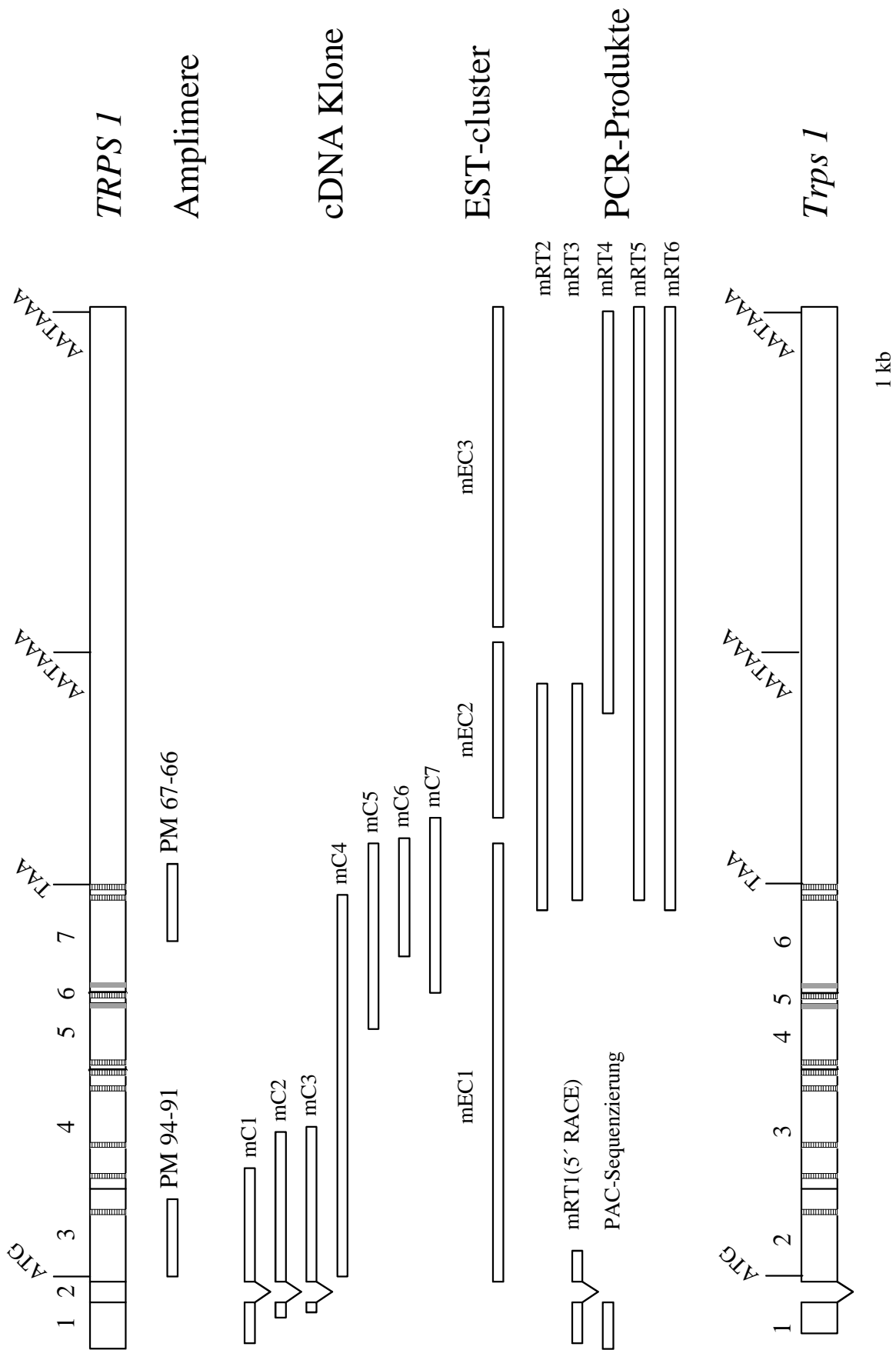


Abb. 3.18: Legende siehe vorherige Seite.

Tabelle 3.5: *Trps1* RT-PCR Produkte

Name des Fragments	5'Primer		3'Primer		Größe des Produkts [bp]
	Name	Position	Name	Position	
mRT1	M20U226	Exon1	M20L369	Exon2	144
mRT2	3'UTR1	Exon 6	3'UTR4	3'UTR	2388
mRT3	3'UTR2	Exon 6	3'UTR4	3'UTR	2261
mRT4	3'UTR3	3'UTR	3'UTR5	3'UTR	3521
mRT5	3'UTR2	Exon 6	3'UTR6	3'UTR	5525
mRT6	3'UTR1	Exon 6	3'UTR5	3'UTR	5708

Die Sequenzierung der RT-PCR Produkte führte zur Vervollständigung der *Trps1* cDNA Sequenz. Die cDNA umfaßt 9671 bp und beinhaltet einen ORF von 3843 bp und eine 3'UTR von 5530 bp. Durch den cDNA Klon mC1, RT-PCR Produkt mRT1 und PAC-Sequenzierung, konnten 328 bp ermittelt werden. Die 5'RACE mit dem AP Primer ergab kein Produkt. Der offene Leserahmen (ORF) beginnt mit der dritten Base des Exons 2. Das Startkodon ATG ist in Übereinstimmung mit Kozak Konsensus-Sequenz (Kozak 1999). Der ORF endet mit zwei Stop-Kodons (TAA, 3846-3848, 3870-3872). Das Gen kodiert für ein 1281 aa Polypeptid mit 9 Zinkfinger-Motiven (Abb. 3.19). Die Zinkfinger-Motive sind nahezu in Anzahl und Struktur identisch, unterscheiden sich nur durch zwei Basen-Austausche in Zinkfinger 4, T→S aa 622, und S→T aa 635. Es gibt zwei NLS Signale in dem Protein. Das erste wird in Exon 4 und 5 kodiert und hat das Motiv (LRRRRRG) und das zweite Signal hat das Motiv (RRRTRKR) (946-952) und wird in Exon 6 kodiert. Das Protein hat ein errechnetes Molekulargewicht von 140952 Dalton und einen leicht basischen pI von 7,56. Der 5500 bp lange ORF hat 5 klassische (AATAAA) und ein nicht-klassisches (ATTAAA) Polyadenylierungssignal, von denen zwei (6642-6647 und 9644-9649) konserviert sind. Da die zwei konservierten Polyadenylierungssignale benutzt werden, ergeben sich zwei Transkripte, die beim menschlichen *TRPS1* etwa 7 und 10,5 kb groß sind (siehe 3.3.3). Die *Trps 1* 3'UTR beinhaltet 11 AUUUA Motive. Diese Protein-Motive sind mit Degradation der mRNA Moleküle durch die proteosomale Aktivität in Zusammenhang zu bringen (Jarrousse et al., 1999). Maus-EST Datenbanksuche mit der

kompletten *Trps 1* Sequenz ergibt 3 EST-Cluster mit 140 Treffern (Abb. 3.20, mEC1-3). Der mEC1 beinhaltet 25 EST Klone, die 4540 bp des *Trps 1* cDNA, einschließlich den gesamten ORF, überspannen. Die EST Klone stammen aus Geweben wie Brust (Maus), Darm (Maus), Lungentumor (Maus), fertilisierten einzellige Maus Embryonen, Basalganglien. Der mEC2 umfaßt 29 überlappende EST-Klone die 1699 bp von der 3'UTR beinhalten. Die mEC2 EST Klone stammen aus Brust, Milz, Gehirn (Cerebellum, Cortex), Lunge und einem 9 Tage alte Embryo. Der mEC3 beinhaltet 46 EST Klone aus Geweben wie Brust, Darm, embryonalen Kopf, Aorta und Venen. Der mEC3 überspannt 3412 bp. Der Vergleich zwischen *TRPS 1* und *Trps 1* wird in der Tabelle 3.6 Zusammengefaßt.

Tabelle 3.6

	<i>TRPS 1</i>	<i>Trps 1</i>
Transkript Größe [kb]	7 – 10,5	7 – 10,5
Anzahl der Exons	7	6
Länge des ORFs [bp]	3843	3843
Identität	91,3%	
3'UTR Länge [bp]	5530	5500
3'UTR Identität	31%	
5'UTR Länge [bp]	≥ 478	≥ 328
5'UTR Identität	* 97,3%	
Aminosäure Anzahl [aa]	1281	1281
Aminosäure Identität	93,1%	

* Die Ähnlichkeit bezieht sich auf die 108 bp am 3'Ende der 5'UTR.

Abb. 3.19: (siehe vorherige Seite) Sequenz von *Trps 1* (9671 bp). Die 328 bp der 5'UTR wurde in negativen Zahlen numeriert. Der 3843 bp umfassende ORF beginnt ab der dritten Base des Exons 3 und kodiert für 1281 Aminosäuren. Die 9 Zinkfinger Domänen sind grau markiert und die NLS sind eingerahmt. In 3'UTR (n 3844-9371) sind die Polyadenylierungssignale fettgedruckt und die mRNA Degradierungs-Signale sind unterstrichen.

3.3.2 Bestimmung der Exon-Intron Übergänge

Für die Bestimmung der Exon-Intron Übergänge des *Trps1* Gens hat Dr. O. Schmidt aus unserem Labor eine genomische murine PAC Bibliothek durchgemustert. Mit den menschlichen Primern PM94-91 und PM67-66 wurden die PAC-Klone B18382 und G13122 isoliert. Der Klon B18382 beinhaltet Exons 1-4 und Klon G13122 beinhaltet Exons 5 und 6. Die PAC Klone überlappen nicht. Für die Sequenzierung der Exon/Intron Übergänge wurden passende menschliche Primer oder mausspezifische Primer benutzt, die mit Hilfe der cDNA Sequenz gelegt worden (Tabelle 7.7). Die Übergänge sind in Übereinstimmung mit der GT-AG Regel (Shapiro und Senapathy, 1987) und stimmen mit denen von *TRPS1* überein. Die Exongrößen bleiben ebenfalls identisch, nur ein Ortholog für das menschliche Exon 2 konnte nicht identifiziert werden. Das Ergebnis ist in der Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: *Trps1* Gen Exon/ Intron Übergänge

Exon		Sequenz der Exon/ Intron Übergänge			
Nr.	Größe bp	3'-Spleiß-Akzeptor		5'-Spleiß-Donor	
1	≥328			AACAG	gtaagg
2	929	gttcacg	ATATG	TACAG	gtttgt
3	1130	cactgcag	GTCAC	TACAG	gtaagg
4	604	ccttcacg	GAGAG	TACGG	gtagga
5	123	catttcag	AGGCG	ACTCG	taaga
6	6559	cccaacag	ACTCC		
Spleiß Konsensussequenz		yyyincag		AG	gtragt
Intronsequenz wurde mit Kleinbuchstaben und Exonsequenz wurde mit Großbuchstaben gezeigt. r = Purinbase, y = Pyrimidinbase, n = Purin- oder Pyrimidinbase					

3.3.3 Bestimmung des Expressionsmusters

Um das Expressionsmuster des *Trps1* Gens zu bestimmen, wurde ein Northern Blot mit Gesamt-RNA aus Maus fötalem Gewebe mit der radioaktiv markierten Sonde PM67-66 (Tabelle 7.4) hybridisiert. Wie beim Mensch konnten zwei Transkripte von 7 und 10,5 kb auf der Exposition des Northern Blots detektiert werden (Abb. 3.20). Die Expression wurde in den fötalen Stadien E11, E15 und E17 festgestellt, aber nicht in E7. Am elften Tag ist das 7 kb Transkript prominent und am 17. Tag überwiegend das 10,5 kb Transkript.

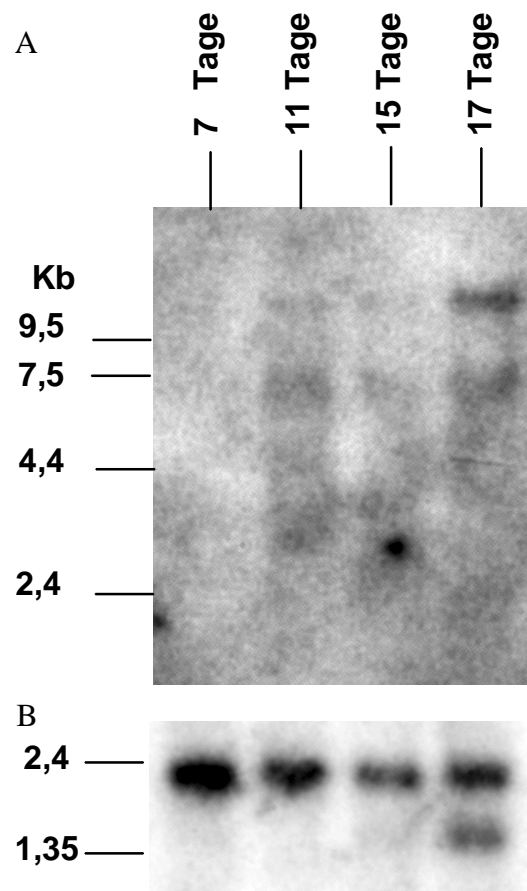


Abb. 3.20: (A) Expressionsmuster des *Trps1* Gens. Ein Northern Blot der Firma Clontech, der 2 μ g poly(A)⁺-RNA aus fötalem Mausgewebe enthielt, wurde mit der radioaktiv markierten menschlichen Sonde PM67-66 aus dem Exon 7 hybridisiert. Der Blot wurde über Nacht bei 42°C hybridisiert und mit einer Stringenz von 3xSSC/ 0.1% SDS, 50°C für 10 min gewaschen. Der Blot wurde 36 Tage exponiert. Zur Kontrolle der RNA-Qualität und -Quantität wurde der Blot mit der β -Actin Sonde rehybridisiert (B).

3.4 Erstellung eines Mausmodells

Um die Genotyp-Phänotyp Korrelation und Pathogenese bei TRPS I und III genauer zu untersuchen, begann ich mit der Generierung von Maus-Modellen. Angesichts der *Trps1* Struktur wurden aus folgenden Gründen die Maus Exons 5 und 6 für die Erstellung der Konstrukte gewählt: 1) In der DNA-Sequenz gibt es 14 ATG (Start) Kodons, von denen 5 konserviert sind. Die Startkodons könnten im Fall einer 5' Mutation bzw. Deletion benutzt werden, ohne daß ein Effekt des geänderten Allels bemerkbar wird, 2) Die Exons 5 und 6 beinhalten die GATA-Bindedomäne und die Ikaros-ähnliche Zinkfinger Domäne mit DNA- bzw. Protein-Bindungsfunktion. Die Funktion der anderen Zinkfinger ist noch nicht bekannt, 3) Die Missense-Mutationen, deren Träger schwerer als TRPS I Patienten betroffen sind, werden ausschließlich in Exon 6 gefunden (Lüdecke et al., 2001). Das Konzept, auf dem das Maus Knock-in Konstrukt basiert, war die Missense-Mutation 2701A→C (T901P) die eine schwere Ausprägung der Krankheitsmerkmale bei einem Patienten verursacht hat. In den Knock-out Konstrukten sollen die Zinkfinger-Motive in Exons 5 und 6 einzeln und zusammen deletiert werden.

3.4.1 Isolierung und Kartierung des Maus genomische λ -Phagen Klons

Ein λ -Phagen Klon (Phage Nr. 4), der Exons 5 und 6 enthielt, wurde aus einer genomischen Maus Bibliothek (siehe Material und Methoden 2.1.7.2) isoliert. Das Insert, das mit *NotI* aus dem Phagenvektor geschnitten wurde, ist 17 kb lang. Um eine physikalische Karte herzustellen und die geeigneten Fragmente subzuklonieren, wurde die Phagen-DNA für die folgende Restriktionsschnittstellen kartiert: *EcoRI*, *BamHI*, *SacI*, *XbaI*, *HindIII*, *BglII*, *EcoRV*, *XhoII*, *NcoI*. Dazu wurde die Phagen-DNA mit den genannten Restriktionsenzymen einzeln und in verschiedenen Kombinationen geschnitten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Fragmentgrößen bestimmt, das Gel geblottet und hybridisiert mit den menschlichen Sonden PM65-64 aus Exon 6 und PM67-66 aus Exon 7 und der Maus Sonde 3'UTR2+6 aus dem 3'UTR des *Trps1* (Tabelle 7.8). Die genaue Kartierung wurde nur für die Bereiche gemacht, die für die Konstrukte eine Rolle spielen (Abb. 3.21). Zwei *BamHI* Fragmente (B1 und B2) ebenso wie drei *EcoRI* Fragmente (E1, E2, E3) wurden in den pT3T7-Vektor subkloniert. Die Klone E1, E2, E3

wurden in pBluescript II KS+ umkloniert, um die Schnittstellen in der Polyklonierungsstelle nachher für die Klonierung in den *Targeting*-Vektor nutzen zu können. Das 4 kb große Insert von E1 wurde mit *EcoRI* restringiert und isoliert. Restriktionsverdau vom E1 Insert mit *BamHI* ergibt zwei Banden von 2,5 und 1,5 kb. Die 2,5 kb Bande (E1-C) (Abb. 3.23), die Exon 5 beinhaltet, hat am 5'Ende die *EcoRI* Schnittstelle und am 3'Ende die *BamHI* Schnittstelle. Bei der Isolierung der E2 und E3 Fragmente für die Klonierung in pPNT-Vektor, wurden die Fragmente aus pBluescript II KS+ (siehe Abb. 7.3) mit den Vektor Schnittstellen , *XhoI* am 5'Ende und *NotI* am 3'Ende, herausgeschnitten. Für die Isolierung des 2 kb *XbaI* (X1) Fragments, wurden eine interne Schnittstelle in dem B1 Klon und eine *XbaI* Schnittstelle in dem pT3T7 Vektor (siehe Abb. 7.2), die direkt neben der *BamHI* Schnittstelle liegt, benutzt. Das Fragment wurde zunächst in pBluescript II KS+ kloniert.

Abb. 3.21: (siehe nächste Seite) Restriktionskarte des genomischen Maus Phagen 4. Die Struktur der genomischen DNA und der Phagen DNA wurde in den Linien 1 und 2 dargestellt. Die Restriktionsstellen von *BamHI*, *EcoRI*, *SacI*, *XbaI*, *BglIII*, *HindIII*, *EcoRV*, *XhoII* und *NcoI* wurden in dem Bereich, wo die Fragmente für die Knock-out und Knock-in Konstrukte benutzt worden, bestimmt. Die starken Linien stellen die klonierten Fragmente dar.

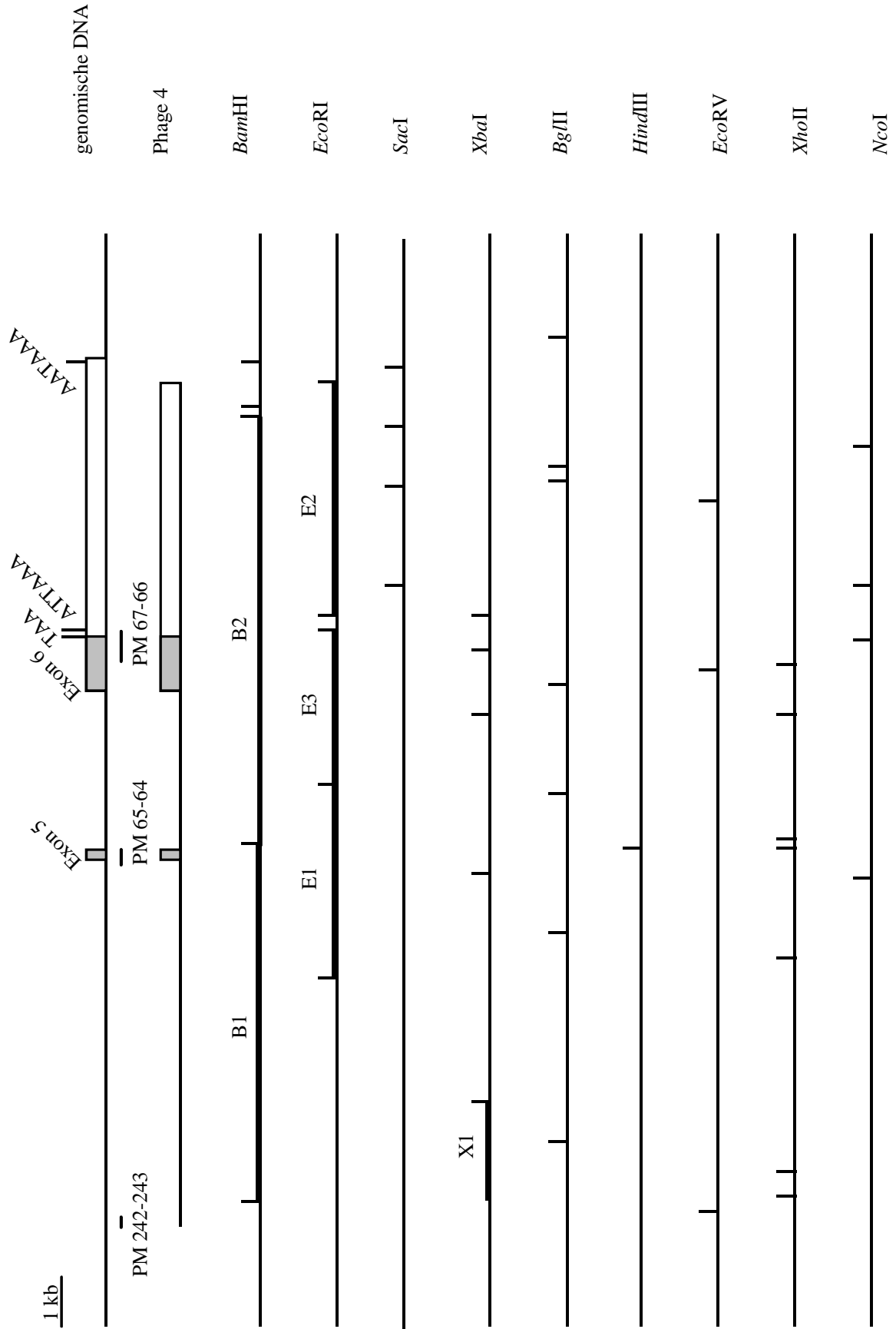


Abb. 3.21: Legende siehe nächste Seite.

3.4.2 Klonierung der Mauskonstrukte

Homologe Rekombination zwischen der DNA Sequenz eines Chromosoms und einer eingeführten klonierten DNA Sequenz (*gene targeting*) ermöglicht den Transfer jeder beliebigen modifizierten DNA-Sequenz in das Genom einer lebenden Zelle (Capecchi, 1989). Ein *Targeting* Vektor dient als ein Vehikel, um die homologe DNA in die Zelle zu bringen, zu rekombinieren und einen spezifischen Chromosomenlokus zu mutieren. Für die Erstellung der geplanten Knock-out und Knock-in Konstrukte wurde der Vektor pPNT (Sequenz 7.1) verwendet. Der pPNT ist ein sogenannter *replacement* Vektor. Ein *Replacement Targeting* Vektor beinhaltet drei fundamentale Komponenten: 1) Sequenzen, die homolog zu dem Ziellokus sind, 2) einen positiven und einen negativen Selektionsmarker, um die rekombinierten Produkte besser isolieren zu können, und 3) einen bakteriellen Plasmidvektor. Die Rekombination durch den *replacement* Vektor ist in der Abb. 3.22 schematisch dargestellt worden. Im Prinzip werden die Fragmente, die zur Rekombination benutzt werden (homologe Sequenzen), flankierend zum Neomycin Gen (*neo*), einem positiven Selektions-Marker, kloniert. Der Vektor beinhaltet einen negativen Selektionsmarker, *HSV* (herpes simplex virus) *tk* (*thymidine kinase*) Gen. Der negative Selektionsmarker hilft zwischen homologer rekombination und einfacher Integration zu unterscheiden. Die *neo* und *HSV tk* Gene werden durch dem *PGK-1* Promoter und Terminator flankiert. Die *neo*-Kassette besteht aus dem *neo*-Gen und dem flankierenden *PGK-1* Promoter und Terminator. Das bakterielle Plasmid hat Ampicillin-Resistenz. Das 5'homologe Fragment wird in die Polylinkerstelle inkloniert, die die Restriktionsstellen von *EcoRI*, *ApoI*, *KpnI*, *Asp718*, *BamHI* und *XbaI* beinhaltet. Das 3'homologe Fragment wird in *XhoI* und *NotI* Schnittstellen kloniert (Abb. 7.1 Vektor). Die einzige *NotI* Schnittstelle dient außerdem zur Linearisierung des Vektors vor der Transfizierung.

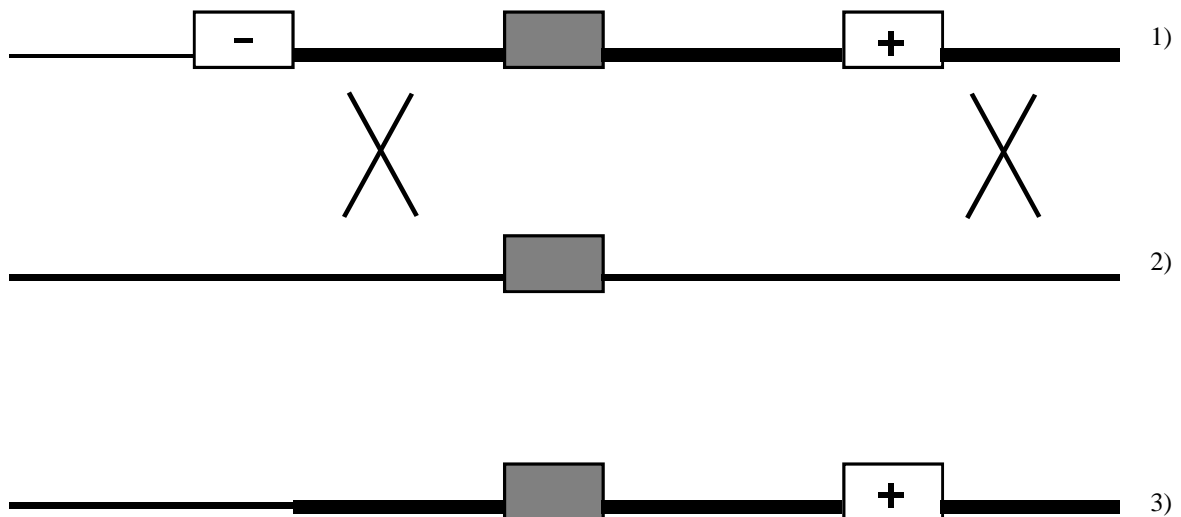


Abb. 3.22: Rekombination von einem *Replacement* Vektor. 1) Der Vektor wird vor der Transfizierung außerhalb der homologen Region linearisiert. Die dünne Linie stellt das bakterielle Plasmid dar und die starke Linie die homologe Region. Das graue Quadrat ist ein Exon, das Quadrat mit + ist der positive Marker und das mit - Zeichen ist der negative Marker. 2) X präsentiert *Cross-over* und die mittelstarke Linie präsentiert den Ziel-Lokus in dem Chromosom mit dem Exon. 3) Durch das *Gen-Replacement* wird das homologe Fragment im Chromosom durch das homologe Fragment aus dem Vektor ersetzt.

3.4.2.1 Knock-out Konstrukt 1

Ziel der Erstellung dieses Konstruktes ist es, ein Null-Allel zu kreieren, das durch das Deletieren der Exons 5 und 6, die den DNA-bindenden und zwei putative Protein-bindende Zinkfinger kodieren, realisiert wird. *Nonsense-mediated mRNA-decay* Mechanismus könnte Degradation des trunkierten mRNAs verursachen. Da in diesem Fall die Zellen nur die Hälfte des Proteins beinhalten, könnte ein Effekt von Haploinsuffizienz zu erwarten sein. Durch die Deletion dieser Exons wird ein Protein synthetisiert, das weder an die DNA binden kann, noch an andere Proteine. Außerdem fehlen dem Protein die Kernlokalisierungssignale (NLS). Falls das trunkierte Protein exprimiert wird, kann es nicht in den Kern transportiert werden. Die homozygoten Knock-out Mäuse werden vermutlich einen schweren Phänotyp zeigen oder gar nicht überlebensfähig sein.

Am 5'Ende dieses Konstrukts wird das *XbaI*-Fragment X1 mit den Schnittstellen *XbaI-XbaI* in pPNT kloniert (Abb. 3.23). Am 3'Ende wurde das E2 Fragment mit der *XhoI* Schnittstelle an der 5'Seite und *NotI* Schnittstelle an der 3'Seite, kloniert. Um die korrekte Klonierung verifizieren zu können, wurden das *XbaI*-Fragment mit 7 Primer (Tabelle 7.9),

die *neo*-Kassette mit 4 Primern (Tabelle 7.10) und das E2 Fragment mit den Primern aus der Tabelle 7.6 sequenziert. Der Abstand zwischen X1- und E2 Fragment bzw. die Größe der deletierten Region ist etwa 9,5 kb. Diese wird durch 1,8 kb *neo*-Kassette ersetzt. Im Fall einer homologen Rekombination ist das mutierte Allel 8 kb kürzer als das Wildtypallel. Zum Durchmustern der ES Zellen muß die DNA mit einem Enzym restringiert werden, das mindestens eine Schnittstelle außerhalb der homologen Region hat. Wie es aus der Kartierung des Phagen Nr. 4 und Hybridisierung der Sonden PM242-243, PM 65-64, PM67-66 hervorgeht, liegen die drei Sonden auf einen 15 kb *SacI* Fragment, dessen 3'Ende im E2 Fragment liegt (Abb. 3.21). Eine homologe Rekombination mit dem Knock-out Konstrukt 1 zum Beispiel würde nach *SacI*-Verdauung und Hybridisierung mit Sonde PM242-243 durch eine 8 kb Bande neben der 15 kb Wildtypbande angezeigt. Bis jetzt sind über 200 ES Klone untersucht worden und keine rekombinante Bande wurde erkannt (Abb. 3.24).

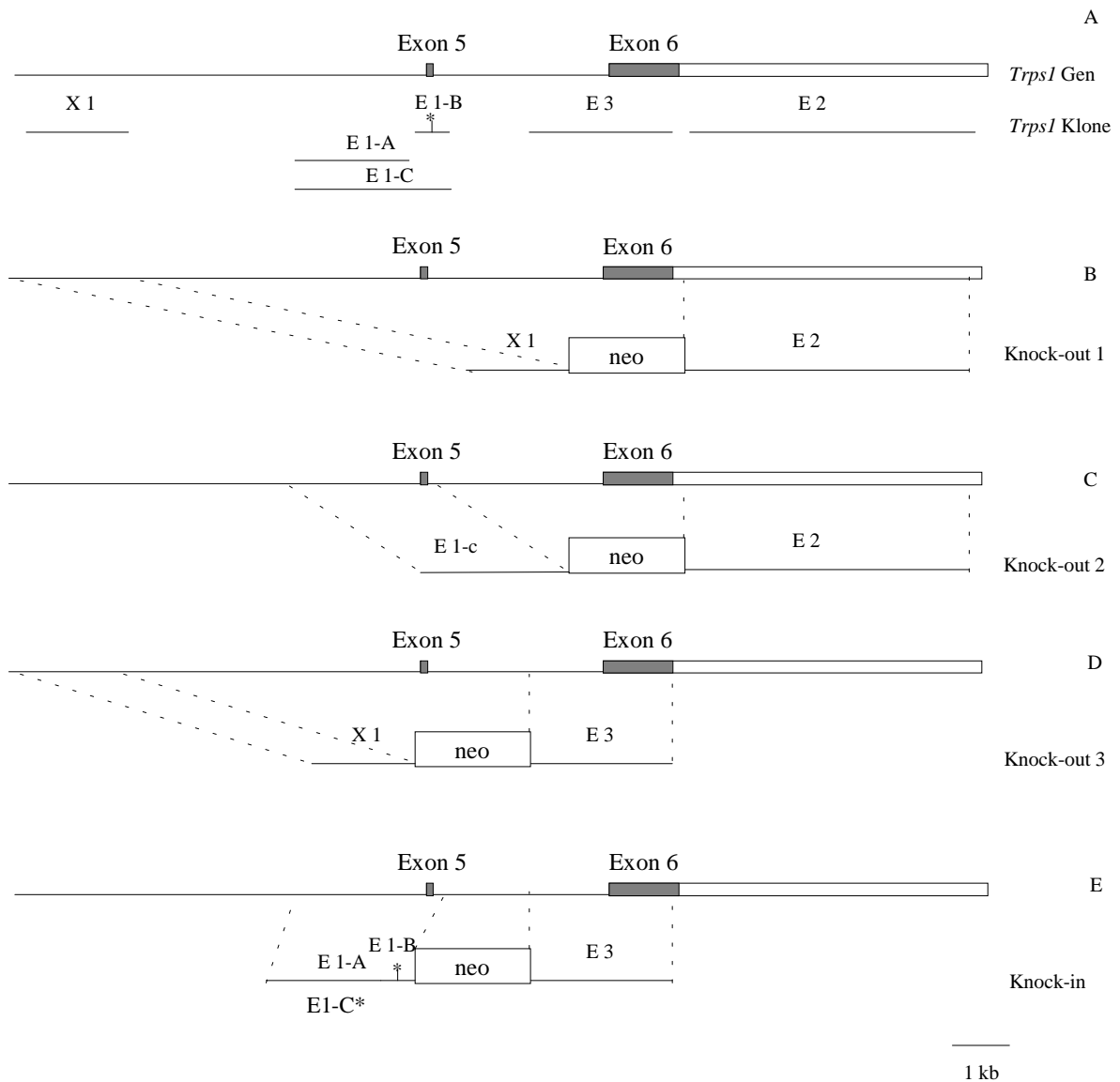


Abb. 3.23: Schematische Darstellung der 3 Knock-out Konstrukte und 1 Knock-in Konstrukt. A) Darstellung von 17 kb 3' Ende der genomische Struktur von *Trps 1* und der klonierten Fragmente. X1: *Xba*I Fragment 2 kb. E1-A: E1 *Eco*RI/*Nco*I Fragment 1,8 kb. E1-B: PM215-216 *Nco*I/*Bam*HI Fragment 625 bp. E1-C: E1 *Eco*RI/*Bam*HI Fragment 2,5 kb. E1-C*: das Ligationsprodukt von E1-A und E1-B, *Eco*RI/*Bam*HI Fragment. E3: E3 Fragment *Xho*I/*Not*I 2,5 kb. E2: E2 Fragment *Xho*I/*Not*I 5kb.

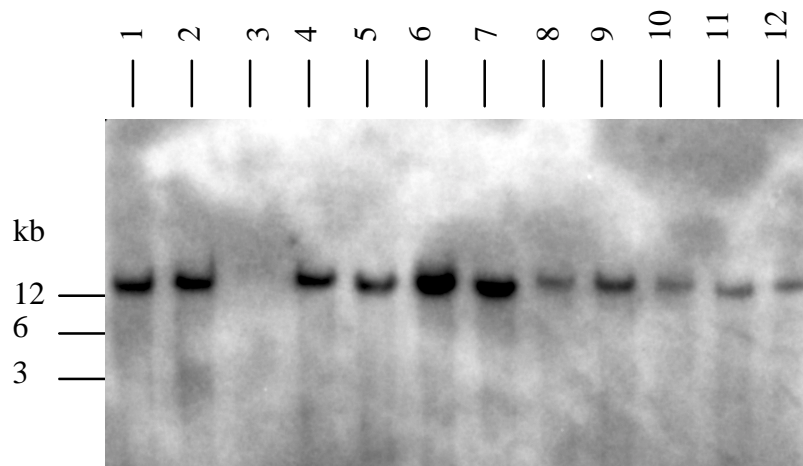


Abb. 3.24: *SacI* restringierte ES-Zellen DNA von Knock-out 1 Klonen 1-10 wurden auf einem 0.8%igen Agarosegel getrennt, geblottet und mit der Sonde PM242-243 hybridisiert. Die Wildtypbande ist 15 kb. Es wurde keine rekombinante Bande von 8 kb gefunden.

3.4.2.2 Knock-out Konstrukt 2

Ziel der Erstellung dieses Konstrukts ist die Deletion von Exon 6 mit den Ikaros-ähnlichen Zinkfingern mit vermeintlich Protein-bindender Funktion (Abb. 3.23). In Knock-out Konstrukt 2 wurde das Fragment E1-C Fragment *EcoRI*-*Bam*HI-verdaut und in pPNT, 5' Seite der *neo*-Kassette kloniert. Das E1-C Fragment wurde mit Primern, (Tabelle 7.13) teilweise sequenziert. Im zweiten Schritt sollte das E2 Fragment an die 3'Seite der *neo*-Kassette, wie es bei dem Knock-out 1 beschrieben ist, kloniert werden. Der Abstand zwischen E1-C Fragment und E2 Fragment auf genomischer Ebene ist etwa 4,2 kb. Dieser Bereich wird in Knock-out Konstrukt 2 durch das 1,8 kb große *neo*-Kassette ersetzt. Eine homologe Rekombination mit dem Knock-out Konstrukt 2 zum Beispiel würde nach *SacI*-Verdauung und hybridisierung mit Sonde PM242-243 durch eine 12,5 kb Bande neben der 15 kb Wildtypbande angezeigt. Der zweite Klonierungsschritt, in dem E2 Fragment kloniert werden sollte, war nicht im Zeitraum dieser Arbeit möglich.

3.4.2.3 Knock-out Konstrukt 3

Ziel der Erstellung von Knock-out Konstrukt 3 ist das Deletieren von Exon 5, das den GATA Zinkfinger (Abb. 3.23C) beinhaltet. Im Fall einer homologen Rekombination wird aus dem mutanten Allel ein Protein gemacht, das durch den Ikaros-ähnlichen Zinkfinger in Exon 6, an ein anderes Protein bindet, ohne an die DNA binden zu können. Dieses Konstrukt repräsentiert die Spleißmutation (IVS6+1G→T), die bei einer Patientin mit TRPS I gefunden wurde (siehe 3.2.4.1). Dadurch wird außerdem eine NLS zerstört. In diesem Konstrukt wurde das *Xba*I-Fragment X1 wie in Knock-out Konstrukt 1 an die 5´Seite der *neo*-Kassette kloniert. An der 3´Seite der *neo*-Kassette wurde das 2,5 kb umfassende *Eco*RI Klon, E3, der in pBluescript II KS+ kloniert ist, durch eine *Xho*I-Schnittstelle am 5´-Bereich des Polylinkers und eine *Not*I Schnittstelle im 3´-Bereich herausgeschnitten, aufgereinigt und kloniert. Korrekte Klonierung wurde durch die Sequenzierung von dem X1 Fragment mit 7 Primern (Tabelle 7.9), der *neo*-Kassette mit 4 Primern (Tabelle 7.10) und dem E3-Fragment mit 6 Primern (Tabelle 7.12), verifiziert. Für das Durchmustern potentieller rekombinanter ES-Zellen wurden die beiden *Sac*I Schnittstellen außerhalb des Konstrukts genutzt. Der genomische Abstand zwischen X1 und E3 Fragment ist etwa 9,5 kb. Wenn das Konstrukt nach der Transfizierung in ES Zellen in dem Chromosom rekombiniert wird, ist das mutante Allel 7,7 kb kleiner als das Wildtypallel. Das bedeutet, daß die Sonde PM242-243 in einem rekombinanten ES-Zellklon zwei Banden von 15 kb (Wildtypallel) und 7,3 kb (mutantes Allel) erkennen würde. Bis jetzt wurden keine rekombinante ES-Zellklone gefunden.

3.4.2.4 Knock-in Konstrukt

In dem Knock-in Konstrukt wurde die Missense-Mutation des am schwersten betroffenen TRPS III Patienten (Vilain et al., 1999; Lüdecke et al., 2001) eingeführt. Die Mutation T901P ändert Threonin, eine polare Aminosäure, zu Prolin, einer ungeladenen Iminosäure, die in der Sekundärstruktur eines Polypeptids eine Biegung verursacht. Um die Mutation in einem Fragment einzuführen wurden 4 PCR Primer, PM201, 202, 203 und 204, ausgesucht. Das PCR-Produkt PM201-202 beinhaltet eine *Nco*I-Schnittstelle in dem Fragment und eine *Xho*II-Schnittstelle in dem Primer. Der Primer PM203 beinhaltet eine *Xho*II-Schnittstelle und die Basensubstitution 2701A→C. Primer PM204 beinhaltet eine

*Bam*HI Schnittstelle (Abb. 3.25). Die PCR-Produkte PM201-202 und PM203-204 wurden mit *Xho*II restringiert. Die Produkte wurden in Microcon-Röhrchen aufgereinigt und die Fragmente wurden miteinander ligiert. Da das Ligationsprodukt nicht aus dem Gel isoliert werden konnte, wurde mit den Primern PM215 und PM216 eine PCR an dem Ligationsansatz durchgeführt. Das PCR-Produkt PM215-216 wurde sequenziert, um die Einfügung der Mutation und Erhaltung des Leserasters zu kontrollieren (für die Primer Sequenzen siehe Tabelle 7.13). Anschließend wurde das Produkt E1-B (Abb. 3.23) mit *Nco*I und *Bam*HI restringiert und um das Fragment zu propagieren, wurde es in den pET-32b Vektor kloniert (siehe Abb. 7.4). Da die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination bei solch kurzen Fragmenten wie PM215-216 (E1-B) zu gering ist, wurde das Fragment durch die Ligation mit dem E1-A Fragment (Abb. 3.23) auf 2,5 kb verlängert. Das 2,5 kb große Ligationsprodukt E1-C* mit *Eco*RI und *Bam*HI Enden wurde anschließend in den pPNT Vektor kloniert. Im Zeitraum dieser Arbeit, konnte ich nicht das E3 Fragment in den pPNT Vektor, der E1-A+E1-B* (E1-C*) enthält, klonieren.

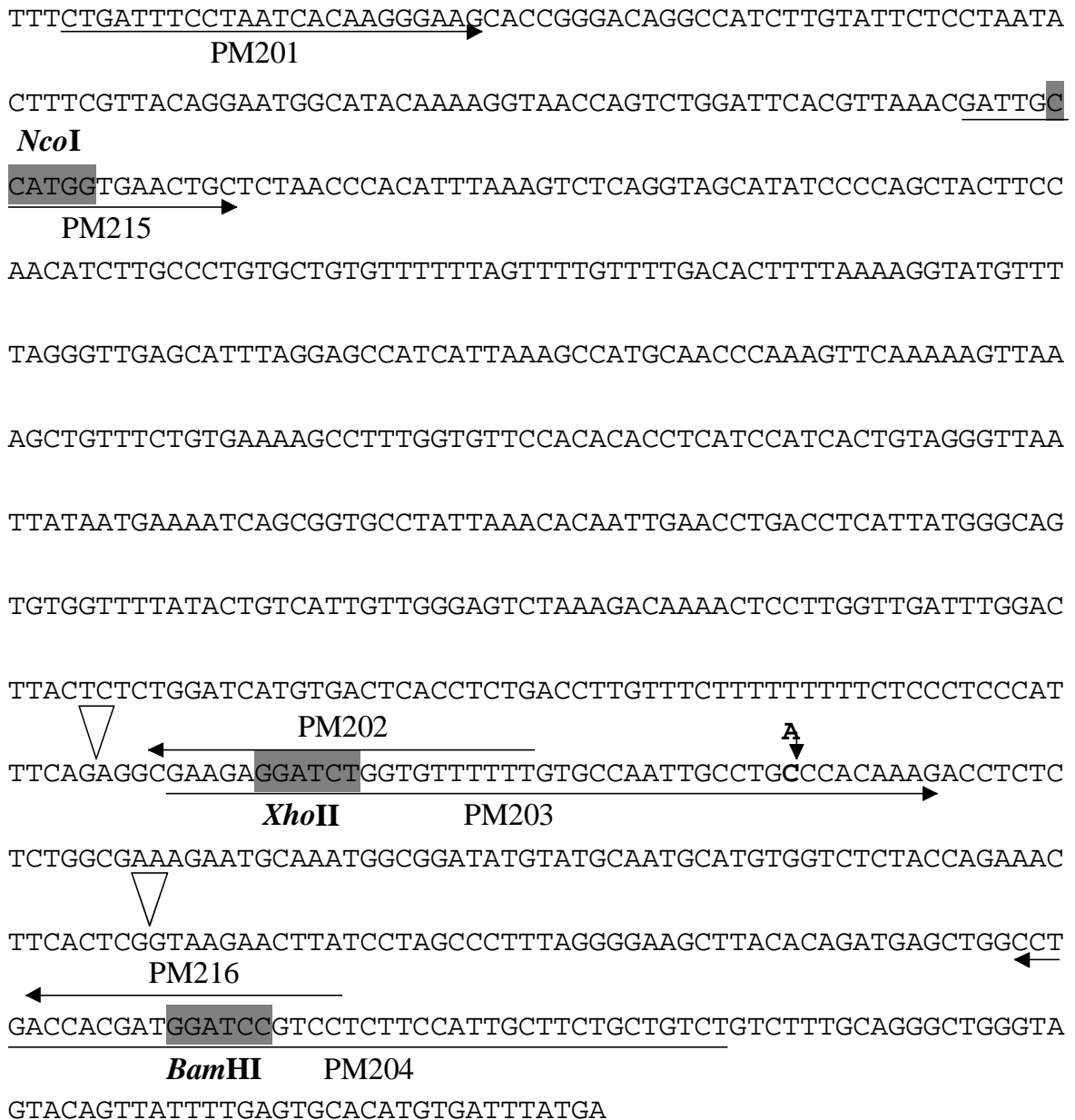


Abb. 3.25: *Trps1* Exon 5 und flankierende Introns. *NcoI*, *XhoII* und *BamHI*-Schnittstellen sind grau schattiert. Die Primerpositionen sind durch Pfeile markiert. Anfang und Ende des Exons werden ebenfalls durch die Pfeile gekennzeichnet. Der Basenaustausch A→C ist fettgedruckt.

4. Diskussion

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die TRPS I minimale Region definiert (Lüdecke et al., 1995) und ein Contig aus PAC Klonen (PAC 8-7 Contig, Abb. 1.2) erstellt worden. Anhand der Sequenzen des PAC-Contigs wurde versucht, Exons zu isolieren und miteinander zu verbinden. Da das *TRPS1* Gen nicht in dem Contig enthalten war, wurden drei PAC Klone proximal zu dem vorhandenen Contig isoliert, die außerdem den Translokationsbruchpunkt bzw. Inversionsbruchpunkt der Patienten KS2166 und HB11480 überspannten (Momeni et al., 2000). Computeranalyse und Datenbanksuche ermöglichten die Bestimmung von ORFs. RT-PCR und das Durchmustern einer cDNA Bibliothek aus dem fötalen Gehirn trugen zur Isolierung der Exons und Bestimmung der Genstruktur bei. Die Identifizierung der Mutationen in der DNA der TRPS I Patienten bewies, daß das isolierte Gen *TRPS1* ist. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Isolierung des Maus *Trps1* Gens und der Erstellung eines Mausmodells.

4.1 Analyse von PAC 8

Der 160 kb große Klon PAC 8, am proximalen Ende von Contig PAC 8-7 gelegen, wurde ausführlich analysiert (siehe 3.1.1). Das Computerprogramm RUMMAGE hatte aufgrund der vorgegebenen Parameter Strukturen wie Promotor, Repeats, Exons, Gencluster, Proteinmotive und CpG-Inseln vorhergesagt (Abb. 3.1). Anhand der Computeranalyse wurde versucht, die Daten experimentell zu bestätigen und die Exons zu isolieren und als eine cDNA miteinander zu verbinden, allerdings ohne Erfolg. Aus den 107 vorhergesagten Exons wurden 31 analysiert, die in keinem Repeat lagen und zu einem Gencluster gehörten. Durchgeführte Versuche zeigten, daß einige der putativen Exons auf dem Southernblot ein repetitives Muster zeigten, obwohl sie laut Computeranalyse in keinem Repeat lagen. Viele dieser Sequenzen waren nicht in anderen Säugetieren konserviert. Von den 31 Exons zeigten zwei Signale auf dem Northernblot, die auf eine Expression hinwiesen. Andere Verfahren wie RT-PCR und Durchmustern von cDNA-Bibliotheken wurden durchgeführt, um die Exons miteinander zu verbinden, was aber zu keinem positiven Ergebnis führte.

4.2 Das Expressionsprofil des *TRPS1* Gens

Die 7 Exons des *TRPS1* Gens sind auf 310 kb genomische Sequenz verteilt. Obwohl die Promotorstruktur des Gens noch nicht vollständig untersucht worden ist, kann man eine GC-reiche Region in dem 800 bp Bereich upstream des Exon1 erkennen. In Säugetieren kommen die GC-reichen Regionen, die sogenannten CpG-Inseln, in Transkriptionsstartstellen bei etwa 50% der Gene vor (Antequera und Bird, 1999). Die CpG Inseln sind häufig mit *house keeping* Genen assoziiert. Obwohl die CpG Dinukleotide Ziel der Methylierung sind, sind CpG Inseln unmethyliert. Dadurch werden die *house keeping* Gene in einem transkriptionell-aktiven Zustand gehalten. In dem GC-reichen 5'-Bereich des *TRPS1* Gens befindet sich außerdem eine Sp1-Bindungstelle. Die Sp1-Bindungsstellen liegen mitten in CpG-Inseln und sind für den unmethylierten Zustand der CpG-Inseln erforderlich (Brandeis et al., 1994). Diese Struktur an der 5'UTR des Gens deutet daraufhin, daß *TRPS1* ubiquitär exprimiert wird.

In den Expressionsanalysen, die ich im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemacht habe, konnte ich die Expression nur in fötalem Gehirn, Lunge und Niere nachweisen (Abb. 3.6). Auf dem Northernblot mit verschiedenen adulten Geweben, die mit *TRPS1* Sonden hybridisiert wurden, waren keine Signale zu sehen. Das kann aber auf die geringe Expression des Gens in adulten Geweben oder die schlechte Qualität der Blots zurück zu führen sein.

In einer unabhängigen Studie wurde das *TRPS1* Gen aus einer Prostata cDNA-Bibliothek isoliert (Chang et al., 2000). Um die Expression des Gens zu bestimmen, haben Chang et al. einen Dot-Blot, der RNA aus verschiedenen menschlichen Geweben beinhaltet, mit einer Gen-spezifischen Sonde hybridisiert. Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen konnte man Expression bei adulten Geweben nachweisen. Die Expression in fötalen Geweben war allerdings niedriger als in adulten Geweben.

In einer funktionellen Studie über das *TRPS1* Gen haben Malik et al. die Expression des Gens durch Northernblot Analyse und *in situ*-Hybridisierung in der Maus untersucht (Malik et al., 2001). In Mausembryonen wurde die *TRPS1* mRNA vor E 7,5 detektiert, mit der höchsten Expression bei E11,5. Northernblot Analyse zeigte die höchste Expression bei E13,5 im Gesicht und Gliedmaßen, die aber später drastisch abnimmt. Die *in situ*-Hybridisierungs Experimente haben intensive Expression bei E12,5 in Maxille, Mandibel

und Schnauze, so wie eine hohe Expression bei E12,5 und E13,5 in künftigen Phalangen, femoralem Kopf und zu entwickelnder Hüfte gezeigt. Außerdem wird die *TRPS1* mRNA, in Haarfollikeln hoch exprimiert (Malik et al., 2001). Dieses Expressionsprofil, mit höchster Expression in fötalen Geweben, weist darauf hin, daß der TRPS Phänotyp durch die Expression des defekten Gens in embryonalen Stadien verursacht wird. Da die Knochenfehlbildungen, bei den Patienten mit TRPS I und III, erst mit dem zunehmenden Alter nachweisbar werden, ist die Rolle der *TRPS1*-Expression in fötalen und adulten Geweben noch nicht vollkommen klar.

Eine Suche in der EST Datenbank mit der *TRPS1* Sequenz ergibt 138 Treffer, die in der Abbildung 3.9 in vier Cluster zusammengefaßt sind. EST-Klone aus den adulten Geweben wie Prostata, Magen, Brust, sowie in Gehirn von Kleinkind zeigen, daß eine Expression auch in adulten und kindlichen Geweben stattfindet, obwohl sie wahrscheinlich so gering ist, daß sie auf dem Northernblot mit adulten Geweben nicht nachweisbar war. Es war nicht möglich, Erkenntnisse über die Höhe der Expression in verschiedenen Geweben zu erhalten, weil die EST-Bibliotheken durch den Prozess der Normalisierung die Konzentration mancher mRNAs nivellieren (Beaudoing et al., 2000).

Der 5500 bp große 3'UTR des *TRPS1* Transkripts beinhaltet 16 Kopien von AUUUA Signalen. Die AUUUA Motive, bekannt als die mRNA Degradationssignale, sind Ziele von Endonukleasen (Jarrousse et al., 1999). Die Degradation der mRNA Moleküle ist eine wichtige Posttranskriptionskontrolle, die das mRNA-Niveau bzw. Protein-Niveau reguliert. Die entwicklungsregulierenden mRNAs der Proteine wie Transkriptionsfaktoren werden unter präziser Wahl des richtigen Zeitpunktes exprimiert und degradiert.

Der 3'UTR des *TRPS1* Transkripts hat 6 Polyadenylierungssignale. Das erste Signal, AUUAAA, ist ein nicht klassisches Signal, das 81 bp hinter dem Stopkodon liegt. Zwei Polyadenylierungssignale, die an den Positionen 9348-9353 und 6190-6195 liegen (Abb. 3.10) sind konserviert und sind in Übereinstimmung mit der Größe der zwei Transkripte auf dem Northernblot (Abb. 3.6). In 77,7% der mRNAs gibt es ein Polyadenylierungssignal und 22,3% haben zwei oder mehr Signale (Gautheret et al., 1998). Die AAUAA Signale sind in 58,2% und die AUUAAA Signale in 14,9% der mRNAs vorhanden. Zusammen stellen sie die am häufigsten benutzten Signale dar (Beaudoing et al., 2000). Die Auswahl der Polyadenylierungsstellen beeinflußt die Stabilität, Translationseffizienz, oder Lokalisierung der mRNA in einer Gewebe- oder Krankheitsspezifischen Art (Edwards-

Gilbert et al., 1997). Auf dem Northernblot (Abb. 3.6) konnte man keinen Expressionsunterschied zwischen den zwei Transkripten in einzelnen Geweben feststellen. Eine Studie über die alternativen Polyadenylierungsstellen in verschiedenen menschlichen Genen zeigt, daß die am 3'-Ende gelegenen AAUAAA Signale am häufigsten genommen werden (Beaudoing et al., 2000), aber die 10,5 kb *TRPS1* RNA beinhaltet 16 Kopien des AUUUA Signals gegenüber 6 Signalen beim 7 kb Transkript die zu einer höheren Labilität des langen Transkripts führen können.

4.3 Das TRPS1 Protein

Die Struktur des TRPS1 Proteins läßt vermuten, daß es sich um einen Transkriptionsfaktor mit multiplen Zinkfingermotiven handelt. Transkriptionsfaktoren haben zwei Funktionen: 1) Bindung an eine DNA-Sequenz, die sogenannten cis-acting Elemente, 2) Bindung an RNA Polymerase und andere Protein Cofaktoren. Die Transkriptionsfaktoren sind zweiteilige (bipartite) Moleküle, die DNA-bindende und Protein-bindende Domänen haben (Semenza, 1999). Der Zinkfinger ist ein Motiv mit vier Aminosäuren, meist zwei Cysteine und zwei Histidine, oder vier Cysteine, die Zn^{2+} chelatisieren. Die Zinkfinger-Domänen haben vermutlich sowohl DNA-bindende Funktion (GATA Familie) als auch Protein-bindende Funktion (IKAROS Familie).

Das TRPS1 Protein beinhaltet 9 Zinkfinger aus vier verschiedenen Klassen. Die ersten drei Zinkfinger haben die Konsensussequenz $C_2X_{14}H_2$ ohne Ähnlichkeit in der Proteindatenbank. Die Zinkfinger 4-6 haben die Konsensussequenz $C_2X_{12}H_2$. Die Zinkfinger 4 und 6 zeigen Ähnlichkeit zu Zinkfingern aus der Proteindatenbank. Zinkfinger vier zeigt Ähnlichkeit zu einem humanen Zinkfinger Protein ZHX1 und Maus Zhx1 (Barthelemy et al., 1996). Zinkfinger 6 hat Ähnlichkeit zu W04B5.2, einem hypothetischen Protein aus *Caenorhabditis elegans* und CG18353, ein Genprodukt aus *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000). Der Zinkfinger 7 hat eine Cys- X_2 -Cys- X_{17} -Cys- X_2 -Cys Struktur mit 238 Treffern in der Proteindatenbanksuche die ausschließlich zur GATA-bindenden Familie gehören. Die GATA Familie der Transkriptionsfaktoren hat 6 Mitglieder, GATA-1, -2, -3, -4, -5, -6 (Orkin, 1992; Weiss und Orkin, 1995), die alle eine Cys- X_2 -Cys- X_{17} -Cys- X_2 -Cys Topologie und eine hohe Affinität zu der DNA-Sequenz (A/T)GATA(A/G) haben (Orkin, 1992; Weiss und Orkin, 1995). GATA-1, -2, -3 bilden eine Subgruppe, die im hämatopoetischen System stark exprimiert wird, GATA-4, -5, -6 bilden die zweite Subgruppe, die in Herz und Darm exprimiert wird. GATA-1 wird in

Erythrozyten Vorläuferzellen exprimiert und die gezielte Unterbrechung des Gens führt zur Hinderung der Hämatopoese in Proerythroblasten (Pevny et al., 1995; Weiss et al., 1994). GATA-2 wird ebenfalls in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und auch dessen Deaktivierung inhibiert die normale Hämatopoese (Tsai et al., 1994). Durch das Fehlen von GATA-3 wird die Hämatopoese beeinträchtigt (Pandolfi et al., 1995). Das GATA-4 Transkript wird in präkardialen Zellen und in fötalem und postnatalem Herzen, sowie adultem Herz und Gonaden detektiert (Grépin et al., 1994). Das Expressionsmuster von GATA-4 im Myokardium des sich entwickelnden Herzens überlappt mit dem von GATA-6. GATA-6 wird überwiegend in Magen und Dünndarm von Vögeln, Amphibien und Säugetieren exprimiert (Jiang und Evans 1996; Laverriere et al., 1994; Tamura et al., 1993). Im Embryo befinden sich die GATA-5 Transkripte überwiegend im Herzen, nehmen aber im postnatalen Herz drastisch ab. Die Expression von GATA-5 nimmt während der Entwicklung der postnatalen Lunge und Darm zu (Nemer et al., 1999). Die GATA-ähnliche Zinkfinger Domäne, wird vom TRPS1 Exon 6 kodiert und hat die größte Ähnlichkeit mit dem menschlichen GATA-3 Transkriptionsfaktor (Abb. 3.5). TRPS1 unterscheidet sich von allen anderen Vertebraten GATA-Proteinen dadurch, daß das Protein einen einzigen GATA-ähnlichen Zinkfinger hat. Die Gel Mobility Shift Assays haben gezeigt, daß TRPS1 durch den GATA-ähnlichen Zinkfinger, sequenzspezifisch an GATA Sequenzen binden kann. Änderungen in diesem Zinkfinger verhindern die DNA-Bindung (Malik et al., 2001).

Flankierend zu dem GATA-bindenden Zinkfinger befinden sich zwei potenzielle NLS Motive. Der erste, (LRRRRG) befindet sich an Position 886-891 und der zweite, (RRRTRKR), an Position 946-952 (siehe Abb. 3.10). Die NLS sind hoch basische Hexa/Heptapeptide, die an die speziellen Transportermoleküle, die im Zytoplasma vorhanden sind binden. Durch ihre Wechselwirkung mit den Kernporen werden große Proteine wie Transkriptionsfaktoren, durch aktiven Transport in den Kern befördert (Boulikas 1994). Malik et al. haben in ihrer Studie gezeigt, daß das TRPS1 Protein hauptsächlich im Kern lokalisiert ist (Malik et al., 2001)

Die in Exon7 kodierten Zinkfinger 8 und 9 sind vom $CX_2CX_{12}HX_3H$ Typ und befinden sich sieben Aminosäuren voneinander entfernt. Die beiden Zinkfinger haben 1241 Treffer in der Proteindatenbanksuche. Die größte Ähnlichkeit besteht zu dem C-terminalen Zinkfinger des IKAROS Transkriptionsfaktors. Das Ikaros Gen ist ein wichtiger Regulator für die Differenzierung der Lymphozyten, es besitzt verschiedene Spleiß-Isoformen, dessen

Krüppel-ähnliche Zinkfinger zwei Domänen bilden (Sun et al., 1996). Die Anzahl der N-terminalen Domänen, die an das DNA-Motiv GGGA binden, unterscheiden sich in verschiedene Isoformen. Im Gegensatz dazu sind die zwei C-terminalen Zinkfinger, die eine Proteinbindungsfunktion haben, in allen Ikaros Isoformen gleich (Sun et al., 1996). Ikaros bildet Homo- und Heterodimere zwischen verschiedenen Isoformen die ihre Affinität zu DNA und infolge die Transkriptionsaktivität steigert (Sun et al., 1996).

Ikaros ist ein lymphoid-assoziiertes Faktor, der an bestimmten Positionen im zentromerischen Heterochromatin lokalisiert ist. Es gibt eine starke Korrelation zwischen diesen Positionen im zentromerischen Heterochromatin und transkriptionell-inaktiven Genen im Kern der Säugezellen (Brown et al., 1997). Das beweist, daß die physikalische Interaktion von einem Gen mit dem zentromerischen Heterochromatin, die Transkription reprimieren kann. Da die Ikaros-Bindungsstellen in zentromerischen Sequenzen der Maus selten sind, konnte die zentromerische Lokalisierung durch die Protein-Cofaktoren, die direkt an die DNA binden, vermittelt werden. Es sind zwei Polycomb-Gruppen Proteine, die in Maus Lymphozyten mit Ikaros interagieren. Die Tatsache, daß Polycomb in Verbindung mit Heterochromatin-ähnlichen Domänen wie Ultrabiothorax und abdominal-A Gen (Strutt et al., 1997) mit GAGA Faktor interagieren kann, ist ein Hinweis darauf, daß Ikaros Proteine möglicherweise in zentromerischen Domänen lokalisiert sind. Die hohe Ähnlichkeit zwischen Ikaros und Hunchback (Georgopoulos et al., 1992; Hahm et al., 1994), ein Protein das eine Rolle bei der Rekrutierung von Polycomb und Etablierung von repressorischen Komplexen (silencing complexes) spielt, bestätigt diese Theorie (Brown et al., 1997). Die komplexe Störung der Lymphoidentwicklung in Ikaros-targeted Mäusen (Georgopoulos et al., 1994; Wang et al., 1996), könnte an unzureichender Repression bzw. Derepression der Gene liegen die normalerweise inaktiv sind. Der dominante Effekt der Mutationen in hemizygoten Mäusen kann in der Anhäufung der mutierten Ikaros Proteine, die nicht an die DNA binden können und zentromerische Rekrutierung stören, zurückzuführen sein (Winwandy et al., 1995).

TRPS1 ist das einzige Vertebraten GATA Protein, das statt Transkriptionsaktivator, ein sequenzspezifischer Transkriptionsrepressor ist (Malik et al., 2001). Co-Transfektionsexperimente mit Maus- und Xenopus-TRPS1 haben gezeigt, daß diese Proteine die Expression der Gene die durch GATA4 aktiviert werden, reprimieren und zwar ist die Repression abhängig von der Menge des Proteins. Die Transkriptionsrepression durch TRPS1 kann sich nur mit einem intakten GATA Zinkfinger

und im Kontext von GATA Cis-Elementen ereignen. Die Bindung des Proteins an die DNA wird durch den GATA Zinkfinger erzielt. Da die Deletion der ersten 800 Aminosäuren des Proteins wahrscheinlich keine Rolle spielt, wurde die Repressionsfunktion an die zwei C-terminalen Zinkfingern, die Ikaros-ähnlichen Zinkfinger, zugeschrieben. Die Experimente können beweisen, daß TRPS1 ohne Ikaros-ähnlichen Zinkfinger an die DNA binden kann, kann aber nicht die Repression des Zielgens in Gang setzen (Malik et al., 2001).

Solche Strukturen mit multiplen Zinkfingern sind schon bei anderen Proteinen wie CTCF berichtet worden (Baniahmad et al., 1990). CTCF ist ein DNA-bindendes Protein mit elf Zinkfingern und regulatorischer Funktion. CTCF hat transkriptionelle Aktivität wenn es an den Promotor des Amyloid β Protein Vorläufers bindet (Vostrov und Quitschke 1997) und eine Repressionsaktivität, wenn es an Stellen im c-myc Oncogen bindet (Filippova et al., 1996).

4.4 Mutationsanalyse der Patienten mit TRPS

Im Rahmen meiner Arbeit, wie im Abschnitt 3.2.3 beschrieben, wurden die DNA-Proben von 10 Patienten untersucht und sechs Mutationen isoliert (Momeni et al., 2000). In unserem Institut wurde von Dr. Lüdecke eine umfassende Untersuchung der TRPS I und III Patienten durchgeführt. In dieser Arbeit wurden 57 Patienten einschließlich der 10 Patienten der vorliegenden Arbeit vorgestellt. Die kodierende Region des Gens, Exon 3 bis 7, wurde sequenziert. Im Fall von Missense-Mutationen wurde außerdem das nicht kodierende Exon 2 sequenziert. Die Patienten wurden nach der Untersuchung der molekularen Auffälligkeit in 5 Gruppen geteilt: 1) *TRPS1* Gen-Deletion oder Unterbrechung (6 Fälle), 2) Nonsense-Mutation (35 Fälle), 3) Spleiß-Mutation mit der Erhaltung des Leserasters (1 Fall), 4) Missense-Mutationen (8 Fälle), 5) ohne identifizierbare Auffälligkeit (7 Fälle). Die Mutationsfinderate beträgt 88% Unter den 44 identifizierten Mutationen befinden sich 35 verschiedene. Von 29 Leseraster-Mutationen sind 13 Einzelbasen-Substitutionen, die zu einem frühzeitigen Stopkodon führen (Abb. 4.1, obere Pfeile), 9 Deletionen und 7 Insertionen (Abb. 4.1, untere Pfeile). Die Basen-Substitution IVS6+1G>T ändert die Spleißdonor Stelle im Intron 6 (siehe 3.2.4.1). Fünf Basen-Substitutionen sind Missense-Mutationen, die ausschließlich in Exon 6 sind. Anhand der Genotyp-Phänotyp Korrelation der Art der Mutation und Körpergröße sowie der Länge der Röhrenknochen der Hände (Lüdecke et al., 2001), wurde gezeigt, daß die

Patienten mit Missense-Mutationen eine schwerere Krankheitsausprägung haben als die mit Nonsense-Mutation.

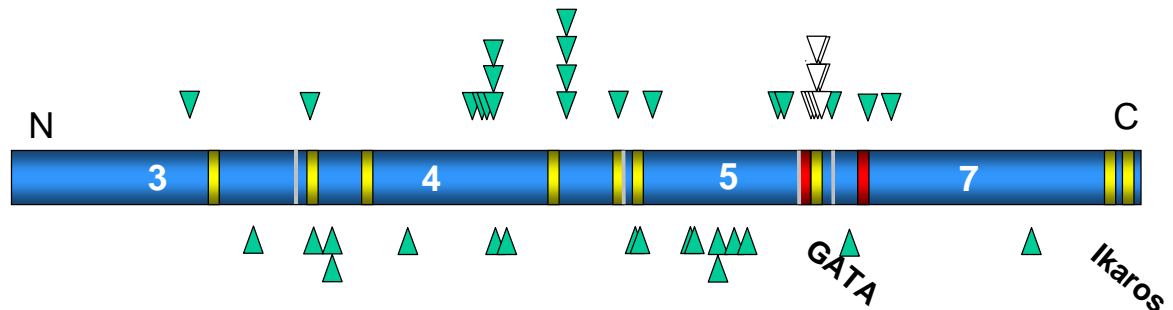


Abb. 4.1: Eine schematische Darstellung des TRPS1 Proteins und die Positionen der Mutationen. Die Basensubstitutionen sind durch Dreiecke oberhalb des Proteinschemas dargestellt. Insertionen und Deletionen, die das Leseraster verändern, wurden mit Dreiecken unterhalb des Proteinschemas gezeigt. Die Nonsense-Mutationen wurden durch ein dunkles Dreieck und die Missense-Mutationen durch ein helles Dreieck dargestellt. Die hellen Streifen stellen die Exongrenzen dar. Die 9 gelben Streifen mit dunklem Rand repräsentieren die Zinkfinger und die 2 roten Streifen (mit dunklem Rand) repräsentieren die Kernlokalisierungssignale (NLS).

Eine Mutationsfinderate von 88% (50 Mutationen bei 57 Patienten) zeigt, das *TRPS1* der Hauptlokus, wenn nicht der einzige, für TRPS I und TRPS III ist. Die Auswertung der klinischen Merkmale bei den Patienten zeigte ein breites Spektrum. Eine milde mentale Retardierung kann nicht mit einer bestimmten Mutation in *TRPS1* korrelieren, und die starke mentale Retardierung von einem Patient wurde durch die grosse zytogenetische Deletion verursacht (Hamers et al., 1990; Lüdecke et al., 1995). Alle Leseraster (*frameshift*) Mutationen werden für *loss-of-function* Mutationen gehalten. Falls die mutanten Proteine überhaupt synthetisiert werden, können sie nur im Falle der drei Patienten 2875C→T, 3012C→G und 3360-3361insGGAG (Momeni et al., 2000; Lüdecke et al., 2001) in den Kern befördert werden, in allen anderen Fällen ist das NLS abwesend oder zerrissen. Außer der Spleiß-Mutation, beinhaltet keins der mutanten Proteine die zwei C-terminalen Ikaros-ähnlichen Zinkfinger. Die doppelten Zinkfinger von Ikaros vermitteln die Proteinbindung des Proteins (Sun et al., 1996). Außerdem sind diese beiden Zinkfinger von *TRPS1* für die Repressions-Funktion des Proteins erforderlich (Malik et al., 2001). Die Identifizierung einer Mutation bei dem TRPS I Patienten mit der 4 Basen Insertion

360-3361insGGAG (Momeni et al., 2000), wodurch die 160 C-terminalen Aminosäuren deletiert sind, ist noch ein Hinweis für die wichtige Rolle dieser Zinkfinger. Wie es durch die RT-PCR gezeigt (siehe 3.2.2.6), führt die Spleiß-Mutation IVS6+1G→T (Lüdecke et al., 2001) zu einem stabilen Transkript. Dem mutierten Protein fehlt der GATA-bindende Zinkfinger und das an der 5'-Seite gelegene NLS ist trunziert. Deshalb vermutet man, daß das Protein nicht in den Kern transportiert wird.

Der Phänotyp der Mehrheit der Patienten mit einer Nonsense-Mutation oder Spleiß-Mutation liegt in dem Spektrum von TRPS I und ist dem der Patienten mit Deletion oder Disruption im *TRPS1* ähnlich. Mit der Annahme, daß *TRPS1* biallelisch exprimiert wird, kann man postulieren, daß alle Nonsense-Mutationen und die Spleiß-Mutation sich in einem heterozygoten Zustand befinden, die die Dosis des TRPS1 Proteins zur Hälfte reduziert, wie im Fall einer kompletten Deletion oder Disruption des Gens. Dies kann darauf hinweisen, daß TRPS I durch die Haploinsuffizienz des *TRPS1* verursacht wird. Haploinsuffizienz wurde bei anderen Transkriptionsregulatoren wie *PAX6* bei Aniridie und *GLI3* bei Greig Syndrom als Ursache der Krankheit postuliert (Fisher et al., 1994).

Malik et al. schlagen einen alternativen Mechanismus als Ursache dieser Krankheit vor (Malik et al., 2001). Durch die Expression vier mutanter Transkripte von TRPS1, die Mutationen von TRPS I Patienten trugen, konnten sie keine Transaktivierung oder Repression fest stellen. Durch die Co-Expression des Wildtypproteins zusammen mit dem mutierten Protein, wurde die durch das TRPS1 vermittelte Repression teilweise wiederbelebt. In dieser Arbeit wird vorgeschlagen, daß die trunzierenden Mutationen (siehe 3.2.1), assoziiert mit TRPS I, die repressive Aktivität des TRPS1 Proteins in einer dominanten Art inhibieren können. Sogar die kleinste mutierte Form vom TRPS1 Protein, das nur 338 aa lang ist (C338X), spielt eine dominante inhibierende Rolle. Dadurch wird angenommen, daß die limitierenden Komponenten des transkriptionell regulatorischen Signalwegs möglicherweise mit dem N-Terminus von TRPS1 interagieren (Malik et al., 2001). Die Autoren haben aber die Wahrscheinlichkeit, daß das mutante Transkript instabil ist und durch den mRNA *nonsense mediated decay* Mechanismus degradiert wird, nicht berücksichtigt. In diesem Fall wird die Krankheit durch die Haploinsuffizienz verursacht.

Alle 8 Missense-Mutationen sind bisher in Exon 6 lokalisiert worden. Die Abbildung 4.2 zeigt eine schematische Darstellung der Missense-Mutationen in Exon 6. Die erste Mutation ist V894D, N-terminal vom Zinkfinger gelegen, in dem Valin, eine neutrale Aminosäure durch die saure Aspartinsäure ersetzt wird. Der Indexpatient ist homozygot

und die Mutter des Patienten ist heterozygot für die gleiche Mutation. Durch die Sequenzierung des RT-PCR Produktes der Leukozyten RNA des Patienten und quantitative Southernblot-Hybridisierung wurde bewiesen, daß der Indexpatient zwei Allele für das Gen hat. Außerdem ist der Patient für die drei Polymorphismen in *TRPS1* homozygot. Die schwere Krankheitsausprägung des Patienten, der wie ein schwerbetroffener TRPS III aussieht, ist durch die Homozygotie entstanden und ist ein Beweis dafür, daß eine homozygote *TRPS1* Mutation nicht letal ist.

Ein Patient mit TRPS III (Vilain et al., 1999) ist der Träger der zweiten Missense-Mutation T901P. Er ist der am schwersten betroffene heterozygote Patient. Die Mutation ersetzt Threonin durch Prolin, die wahrscheinlich durch einen Knick im β -Faltblatt die Struktur des Zinkfingers ändert.

An der Position 908 an der Spitze des Zinkfingers wurden zwei Mutationen in drei Patienten identifiziert. Die erste ist eine R908Q-Mutation und wurde in zwei nicht verwandten Patienten identifiziert. Der erste Patient zeigt eine mentale Retardierung und zapfenförmige Epiphysen. Der zweite Fall dieser Mutation wurde in einer Patientin mit normaler Intelligenz, kleiner Größe und schwerer Brachydaktylie isoliert. Bei einem japanischen Patienten mit TRPS III (Nagai et al., 1994) wurde die zweite Mutation, R908P, gefunden.

Die letzte Missense-Mutation in Exon 6 ist A919T. Sie befindet sich zwischen den Cysteinen 3 und 4. Die Mutation ersetzt Alanin, eine ungeladene Aminosäure durch Threonin, ein geladene Aminosäure. Diese Mutation kann vermutlich die Zinkverbindung destabilisieren. Die Mutation wurde dreifach isoliert, in einem familiären Fall (Kajii et al., 1994) der bereits als TRPS III diagnostiziert war und in zwei sporadischen Fällen. In allen drei Fällen sind die Patienten mittelmäßig klein und haben extrem kurze Hände.

Die Missense-Mutationen im *TRPS1* Gen ändern die GATA-ähnliche DNA-bindende Domäne und dadurch die Affinität dieses Zinkfingers zur DNA. Das trunkierte Protein kann durch die NLS in den Zellkern gelangen und durch die intakte Ikaros-ähnliche Protein-bindende Domäne an den Bindepartner binden, aber mit einer geringen Affinität zur DNA. Das kann einen dominant-negativen Effekt auf die Funktion dieses multimerischen Proteinkomplexes haben.

Die Mutationen im *TRPS1* Gen führen zu einem breiten Spektrum von Phänotypen. An der einen Seite des Spektrums liegen die Patienten mit Nonsense-Mutation, die einen typischen

TRPS I Phänotyp zeigen und auf der anderen Seite die Patienten mit Missense-Mutationen im DNA-bindenden Zinkfinger, die den TRPS III Phänotyp zeigen. Am schwersten sind die Patienten betroffen, welche die T901P und R908P Mutationen tragen (Lüdecke et al., 2001). Man kann annehmen, daß die DNA-Bindung einen sehr großen Einfluß auf die Funktion des Transkriptionsfaktors hat.

Das *TRPS1* ist der Hauptlokus, wenn nicht der einzige Locus, für TRPS I und III. Bei den Patienten, bei denen man keine Mutation identifiziert hat, konnte es sich entweder um eine Mutation im Intronbereich oder im nicht vollständig definierten Promotorbereich handeln, oder aber auch in einem anderen Gen, das als ein zweiter Locus für TRPS dient.

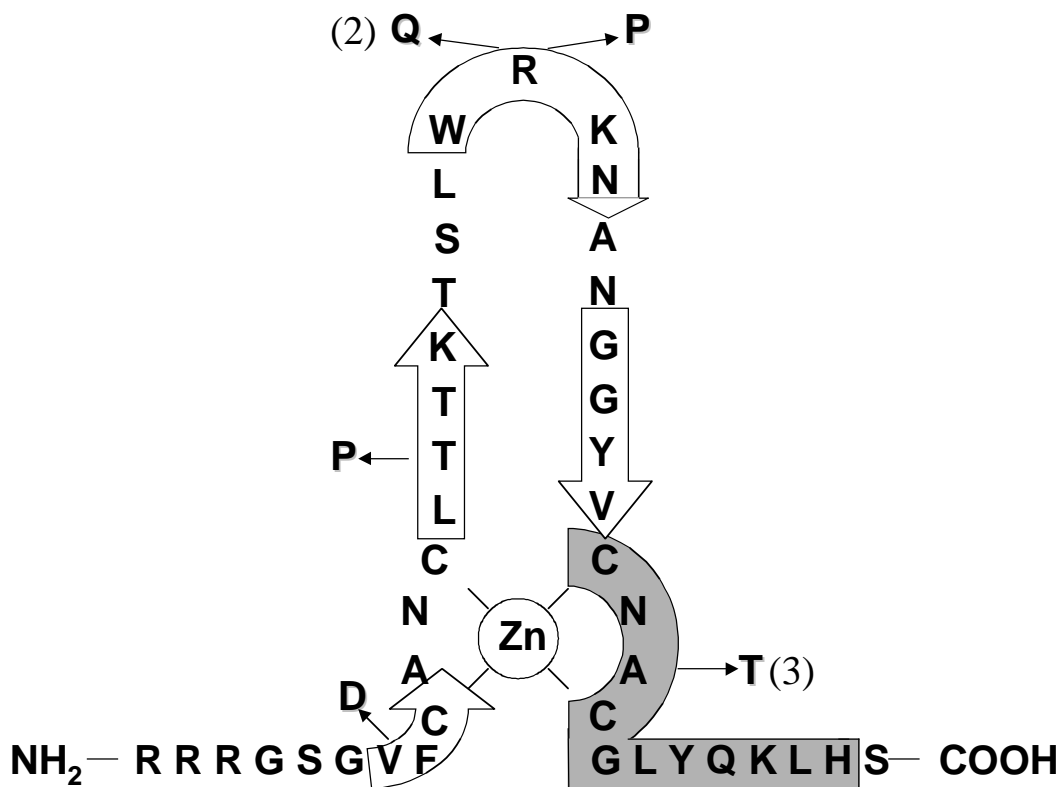


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Exon6 Zinkfingers und der Missense-Mutationen. Die β -Faltblatt Strukturen sind durch weiße Pfeile und die α -Helix Struktur durch den grauen Balken repräsentiert. Die Basenaustausche sind an ihren Positionen durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Anzahl der mehrfach auftretenden Mutationen ist jeweils in Klammern angegeben.

Der Gedanke, daß das Gesicht und die Gliedmaßen in ihrer Entwicklung viele gemeinsame Regulatoren und morphogenetische Signalwege besitzen, ist zunächst schwer zu verstehen. Kopf und Gliedmaßen sind evolutionär unabhängig voneinander entstanden: Gliedmaßen sind Millionen Jahre nachdem der anteriore Teil des Vertebratenkörpers cephalisiert worden war erschienen (Schneider et al., 1999). Embryonaler Ursprung der beiden sind zwei verschiedene Zellpopulationen, Neuralleistenzellen beim Gesicht und Mesoderm bei den Gliedmaßen. Außerdem haben die beiden keine Gemeinsamkeit in ihrer postnatalen Anatomie. Dennoch gibt es konservierte Signale wie Sonic Hedgehog und Retinoic Acid, die an der Entwicklung der beiden Teile beteiligt sind.

Bei Patienten mit TRPS sind außer Knochen und Knorpel auch Haare betroffen. Expression von *Ta (Tabby)* wurde in formierenden Gesichtsdrüsen wie serösen nasalen Drüsen und in sich entwickelnden Knochen und Knorpel nachgewiesen (Tucker et al., 2000). Die Tabby Knock-out Maus hat abnormale oder fehlende Zähne (Grünberg, 1965), fehlende Schweißdrüsen und manche Haartypen fehlen (Sundberg, 1994).

Eine Funktionsstudie über die Funktion des *TRPS1* Gens wurde angesichts seiner Rolle beim Prostatakrebs durchgeführt (Chang et al., 2000). In dieser Studie wurde die Expression von *TRPS1* in den Androgen-abhängigen und -unabhängigen menschlichen Prostatakrebszellen untersucht. In der Arbeit wurde nachgewiesen, daß durch den Rückgang des Androgen-Niveaus bei kastrierten Ratten die Expression von *TRPS1* hochreguliert wird. Während der Antiandrogen-Therapie oder nach der Kastration wird vermutlich in der normalen wie in der malignen Prostata Apoptose in Gang gesetzt (Kyprianou et al., 1988, 1990). Die Übereinstimmung der beiden Ereignisse läßt vermuten, daß *TRPS1* die Apoptose in normalen Androgen-abhängigen epithelialen Zellen in Rattenprostataadrüsen in Gang setzen kann (Chang et al., 2000).

Über die Funktion des TRPS1 kann nur spekuliert werden, bis durch Hefe-2-Hybrid (*Yeast-Two-Hybrid*) Experimente die potentiellen Bindepartner identifiziert und charakterisiert worden sind, so daß man eventuelle morphogenetische Signalwege erkennen kann. Darüber hinaus können *in situ*-Hybridisierungen das Expressionsmuster des Gens erkennen, das wiederum Informationen über beteiligte Faktoren liefern kann. Da durch die Mutationen in *TRPS1* verschiedene Gewebe wie Knorpel, Haare und Knochen betroffen sind, kann man die Expression des Gens bereits in früheren embryonalen Stadien mit Gewissheit erkennen.

4.5 Das Maus *Trps1*-Gen

Nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms ist die Erforschung des Transkriptionsregulatorischen Netzwerkes (Kadonaga 1998) eine große Herausforderung. Technische Fortschritte haben die Isolierung und Identifizierung einiger Transkriptionsfaktoren in multizellulären Organismen ermöglicht (Orkin et al., 1995, Qin et al., 1998, Yuh et al., 1998), die wiederum durch den Interspezies-Sequenzvergleich zu der Isolierung deren Orthologen im Menschen geführt hat (Aparicio et al., 1997, Brickner et al., 1999, Hardison et al., 1997). Die Maus ist das führende Tiermodell für die Untersuchung normaler und durch Mutationen gestörter biologischer Prozesse (Mechanismen) in Säugetieren. Das Mausgenom mit seinem genetisch gut charakterisierten System bietet uns 1) hunderte von bekannten Mutanten, 2) definierte gezüchtete Stämme, 3) Zugang zur Transgen-Technologie, 4) Zugang zur Knockout-Technologie von großen Regionen im Genom und die Möglichkeit der direkten Anwendung bei über 200 erblichen Erkrankungen des Menschen, die schon in Mausgenom kartiert sind (Searle et al., 1994). Wegen der hohen Biologie- und Sequenzähnlichkeit zwischen Maus und Mensch kommt das Mausgenom mehr und mehr als ein Werkzeug für den interspezies-Vergleich in Betracht (Battey et al., 1999).

Als einen ersten Schritt zum Verständnis der Pathogenese von TRPS I haben wir das gesamte *Trps1* isoliert. Die hohe Ähnlichkeit zwischen menschlichem und Maus *TRPS1* (Tabelle 3.6) und die komplette Konservierung der GATA-ähnlichen und Ikaros-ähnlichen Zinkfinger hat es uns ermöglicht, Konzepte zur Erstellung der Mausmodelle zu entwickeln. Bei den Mausmodellen handelt es sich um Änderungen der drei C-terminalen Zinkfinger. Bei den Mausmodellen habe ich versucht die Situationen die wir *in vivo* bei unsere Patienten vorgefunden haben wiederherzustellen.

Bei dem Knock-out Konstrukt 1 wird versucht eine 9,5 kb Region zu deletieren, die das Exon 5 und den ORF von Exon 6 beinhaltet. Dieses Konstrukt reflektiert die Situation in den Patienten mit Leseraster-Mutationen die in den menschlichen Exons 3 bis 5 vorkommen und zu einem frühzeitigen Stopkodon führen. In diesen Fällen hat das mutante Protein die drei C-terminalen Zinkfinger und die beiden NLS Motive verloren.

In dem Knock-out Konstrukt 2 wird der ORF von Exon 6 deletiert. Dieses Konstrukt rekonstruiert die Situation in den Patienten mit den Leseraster Mutationen im

menschlichen Exon 7. Das mutante Protein verliert die Ikaros-ähnlichen Zinkfinger und die beiden ersten Mutationen in Exon 7 führen zum Verlust des NLS Motivs.

Im Knock-out Konstrukt 3 wird das Maus Exon 5 deletiert. Dieses Konstrukt spiegelt die Situation in der Patientin mit der Spleiß-Mutation (IVS6+1G→T) wider. Das mutante Protein verliert die putative DNA-bindende Domäne und dabei wird außerdem ein NLS Motiv unterbrochen.

In dem Knock-in Targetingkonstrukt wurde die Missense-Mutation des TRPS III Patienten 2701A→C rekonstruiert. Da diese Mutation bei dem Patienten zu einer schweren Krankheitsausprägung geführt hat, ist es wahrscheinlicher, daß man bei den Mäusen die die Mutation tragen, eine beachtliche Veränderung der Knochen findet.

Durch die Untersuchung der Knock-out und Knock-in Mäuse mit in situ Hybridisierungen kann man die genaue temporale und spatiale Expression des Gens erkennen. Durch Bestimmung der gewebespezifischen Expression könnte eventuell die Wechselwirkung des *TRPS1* Gens mit bekannten Genen, die Rolle des Gens bei der Entwicklung sowie letztendlich die Wege die zu TRPS führen geklärt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Tricho-rhino-phalangeale Syndrom Typ I (TRPS I) ist eine autosomal dominante Erkrankung mit craniofaziale und Skelettanomalien. Das Gen für TRPS I wurde in 8q24.1 kartiert und ein Contig von PAC-Klonen in der minimalen TRPS-Region erstellt. Die PAC-Klone wurden in Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Abteilung Genomanalyse im Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena vollständig sequenziert.

Um das vorhandene PAC-Contig (Abb. 1.2) am proximalen Ende zu erweitern und die Bruchpunkte von zwei TRPS I Patienten HB2166 und KS11480, die proximal zu dem PAC-Contig liegen abzudecken, wurden die drei PAC-Klone 22, 24 und 30 isoliert. Die neue PAC-Klone wurden nach der Sequenzierung mit der Hilfe des Computer-Programms analysiert. Das Durchmustern von genomischen Bibliotheken und die Computer-Analyse offenbarte ein Gen mit 7 Exons. Durch die Anwendung verschiedener Verfahren wie RT-PCR und Durchmustern einer cDNA-Bibliothek aus dem fötalen Gehirn konnte ein Transkript von 10011 bp isoliert werden. Das offene Leseraster ist 3843 bp lang und kodiert für ein 1281 aa Polypeptid mit 141,580 kD Molekulargewicht. Es beginnt an der dritten Base von Exon 3 und endet im Exon 7. Das Polypeptid beinhaltet 9 putative Zinkfinger-Motive. Der Zinkfinger von Exon 6 hat eine hohe Ähnlichkeit zu dem DNA-bindenden Zinkfinger von GATA-bindenden Transkriptionsfaktoren. Die zwei Zinkfinger von Exon 7 haben eine hohe Ähnlichkeit zu der Protein-bindenden Zinkfinger C-terminalen Zinkfingerdomäne von Ikaros-Transkriptionsfaktoren. Der Zinkfinger von Exon 6 wird von zwei Kern-lokalisierungssignalen flankiert. Die 5' nicht translatierte Region ist mindestens 638 bp und die 3' nicht translatierte Region ist 5530 bp lang. Die 3' nicht translatierte Region beinhaltet 6 Polyadenylierungssignale, 1 nicht-klassisches ATTAAG, 5 klassische AATAAG von denen 2 benutzt werden. Außerdem beinhaltet die 3' nicht translatierte Region 16 Kopien von mRNA Degradierungssignalen. Die Expressionsanalyse des Gens offenbarte zwei Transkripte von 7 und 10,5 kb.

Zusammengefaßt zeigt die Struktur des TRPS1 Proteins, daß es sich vermutlich um einen Transkriptionsfaktor handelt.

Das Gen ist in verschiedenen Säugetieren konserviert. Um ein Mausmodell für diese Krankheit zu generieren, wurde das Mausgen mit Hilfe der menschlichen Sonden aus einer cDNA Bibliothek aus 17 Tage alten Mausembryonen isoliert. Das Mausgen besteht nur aus 6 Exons, aber das ORF und die Aminosäuresequenz haben sehr hohe Identität zum

menschlichen Gen bzw. Protein. Für das Mausmodell wurden 3 Knock-out und ein Knock-in Konstrukt geplant. Davon konnten zwei Knock-out Konstrukte im Verlaufe der vorliegenden Arbeit fertiggestellt werden. Bisher konnte jedoch unter mehr als 400 transfizierten ES-Zellen kein rekombinanter Klon gefunden werden.

6. LITERATUR

- Adams M.D. et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: (5461), 2185-2195.
- Ahn A.H., Oshida M., Anderson M.S., Feener C.A., Selig S., Hagiwara Y., Ozawa E., Kunkel L.M. (1994) Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4446-4450.
- Ahn J., Lüdecke H.-J., Lindow S., Horton W.A., Lee B., Wagner M.J., Horsthemke B., Wells D.E. (1995) Cloning of the putative tumor suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nature Genet* **11**: 137-143.
- Antequera F. und Bird A.P. (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Nat Acad Sci USA* **90**: 11995-11999.
- Aparicio S., Hawker K., Cottage A., Mikawa Y., Zuo L., Venkatesh B., Chen E., Krumlauf R., Brenner S. (1997) Organization of the Fugu rubripes Hox clusters: an evidence for continuing the evolution of vertebrate Hox complexes. *Nature Genet* **16**: 79-83.
- Baniahmad A., Steiner C., Kohne A.C., Renkawitz R. (1990) Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* **61**: 505-514.
- Baraitser M., Winter R.M., Brett E.M. (1983) Greig cephalopolysyndactyly: report of 13 affected individuals in three families. *Clin Genet* **24**: 257-265.
- Barthelemy I., Carramolino L., Gutierrez J., Barbero J.L., Marquez G., Zaballos A. (1996). zhx-1: a novel mouse homeodomain protein containing two zinc-fingers and five homeodomains. *Biochem Biophys Res Commun* **224** (3): 870-876.
- Batley J., Jordan E., Cox E. Dove W. (1999) An action plan for mouse genomics. *Nature Genet* **21**: 73-75.
- Beaudoing E., Freier S., Wyatt J.R., Claverie J.M., Gautheret D. (2000) Patterns of Variant polyadenylation Signal usage in human genes. *Genome Res* **10**, 1001-1010.
- Birnboim H.C. und Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Boulikas T. (1994) Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. *J. Cell. Biochem.* **55**: 32-58.
- Brandeis M., Frank D., Kesht I., Siegfried Z., Mendelsohn M., Nemes A., Temper V., Razin A., Cedar H. (1994) Sp1 elements protect a CpG island from denovo methylation. *Nature* **371**: 435-8.
- Brandt C.A., Lüdecke H.-J., Hindkær J., Strømkiær H., Pinkel D., Herlin T., Bolund L., Friedrich U. (1997) A *de novo* complex t(7;13;8) translocation with a deletion in the TRPS gene. *Hum Genet* **100**: 334-338.
- Brickner A.G., Koop B.F., Aronow B.J., Wiginton D.A. (1999) Genomic sequence comparison of the human and mouse adenosine deaminase gene regions. *Mamm Genome* **10**: 95-101.

- Brown K.E., Guest S.S., Smale S.T., Hahm K., Merckenschlager M., Fischer A.G. (1997) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* **91**: 845-854.
- Bühler E.M., Malik N.J. (1984) The Tricho-rhino-phalangeal syndrome (s): chromosome 8 long arm deletion: is there a shortest region of overlap between reported cases? TRP I and TRP II syndromes: are they separate entities? *Am J Med Genet* **19**: 113-119.
- Capecchi M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288-1292.
- Carle G.F. und Olson M.V. (1984) Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alteration gel electrophoresis. *Nucl Acids Res* **12**: 5647-5664.
- Chang G.T.G., Steenbeek M., Schippers E., Block L.J., van Weerden W.M., van Alewijk D.C.J.G., Eussen B.H.J., van Steenbrugge G.J., Brinkmann A.O. (2000) Characterization of a Zinc-finger protein and its association with apoptosis in prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1414-21.
- Cohn M.J., Izpisua-Belmonte J.C., Abud H., Heath J.K., Tickle C. (1995) Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* **80**: 739-46.
- Couly G.F., Le Dourain N.M. (1985) Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol* **110**: 422-439.
- Couly G.F., Le Dourain N.M. (1987) Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev Biol* **120**: 198-214.
- Edwards-Gilbert G., Veraldi K.L., Milkarek C. (1997) Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: mean to an end? *Nucleic Acids Res* **25**: 2547-2561.
- Feinberg A.P. und Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.
- Feinberg A.P. und Vogelstein B. (1984) Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **137**: 266-267.
- Fields C., Adams M.D., White O., Venter J.C. (1994) How many genes in the human genome? *Nature Genet* **7**:345-346.
- Filippova G. N., Fagerlie S., Klenova E.M., Myers C., Dehner Y., Goodwin G., Neiman P.E., Collins S.J., Lobanenkova V.V. (1996) An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zincfingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol* **16**: 2802-2813.
- Fisher E. and Scambler P. (1994) Human haploinsufficiency-one for sorrow, two for joy. *Nature Genet* **7**: 5-7.
- Francis-West P., Ladhar R., Barlow A., Graveson A. (1998) Signaling interactions during facial development. *Mech Dev* **75**: 3-28.
- Frischmeyer P., Dietz H.C. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* **8**: 1893-1900.

- Frohman M.A., Dush M.K., Martin G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8998-9002.
- Gardiner-Garden M. und Frommer M. (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**: 261-282.
- Gautheret D., Poirot O., Lopez F., Audic S., Claverie J.M. (1998) Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large scale analysis by EST clustering. *Genome Res* **8**: 524-530.
- Georgopoulos K., Moore D.D., Derfler B. (1992) Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell comitment. *Science* **258**: 808-812.
- Georgopolous K., Bigby M., Wang J.H., Molnar A., Wu P., Winandy S., Sharpe A. (1994) The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* **79**: 143-156.
- Giedion A. (1966) Das Tricho-rhino-phalangeale Syndrom. *Helv Paediatr Acta* **21**: 475-482.
- Glöckner G., Scherer S., Schattevoy R., Boright A., Weber J., Tsui L.-C., Rosenthal A. (1998) Large-scale sequencing of two regions in human chromosome 7q22: analysis of 650 kb of genomic sequence around the EPO and CLTL1 loci reveals 17 genes. *Genome Res* **8**: 1060-1073.
- Gorlin R.J., Cohen M.M. Jr., Levine L.S., Syndromes of the head and neck, New York, Oxford university press, 1990.
- Grépin C., Dagnino L., Robitaille L., Haberstroh L., Antakly T. et al. (1994) A hormon-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* **14**: 3115-3129.
- Grünberg H. (1965) Genes and genotypes affecting the teeth of the mice. *J Embryol Exp Morphol* **14**: 137-159.
- Hahm K., Ernst P., Lo K., Kim G.S., Turck C., Smale S.T. (1994) The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros genes. *Mol cell Biol* **14**: 7111-7123.
- Hall B.D., Langer L.O., Giedion A., Smith D.W., Cohen M.M. Jr., Beale A.K., Brandner M. (1974) Langer-Giedion Syndrome. *Birth defects* **X(12)**: 147-164.
- Hall J.G., Pallister P.D., Clarren S.K., Beckwith J.B., Wigglesworth F.W., Fraser F.C., Cho S., Benke P.J., Reed S.D. (1980) Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus, and postaxial polydactyly- a new syndrome? Part I: clinical, casual, and pathogenetic considerations. *Am J Med Genet* **7**: 47-74.
- Hardison R.C., Oeltjen J., Miller W. (1997) Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome. *Genome Res* **7** (10): 959-966.
- Helms J.A., Kim C.H., Hu D., Minkoff R., Thaller C., Eichele G. (1997) Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev Biol* **187**: 25-35.

- Holton T.A. und Graham M.W. (1991) A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucl Acids Res* **19**: 1156.
- Hou J., Parrish J., Lüdecke H.-J., Sapru M., Wang Y., Chen W., Hill A., Siegel-Bartelt J., Northrup H., Elder F.F.B., Chinault C., Horsthemke B., Wagner M.J., Wells D.E. (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 (TRPS 1 and EXT 1). *Genomics* **29**: 87-97.
- Itin P.H., Bohn S., Mathys D., Guggenheim R., Richard G. (1996) Trichorhinophalangeal syndrome type III. *Dermatology* **4**: 349-52.
- Jarrousse A.S., Petit F., Kreutzer-Schmid C., Gaedigk R., Schmid H.P. (1999) Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay. *J Biol Chem* **274**: 5925-5930.
- Ji Y., Walkowicz M.J., Buiting K., Johnson D.K., Tarvin R.E., Rinchik E.M., Horsthemke B., Stubbs L., and Nicholls R.D. (1999) The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* **8**: 533-542.
- Jiang Y., Evans T. (1996) The *Xenopus* GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. *Dev Biol* **174**:258-70.
- Kadonaga J.T. (1998) Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin modifying machines. *Cell* **92**: 307-313.
- Kang S., Graham J.M. Jr., Olney A.H., Biesecker L.G. (1997) *GLI3* frameshift mutations cause autosomal dominant Palister-hall syndrome. *Nature Genet* **15**: 266-268.
- Kajiji T., Gonzalez I.F., Matsuura S. (1994) Tricho-rhino-phalangeal type III. *Am J Med Genet* **49**: 349-350.
- Kozak M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**: 187-208.
- Kronenberg H.M., Lee K., Lanske B., Serge G.V. (1997) Parathyroid hormon-related protein and Indian hedgehog control the space of cartilage differentiation. *J Endocrinol* **154**: 39-45.
- Kucheria K., Kenue R.K., Taneja N. (1981) An Indian family with postaxial polydactyly in four generations. *Clin Genet* **20**: 36-39.
- Kyprianou N., Isaacs J.T. (1988) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* **122**: 552-562.
- Kyprianou N., English H.F., Isaacs J.T. (1990) Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res* **50**: 3748-3753.
- Langer L.O. (1969) The thoraco-pelvic-phalangeal dystrophy. Clinical delineation of birth defects. PartIV. Skeletal dysplasia. *Birth Defects* **IV**: 55-64.

- Laverriere A.C., MacNeill C., Mueller C., Poelmann R.E., Burch J.B., et al. (1994) GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* **269**: 23177-23184.
- Le Merrer M., Legeal-Mallet L., Jeannin P.M., Horsthemke B., Schinzel A., Plauchu H., Toutain A., Archard F., Munnich A., Maroteaux P (1994) A gene for hereditary multiple exostoses maps to Chromosome 19p. *Hum Mol Genet* **3**: 717-722.
- Lüdecke H.-J., Johnson C., Wagner M.J., Wells D.E., Turleau C., Tommerup N., Latos-Bielenska A., Sandig K.-R., Meinecke P., Zabel B., Horsthemke B. (1991) Molecular definition of the shortest region of deletion overlap in the Langer-Giedion syndrome. *Am J Hum Genet* **49**: 1197-1206.
- Lüdecke H.-J., Wagner M.J., Nardman J., La Pillo B., Parrish J.E., Willems P.J., Haan E.A., Frydman M., Hamers G.J.H., Wells D.E., Horsthemke B. (1995) Molecular dissection of a contiguous gene syndrome: localization of the genes involved in the Langer-Giedion syndrome. *Hum Mol Genet* **4**: 31-36.
- Lüdecke H.-J., Schmidt O., Nardmann J., von Holtum D., Meinecke P., Muencke M., Horsthemke B. (1999) Genes and chromosomal breakpoints in the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8. *Hum Genet* **105**: 619-628.
- Lüdecke, H.-J., Schaper, J., Meinecke, P., Momeni, P., Groß, S., von Holtum, D., Hirche, H., Abramowicz, M.J., Albrecht, B., Apacik, C., Christen, H.-J., Claussen, U., Devriendt, K., Fastnacht, E., Fordeker, A., Friedrich, U., Goodship, T.H.J., Greiwe, M., Hamm, H., Hennekam, R.C.M., Hinkel, G.K., Hoeltzenbein, M., Kayserili, H., Majewski, F., Mathieu, M., McLeod, R., Midro, A.T., Moog, U., Nagai, T., Niikawa, N., Ørstavik, K.H., Plöchl, E., Seitz, C., Schmidtke, J., Tranebjærg, L., Tsukahara, M., Wittwer, B., Zabel, B., Gillessen-Kaesbach, G., and Horsthemke, B. (2001). Genotypic and phenotypic spectrum in the tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *Am J Hum Genet* **68**: 81-91.
- Malik T.H., Shoichet S.A., Latham P., Kroll T.G., Peters L.L., Shivdasani R.A. (2001) Transcriptional repression and developmental functions of the atypical vertebrate GATA protein TRPS1. *EMBO J* **20**: 1715-1725.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marchau F.E., Van Roy B.C., Parizel P.M., Lambert J.R., De Canck I., Leroy J.G., Gevaert C.M., Willems P.J., Dumon J.E. (1993) Tricho-rhino-phalangeal syndrome type I due to an apparently balanced translocation involving 8q24. *Am J Med Genet* **45**: 450-455.
- Momeni P., Glöckner G., Schmidt O., von Holtum D., Albrecht B., Gillessen-Kaesbach G., Hennekam R., Meinecke P., Zabel B., Rosenthal A., Horsthemke B., Lüdecke H.-J. (2000) Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nature Genet* **24**: 71-74.
- Nagai T., Nishimura G., Kasai H., Hasegawa T., Kato R., Ohashi H., Fukushima Y. (1994) Another family with Tricho-rhino-phalangeal syndrome type III (Sugio-Kajii syndrome). *Am J Med Genet* **49**: 279-280.
- Nemer G., Quershi S.T., Malo D., Nemer M. (1999) Functional analysis and chromosomal mapping of Gata5, a gene encoding a finger DANN-binding protein. *Mamm Genome* **10**: 993-9.

- Niikawa N., Kamei T. (1986) The Sugio-Kajii syndrome, proposed tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. *Am J Med Genet* **24**: 759-760.
- Ohara O., Dorit R.L., Gilbert W. (1989) One-sided polymerase chain reaction: The amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 5673-5677.
- Opitz J.M., Gilbert E.F. (1982) CNS anomalies and the midline as a 'developmental field'. *Am J Med Genet* **12**: 443-455.
- Orkin S.H. (1992) GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* **80**: 575-581.
- Orkin S.H. (1995) Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur. J. Biochem.* **231**: 271-281.
- Pandolfi P.P., Roth M.E., Leonard M.W., Dzierzak E. et al. (1995) Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genet* **11**: 40-44.
- Pevny L., Lin C.S., D'Agati V., Simon M.C., Orkin S.H. (1995) Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* **121**: 163-172.
- Qin W., Khuchua Z., Cheng J., Boero J., Payne R.M., Strauss A.W. (1998) Molecular characterization of creatin kinases and some historical perspectives. *Mol Cell Biochem.* **184**: 153-167.
- Radhakrishna U., Wild A., Grzeschik K.-H., Antonarakis S.E. (1997) Mutation in GLI3 in postaxial polydactyly type A. *Nature Genet* **17**: 269-271.
- Radhakrishna U., Bornholdt D., Scott H.S., Patel U.C., Rossier C., Engel H., Bottani A., Chandal D., Blouin J.-L., Solanki J.V., Grzeschik K.-H., Antonarakis S.E. (1999) The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; no phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet* **65**: 645-655.
- Richman J.M., Tickle C. (1992) Epithelial-mesenchymal interactions in the outgrowth of limb buds and facial primordia in chick embryos. *Dev Biol* **154**: 299-308.
- Ruppert J.M., Kinzler K.W., Wong A.J., Bigner S.H., Kao F.T., Law M.L., Seunemann H.N., O'Brein S.J., Vogelstein B. (1988) The GLI-Krüppel family of human genes. *Mol Cell Biol* **8**: 3104-3113.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 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.
- Schneider R.A., Hu D., Helms J.A. (1999) From head to toe: conservation of molecular signals regulating limb and craniofacial morphogenesis. *Cell Tissue Res* **296**: 103-109.
- Searle A.G., Edwards J.H., Hall J.G. (1994) Mouse homologues of human hereditary disease. *J Med Genet* **31**: (1), 1-19.

- Semenza G.L., Transcription Factors and Human Disease (1999)(Oxford Monographs on Medical Genetics , No 37).
- Shapiro M.B. und Senapathy P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucl Acids Res* **15**: 7155-7174.
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Spranger J., Winterpacht A., Zabel B. (1994) The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias. *Eur J Pediatr* **153**: 56-65.
- Stadler H.S., Padanilam B.J., Buetow K., Murray J.C., Solursh M. (1992) Identification and genetic map of a homeobox gene to the 4p16.1 region of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11579-11583.
- Strutt H., Cavalli G., Paro R. (1997) Co-localization of polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J* **16**: 3621-3632.
- Sugio Y., Kajii T. (1984) Ruvalcaba syndrome: autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet* **19**: 741-753.
- 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.
- Sundberg J.P. (1994) The Downless (dl) and Sleek (Dl^{Sleek}) mutations, chromosome 10. In *Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities* (ed Maibach H.I.), pp. 241-229. Boca Raton , FL: CRC Press.
- Tamura S., Wang X.H., Maeda M., Futai M. (1993) Gastric DNA-binding Proteins recognize upstream sequence motifs of parietal cell-specific genes. *Proc Nal Acad Sci USA* **90**: 10876-10880.
- Tickle C., Eichele G. (1994) Vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 121-152.
- Tsai F.Y., Keller G., Kuo F.C., Weiss M., Chen J. et al. (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* **371**: 221-226.
- Tucker A.S., Headon D.J., Schneider P., Ferguson B.M., Overbeek P., Tschopp J., Sharpe P.T. (2000) Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* **127**: 4691-4700.
- Venter J.C. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.
- Vilain C., Sznajer Y., Rypens F., Desir D., Abramowicz M.J. (1999) Sporadic case of trichrhinophalangeal syndrome type III in a European Patient. *Am J Med Genet* **85**: 495-497.
- Vortkamp A., Gessler M., Grzeschik K.-H. (1991) GLI3 zinkfinger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* **352**: 539-540.
- Vortkamp A., Heid C., Gessler M., Grzeschik K.-H. (1995) Isolation and characterization of a cosmid contig for the GCPS gene region. *Hum Genet* **95**: 82-88.

- Vostrov A.A., and Quitschke W.W. (1997) The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J Biol Chem* **272**: 33353-33359.
- Wang AM, Doyle MV, Mark DF (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9717-9721.
- Wang J.H., Nichogiannopoulou A., Wu L., Sun L., Sharpe A.H., Bigby M., Georgopoulos K. (1996) Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* **5**: 537-549.
- Wedden S.E., Ralphs J.R., Tickle C. (1988) Pattern formation in the facial primordia. *Dev Suppl* **103**: 31-40.
- Weiss M.J., Keller G., Orkin S.H. (1994) Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* **8**, 1184-1197.
- Weiss M.J., Orkin S.H. (1995) GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* **23**: 99-107.
- Whiting J. (1997) Craniofacial abnormalities induced by the ectopic expression of homeobox genes. *Mut Res* **396**: 97-112.
- Wilkie A.O.M. (1997) Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet* **6** (10): 1647-1656.
- Winter R.M. (1996) What's in a face? *Nature Genet* **12**: 124-129.
- Winwandy S., Wu P., Georgopoulos K. (1995) A dominant mutation in the *Ikaros* gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* **83**: 289-299.
- Yuh C.H., Bolouri H., Davidson E.H. (1998) Genomic cis-regulatory logic: experimental and computational analysis a sea urchin gene. *Science* **279**: 1896-1902.

Tabelle 7.1

PAC 8 Amplimere für Hybridisierungssonden			
Name der Sonde	Name der Primer	Sequenz der Primer	Größe [bp]
PM 114-115E7	PM114	CTGCAATCGCATTCAATTCT	152
	PM115	TTTTCCAGTGACCCTTCTGC	
PAC8E93-95	PM29	ACAATTTGGATTCAGAGTTGC	797
	PM30	TCTGTCTGTCTGGATTTTGTTTC	
PAC8E90	PM53	TTTCCCTGCTCAATCTTTTC	343
	PM54	TCATACATGGTCTTTCACAGTTTC	
PAC8E87	PM51	AGGTAAGTAGTAGGGGATTCACAG	289
	PM52	TGCAGACTCATGGTTTCAG	
PAC8E78-79	PM27	AAGTTGTTTGTGGTACGAGTGG	652
	PM28	GTCACAAATATGAACCAAACCAG	
PAC8E75	PM11	GCTTGGCTAAGTTTTACATCTGA	256
	PM12	GAAATAAACCAGCAACTTAACAA	
PAC8E68	PM49	CAAGATTACGGGAACTCAGAGA	155
	PM50	AAGCCATTGTTGTTATCTTGTC	
PAC8E64-65	PM9	GAAATCCTCATATTAGTGGCATTGA	658
	PM10	ATCTCCTGCAGCACTAATGG	
PAC8E60-61	PM25	ATAATCCAGTGTGCCAGTTTTC	527
	PM26	GGGTGTGAAGTGTGGATTG	
PAC8E59	PM47	ACCAGTGTTGCCTCCATAG	231
	PM48	ACCTCATCTGAAACCTTAGAATC	
PAC8E50	PM7	GTCTTCACAAAAACCATACTCA	335
	PM8	CACTGTCTGGCACTCCCTAGT	
PAC8E49	PM45	ATACATCCTGGCCAAATTCC	326
	PM46	TGTATTGTGTAGAGTCCATCATCC	

Tabelle 7.1 (Fortsetzung)

PAC 8 Amplimere für Hybridisierungssonden			
Name der Sonde	Name der Primer	Sequenz der Primer	Größe [bp]
PAC8E48	PM17	TTTTTTTCCCTCCCTCCTCTG	379
	PM18	TGCTTTCATGATGTTTGTGCTG	
PAC8E45	PM15	AATTCTTGGAAGCTCAAACTTG	372
	PM16	TGTTTCTGAGTGTTAGCAATTGAC	
PAC8E34	PM5	GCAACCTGATTTTCCTCCTATT	273
	PM6	GAAGCAAGATATCTGTGGAAGTAA	
PAC8E31	PM23	AATTTGGCCATTTGTACTCTG	216
	PM24	TTTTACTAGGGTGTGACACTTTG	
PAC8E27	PM3	GAACTCAAGATGTGACGTTTGTA	253
	PM4	CTGGCCCACTTTATGAATCT	
PAC8E24	PM43	ACGGCTGGTGTTTTGTAATAAC	201
	PM44	ATCTGTGCTTCGTCATTTAATG	
PAC8E23	PM21	TCTCTCTCCTTGGCAATAGC	230
	PM22	AATGTGTACGCTCTGCTTTCTC	
PAC8E22	PM41	TGGCAGTGGTTTTCTTTTC	171
	PM42	TTCACAGACATTTGGATGATTC	
PAC8E19	PM39	TAGTGGATGCTCTACATACTCG	396
	PM40	TTATCAGAAAAGCTCAGGTGTC	
PAC8E18	PM1	CATGAGCATCTGGCAAATG	238
	PM2	CAGAGTGAGAATGTGGAAAGTG	
PAC8E17	PM37	AGCCTGTATCTGGTATTCAAACCTC	278
	PM38	TGGATAGTATATGGTTGGACATTC	
PAC8E14	PM35	ACTGCTGAAGCTGGTATCTAACTG	288
	PM36	AACACCAGCCATCTCAAGG	

Tabelle 7.1 (Fortsetzung)

PAC 8 Amplimere für Hybridisierungssonden			
Name der Sonde	Name der Primer	Sequenz der Primer	Größe [bp]
PAC8E9	PM31	AAATCAGCCAGAAAGAGACAGC	323
	PM32	AGTGTGCAGAAAGCCAAGC	
PAC8E8	PM13	AGTTATTTGGAGGGACAGCGATG	298
	PM14	CTCAGAGCGGCTCAGGACA	
PAC8E3	PM57	TATGCTATATCTAAGGGGGACTC	248
	PM58	TGCTGATGATAACTGCTAATACC	
PAC8E2	PM59	AGGAAGAGAACACTAGCACAAATC	258
	PM60	TACAGGCAGCTCTTTTTTTCTTAC	

Tabelle 7.2

PAC 8 RT-PCR Primer			
Nr.	Name	Sequenz	Ann. T [°C]
1	PAC8437u1965	AGTACATCCAGACAAGTTGA	56
2	B4F7L107	CTGTCCTCTGTAGCAAGTAT	56
3	B4F7U	GAGCTGTCTCCAGAGTCT	56
4	B4F7L	CTGTCCTCTGTAGCAAGTAT	58
5	PM1PAC8E18U	CATGAGCATCTGGCAAATG	56
6	PM5PAC8E34U	GCAACCTGATTTTCCTCTATT	56
7	PM6PAC8E34L	GAAGCAAGATATCTGTGGAAGTAA	56

Die Primer Nr. 2, 3 und 4 wurden von O. Schmidt entworfen (O. Schmidt, 1998).

Tabelle7.3

<i>TRPS 1</i> Amplimere		
Name	Exon	Größe [bp]
PM 94-91	3	689
PM65-64	6	315
PM63-62	7	552
PM67-66	7	578

Tabelle7. 4

Primer für die <i>TRPS 1</i> RT-PCR					
Name des Produktes	Name der Primer	Sequenz 5'> 3'	Exon	Ann. T [°C]	Größe des Produktes [bp]
PM 91-94	PM 91	GGCTGAACTGCACCATGTTAT	3	56	689
	PM 94	TACGGATCAGAGTGATGCTG	3		
PM 67-66	PM67	GCCTTATCCCACCTTCAAT	7	58	578
	PM66	CTCATCAAAAGAAAGAATAACAAA	7		
PM 72-73	PM72	GAATGCAAATGGCGGATA	6	56	173
	PM73	GAGCTGCTCAGCCTGAAGT	7		
RT1	PM144	TTCCTCCGCGAAGGCTCCTTTGATATT	1	68	726
	PM129	CTCACTCAAAACTGCGCTTTTCAAGTCCTTC	3		
RT2	PM145	GGTTTCTCCAGACCTCGCGTCCTC	1	68	577
	PM129	CTCACTCAAAACTGCGCTTTTCAAGTCCTTC	3		
RT3	PM 104	GAACATTATGGCAAGCAGCA	4	56	1001
	PM 83	CTGGAActCTCGGTCCAAC	5		
RT4	PM148	CCTGTGTCTGGCACCCAAGAGCAG	5	68	5707
	PM154	AAAGTCCCACGCGGCGTCCTTCTAT	7		
RT5	PM101	GAAGCTCGCGAGTCAAACAT	4	56	1242
	PM61	CCAGGACTGGCTGCTGAGC	7		

Tabelle 7.5

PCR-Primer für die Mutationsanalyse				
Exon	5' Primer	Sequenz des 5' Primers 5' > 3'	Ann. T [°C]	Größe [bp]
	3' Primer	Sequenz des 3' Primers 5' > 3'		
3	PM120	TTTTTCCTAGAGGAAGCATTGTA	58	389
	PM119	TTGAAGCCAGCCTTCTCACT		
3	PM118	GAACTAAATCATAAGGAGGAACAT	56	343
	PM117	CTTGCCCTGTTTCCTCTGTA		
3	PM109	AAGAGCAGAGGCAGATGACC	58	399
	PM108	CTGTCCAGCTCAGCATCTTG		
3	PM89	CCTTCAGATGGGGGTGTAAG	56	454
	PM88	Tggtactgggaccttggtt		
4	PM139	Gcagagggccattgaatta	56	381
	PM140	GGCACTGAGTACCCAACAGG		
4	PM102	GCAACTCATCCACCGAATTA	56	415
	PM103	TTAATGACAGAGCCCCTGGA		
4	PM104	GAACATTATGGCAAGCAGCA	56	383
	PM105	TCTCCAAGGTGCTTTTCTGG		
4	PM106	GACAGACAAGAGCTCGAGTGG	56	447
	PM107	TGTTTGACATCCGATGCTTG		
4	PM101	GAAGCTCGCGAGTCAAACAT	56	351
	PM100	Aactccccaagtcattggaa		
5	PM80	Cccttcagaacgctgtctt	56	493
	PM81	GCCTCCACATTGGGACTATC		
5	PM87	GTGATGACCTTCGCAATGTG	56	355
	PM86	Ccttttgccttcaaaaca		
6	PM65	Catgtgactcacctetgacct	56	315
	PM64	Cataaatcacatgtgcactcaa		

Tabelle 7.5 (Fortsetzung)

PCR-Primer für die Mutationsanalyse				
Exon	5' Primer	Sequenz des 5' Primers 5' > 3'	Ann. T [°C]	Größe [bp]
	3' Primer	Sequenz des 3' Primers 5' > 3'		
7	PM70	Cttaagcatggtttatatttgga	60	439
	PM71	CCTGAGGACTTTTTATCTGAATGT		
7	PM76	CCAGCCAAAGAAAATACGA	56	564
	PM77	CCTTCGTTTTCTCCTTGGA		
7	PM67	GCCTTATCCCACCTTCAAT	58	578
	PM66	Ctcatcaaaagaagaataacaaa		

Tabelle 7.6

Sequenzierungsprimer für <i>Trps</i> 3' UTR		
Name	Sequenz 5' > 3'	Ann. T [°C]
PM179	CCGAGAAAAGTTTGGCATCAT	56
PM182	GTGACACGTGCCTTTTTGG	56
PM190a	GGCGCAGAAAGAAAGAGTTC	56
PM191	CCGAGCAAAGCAAGGATAAC	56
PM192	GGCGCAGAAAGAAAGAGTTCAT	56
PM193	CTATTGGCCCATCCATTCAG	56
PM194	TGAAACATGGTCAATGAGAGG	56
PM195	CCCATCCATTCAGAAACCTG	56
PM196	GGTGAATGAGGAGCTTTGA	56
PM197	CCTCTCAGATTGGCCCTCTT	56
PM198	CAAATGTTTACAAGAACGGAAA	56
PM199	TGGTGTGGAAAACAAGAAGG	56
PM200	TTTCATCTGAAACAGACAAAGCA	56
PM205	TTTTTGATGACCTAAAGTTTTGATT	56

Tabelle 7.6 (Fortsetzung)

Sequenzierungsprimer für <i>Trps</i> 3'UTR		
Name	Sequenz 5'>3'	Ann. T [°C]
PM206	GCAAAGTCAGAAAGCCTTTAACC	56
PM207	TTTGCTGAGAACACATGGTATTT	56
PM208	CATGCATGTGGTTTGGTTTC	56
PM211	GCCTGAAGAACGAGATCAGC	56
PM212	GCCAGAGGCCACTTGTGTAG	56
PM222	TGGTTGGGACAATATAATGCAA	56
PM228	AGGCAGCAACAGAAGCTACG	56
PM229	GGGGGAATCCTGAAATTACG	56
PM233	GGACTGCCCAATTCAACAAC	56
PM234	AAAGGCATTTGAAGACTTTTGTC	56
PM235	AGCATGGGGGATTCTTTTCT	56
PM236	TGCTGTCTCTAGGCCATAGTCC	56
PM237	TCCACCTAGTTCAATGGATAAAG	56
PM250	AGGAGAGGATGTGGGGAGAT	56
3'UTR1	CATGCTGTGGCATTGTTTTTCTGGATG	72
3'UTR2	TTCCTATGCAGGCCCTCTGGATATGT	72
3'UTR3	TTGCATTCTGTAGTGGCGTTGCACTC	72
3'UTR4	AGGCCACCATAGCATCAGGAAGGTAA	72
3'UTR5	AACCATACCAAAGCCGTCATGGATAACT	72
3'UTR6	GATGTAACAGACATCTTTGCTGCCTGA	72

Tabelle 7.7

Sequenzierungsprimer für die <i>Trps</i> Exon/Intron Übergänge			
Name	Sequenz 5'>3'	Exon	Ann. T [°C]
M20u226	CCAAGATCAACTCTGCAAAC	1	56
M20l427	CTTCCCAGATACCTTGCTCT	2	56
Exon34l1562	TGTCATCTCCAGCTTTGACT	2	56
Exon34l1823	TCAATGGCTCTCCTTCTACA	3	56
Exon45u706	CCACTTCTCCGTCATTATCA	3	56
Exon45l1302	GTCAATTTTGGGCTCTTCTT	4	56
Exon56u334	AGACATCCTACGGGGTAGTC	4	58
Exon56l717	TTCTGGTAGAGACCACATGC	5	56
PM71	CCTGAGGACTTTTTATCTGAATGT	6	58

Tabelle 7.8

<i>Trps1</i> Amplimere für Hybridisierungssonden			
Name der Sonde	Name der Primer	Sequenz des Primers 5'>3'	Größe [bp]
PM175-176	PM175	GCTCAGGTTTGGGGAATAGA	203
	PM176	GCTGGGGATATGCTACCTGA	
PM 177-178	PM177	GCTTCACCTAGGCAGCAATG	203
	PM178	TGGGTTAGAGCAGTTCACCA	
PM 180-181	PM180	CATTGCGTTTTCCACCACTA	528
	PM181	TTCATCTCAATGTCTAGGCAAAA	
PM 242-243	PM242	CAGAGCAAGGATGAGCCATT	211
	PM243	CCCGGGATAAAAACAGACCT	
PM244A-245	PM244A	TTTGACAACATGATTGATCTGG	178
	PM245	TACCCACAGTCTGGTGTTT	

Tabelle 7.8 (Fortsetzung)

<i>Trps1</i> Amplimere für Hybridisierungssonden			
Name der Sonde	Name der Primer	Sequenz des Primers 5'>3'	Größe [bp]
PM246-247	PM246	CCTGATTTGAACACCAGACTGT	169
	PM247	CAGACATCTTTGCTGCCTGA	
PM248-249	PM248	CAAACAATCTTCAGGCAGCA	193
	PM249	AGGTGACCTGGTTTCAGTTTT	

Tabelle 7.9

Sequenzierungsprimer für das Xba I Fragment		
Name	Sequenz 5'>3'	Ann. T [°C]
PM 217	TAAGAATGTACAATCCCATATGTTAG	56
PM 218	GATAATAGCTGGCCCATGAAAC	56
PM219	CCATTTTTATCTTGGGAAGCTG	56
PM223	TCAATTGCCAAACTTAAGGGTA	56
PM224	CATATGCACACTGAACCTGGA	56
PM 251	TGGATCTCGTAGGTGAACATCA	56

Tabelle 7.10

Sequenzierungsprimer für das <i>Neo</i> -Gen		
Name	Sequenz 5'>3'	Ann. T [°C]
PM 238	GCTTGGGTGGAGAGGCTATT	56
PM 239	CTCGTCCTGCAGTTCATTCA	56
PM 240	GCCGAATATCATGGTGGAAA	56
PM241	GCGATACCGTAAAGCACGAG	56

Tabelle 7.11

Sequenzierungsprimer für das <i>Trps</i> Knock-out E1c Fragment		
Name	Sequenz 5'>3'	Ann. T [°C]
PM 209	AGACCATCTTGCCTTTGCAG	56
PM 230	CATAATTTGGCTGAGGAGCA	56
PM 257	ACAGATGAGCTGGCCTGAC	56
PM261	GACTGAGTGCTCCCTGGATT	56

Tabelle 7.12

Sequenzierungsprimer für das <i>Trps</i> E3 Fragment		
Name	Sequenz 5'>3'	Ann. T [°C]
PM 67	GCCTTATCCCACCTTCAAT	56
PM 71	CCTGAGGACTTTTTATCTGAATGT	56
PM 73	GAGCTGCTCAGCCTGAAGT	56
PM 254	CGTATATTTACCTTTGCAATTCTTT	56
PM 255	AAAACCCTGCTTGCAGAAGA	56
PM 258	GCTGCAACCTAGGTCTAAAACA	56
PM 259	AAGTGAAAGTCATCCGAGAGAAA	56
PM 260	GTGCCTTGGTTTTCTCCTTG	56

Tab. 7.13

Primer für <i>Trps</i> Knock-in		
Name	Sequenz 5'>3'	Ann. T [°C]
PM 201	TGAATTCCTAATCACAAGGGAAG	56
PM 202	AAAAACACCAGATCCTCTTCG	56
PM 203	GAAGAGGATCTGGTGTTTTTTTGTGCCAATTGCCTGCCACAAAGA	72
PM204	AGACAGCAGAAGCAATGGAAGAGGACGGATCCATCGTGGTCAGG	72
PM 215	GATTGCCATGGTGAAGTGC	56
PM 216	GGACGGATCCATCGTGGT	56
PM225	CTCCAACATCTTGCCCTGT	56

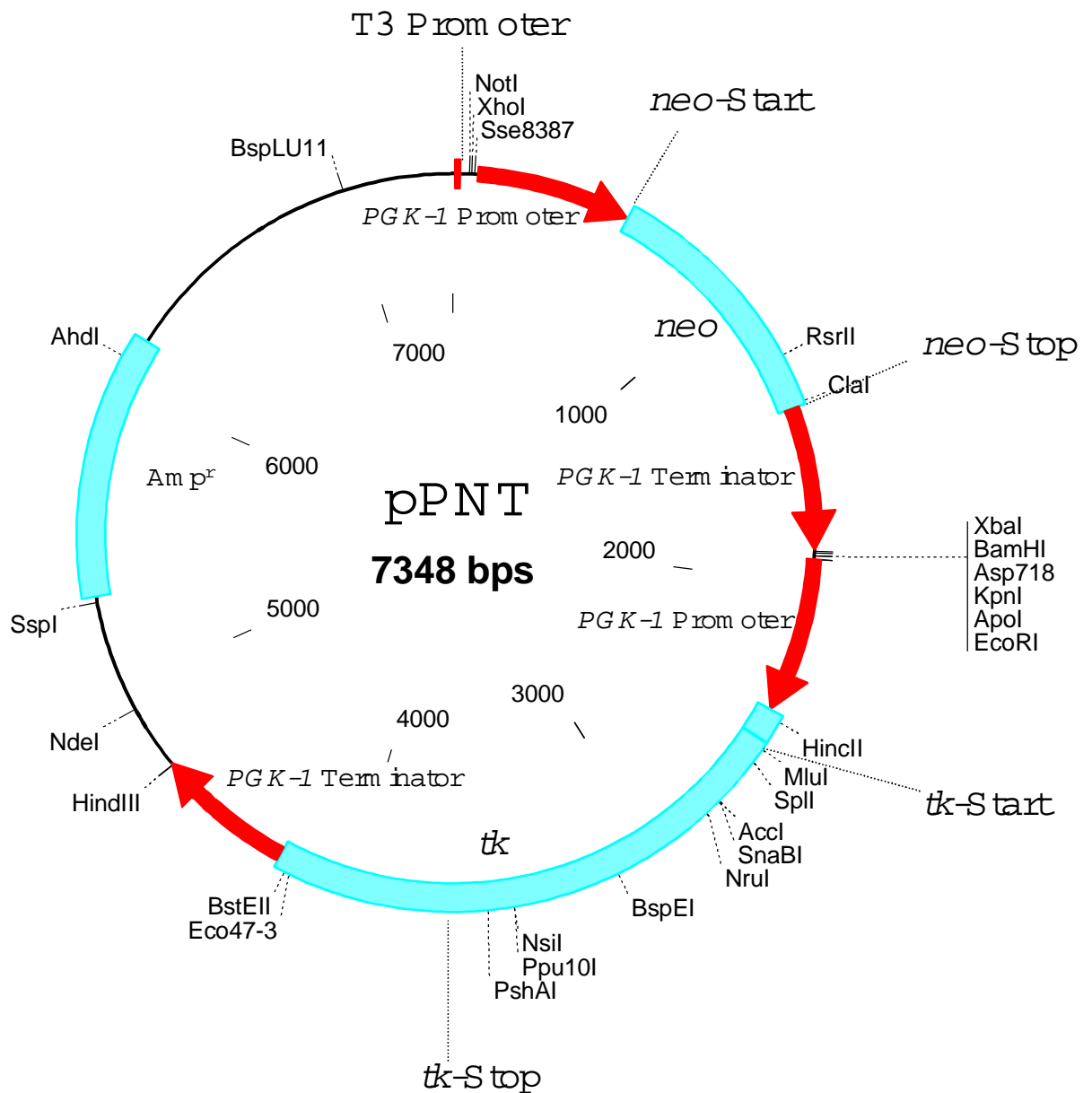


Abb. 7.1: pPNT Vektor. Position der Referenzpunkte in bp: 7-23 T3 Promoter in pBluescript SK(+), 54-61 *NotI* Schnittstelle in pPNT, 600-602 *neo* Startkodon, 1401-1403 *neo* Stopkodon, 1914-1919 *EcoRI* Schnittstelle, 2519-2521 *tk* Startkodon, 3647-3649 *tk* Stopkodon, 4714-7348 pUC18/Bluescript SK+ Vektor.

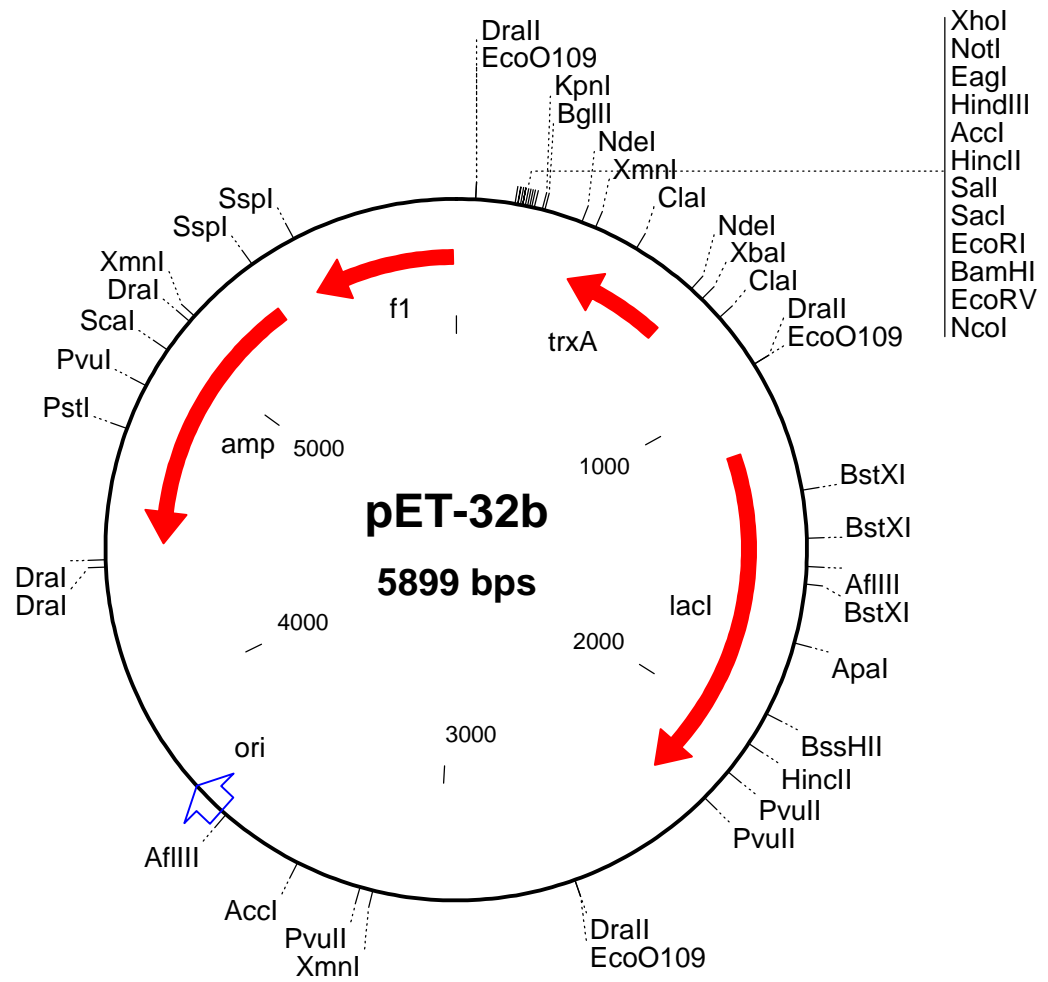


Abb.7.4: Die Restriktionskarte und multiple Klonierungstelle von pET32b.

Sequenz 7.1: pPNT Vektor

- 7-23 T3 Promotor in pBluescript SK(+)
 54-61 single *NotI* Stelle in pPNT
 71-78 single *Sse8387I* Stelle in pPNT
 81-587 *EcoRI*(zerstört)-*TaqI* Fragment von PGK-1 Promotor
 589-1418 *PstI-HincII* (zerstört) *neo*-Gen beinhaltet ein Fragment aus pKJ1deltaB
 (entstanden aus pKJ1 der von pMC1*neo* entstanden ist).
 600-602 *neo*-Startkodon
 1401-1403 *neo*-Stopkodon
 1419-1883 *PvuII* (vernichtet)-*HindIII* (gefüllt) Fragment von PGK-1 Terminator
 1914-1919 single *EcoRI* Stelle in pPNT
 1914-2421 *EcoRI-TaqI* Fragment aus dem PGK-1 promotor
 2423-4253 *PstI-PvuII* (zerstört) Fragment von HSV-1 beinhaltet *tk*-Gen.
 2519-2521 *tk*-Startkodon
 3647-3649 *tk*-Stopkodon

4257-4714 *PstI-HindIII* Fragment aus dem *PGK-1* Terminator

4714-7348 pUC18/Bluescript SK+ Vektor backbone

GCTCGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGC
 TCGAGGGCCCTGCAGGTCAATTCTACCGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTG
 GAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGC
 ACACATTCACATCCACCGGTAGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCC
 ACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCGCCCCGAGCTCGCGTCTGTCAGG
 ACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGC
 AATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTG
 GGCTCAGAGGCTGGGAAGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGG
 GCGGGCGCAAGGTCTCCCGAGGCCCGGCATTCTCGCACGCTTCAAAGCGCACGTCTGC
 CGCGCTGTTCTCCTCTTCCCTCATCTCCGGGCCTTTTCGACCTGCAGCCAATATGGGATCGGC
 CATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGC
 TATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGTGTTCGGCTGTCAGCGC
 AGGGGCGCCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGA
 CGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGAC
 GTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCC
 TGTCACTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCT
 GCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGA
 GCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG
 GGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGATGATCT
 CGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCT
 GGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTA
 CCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGG
 TATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA
 GGGGATCGATCCGTCTGTAAAGTCTGCAGAAATTGATGATCTATTAACAATAAAGATGTC
 CACTAAAATGGAAGTTTTTCTGTACTTTGTTAAGAAGGGTGAGAACAGAGTACCTAC
 ATTTTGAATGGAAGGATTGGAGCTACGGGGTGGGGTGGGGTGGGATTAGATAAATGCCT
 GCTCTTTACTGAAGGCTCTTTACTATTGCTTTATGATAATGTTTCATAGTTGGATATCATA
 ATTTAAACAAGCAAACCAAATTAAGGGCCAGCTCATTCTCCCACTCATGATCTATAGAT
 CTATAGATCTCTCGTGGGATCATTGTTTTTCTTTGATTCCCACTTTGTGGTTCTAAGTAC
 TGTGGTTTTCAAATGTGTCAGTTTCATAGCCTGAAGAACGAGATCAGCAGCCTCTGTTCCA
 CATACTTCACTTCTCAGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCATCAGAAGCTGACTCTAG
 AGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAG
 TCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCC
 TCGCACACATTCACATCCACCGGTAGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCG

CGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCGCCCCGCAGCTCGCGTCGTG
CAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCT
GAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTT
TCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGG
CGGGGCGGGCGGAAGTCTCCCGAGGCCCGGCATTCTCGCACGCTTCAAAGCGCACGT
CTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCATCTCCGGGCCTTTCGACCTGCAGCGACCCGCTTAA
CAGCGTCAACAGCGTGCCGCAGATCTTGGTGGCGTGAAACTCCCGCACCTCTTCGGCCAGC
GCCTTGTAGAAGCGCGTATGGCTTCGTACCCCTGCCATCAACACGCGTCTGCGTTCGACCA
GGCTGCGCGTTCTCGCGGCCATAACAACCGACGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAACAA
AAAGCCACGGAAGTCCGCCTGGAGCAGAAAATGCCACGCTACTGCGGGTTTATATAGACG
GTCCCCACGGGATGGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTCGCGCGA
CGATATCGTCTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGGCTTCCGAGACA
ATCGCGAACATCTACACCACACAACACCGCCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGGACG
CGGCGGTGGTAATGACAAGCGCCAGATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGC
CGTTCTGGCTCCTCATATCGGGGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCGCCCCCGGCCCTC
ACCCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCGCCCTCCTGTGCTACCCGGCCGCGGATAACC
TTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCTGGCCCTCATCCCGCCGACCTT
GCCCGGCACAAACATCGTGTGGGGGCCCTTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCCTGGCC
AAACGCCAGCGCCCCGGCGAGCGGCTTGACCTGGCTATGCTGGCCGCGATTTCGCCGCGTTT
ATGGGCTGCTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGGGCGGCGGGTTCGTGGCGGGAGGATTG
GGGACAGCTTTCGGGGGCGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAGCCCCAGAGCAACGCGGGC
CCACGACCCCATATCGGGGACACGTTATTTACCCTGTTTCGGGCCCCCCGAGTTGCTGGCCC
CCAACGGCGACCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCTTTGGACGTCTTGGCCAAACGCCTCCG
TCCCATGCATGTCTTTATCCTGGATTACGACCAATCGCCCGCCGGCTGCCGGGACGCCCTG
CTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACCCACGTACCCACCCAGGCTCCATACCGACGA
TCTGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCCTGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGG
AGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGG
GTGTTGGGTGTTTTGTTTATAAACCGCGGGGTTCCGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATAC
CCCACCGAGACCCCATTTGGGACCAATACGCCCGCGTTTTCTTCTTTTCCCACCCCAACCC
CCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCCGGGGCGGCAAGCCCTGCCATAG
CCACGGGCCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCCATGGGGAATGGTTTATGGTTTCGTGGGG
GTTATTTATTTGGGCGTTGCGTGGGGTACAGTCCACGACTGGACTGAGCAGACAGACCCAT
GGTTTTTGGATGGCTGGGCATGGACCGCATGTACTGGCGCGACACGAACACCGGGCGTCT
GTGGCTGCCAAACACCCCGACCCCAAAAACCACCGCGCGGATTTCTGGCGCCGCGGAC
GAACTAAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCTTCTTCGCTGGTACGAGGAGCGCTTTTTGTT
TTGTATTGGTACCCACGGCCGAGTTTCCGCGGGACCCCGCCAGGACCTGCAGAAATTGAT
GATCTATTAACAATAAAGATGTCCACTAAAATGGAAGTTTTTCTGTACTACTTTGTAA
GAAGGGTGAGAACAGAGTACCTACATTTTGAATGGAAGGATTGGAGCTACGGGGGTGGGG
TGGGGTGGGATTAGATAAATGCCTGCTCTTTACTGAAGGCTCTTTACTATTGCTTTATGAT
AATGTTTCATAGTTGGATATCATAATTTAAACAAGCAAAACCAAATTAAGGGCCAGCTCAT
TCCTCCCACTCATGATCTATAGATCTATAGATCTCTCGTGGGATCATTGTTTTTCTCTGA
TTCCCACCTTGTGGTTCTAAGTACTGTGGTTTCCAAATGTGTGAGTTTCATAGCCTGAAGA
ACGAGATCAGCAGCCTCTGTTCCACATACACTTCATTCTCAGTATTGTTTTGCCAAGTTCT
AATTCCATCAGAAGCTTGGCACTGGCCGTGTTTTACAACGTCTGACTGGGAAAACCCCTG
GCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGA
AGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTG
ATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCA
GTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGA
CGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCC
GGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCAACCCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCC
TCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGG
TGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCA
AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGA
AGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTTGCCT
TCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGT

GCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCC
CCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATC
CCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG
GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGAT
CGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTG
TAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG
GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC
CTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAACTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTA
TCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGG
GAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATT
AAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTC
ATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCT
TGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAG
CGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAG
CAGAGCGCAGATAACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG
AACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA
GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA
GCGGTCGGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACC
GAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG
GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGA
TTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTT
TACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGA
TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACG
ACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTC
TCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGC
GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTA
CACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAG
GAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAA

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke danke ich für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. Hermann-Josef Lüdecke danke ich für die intensive und geduldige Betreuung, seine fachkundige Ratschläge, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine unzählige Anregungen haben maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Passarge möchte ich für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die fortwährende Unterstützung danken.

Frau Dr. Karin Buiting und Herrn Dr. Olaf Schmidt danke ich besonderes für die zahlreichen Hilfestellungen und interessanten, wissenschaftlichen Diskussionen. Ihnen, Frau Diane von Holtum, Herrn Frank Kaiser, Herrn Frank Tschentscher und Frau Maren Runte möchte ich herzlich für die gute enge und freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

Herrn Frank Tschentscher und Frau Maren Runte möchte ich ganz herzlich für die sprachliche Korrektur dieses Manuskriptes bedanken. Herrn Frank Kaiser möchte ich für die zahlreiche Hilfestellungen bei den Computerfragen bedanken.

Für die hervorragenden Sequenzierungen möchte ich Frau Diane von Holtum, Frau Stephanie Groß, Frau Martina Klutz und Frau Bianca Beyer danken. Frau Christina Lich und Frau Birgit Brandt danke ich für die DNA-Extraktion aus Patientenblut.

Herrn Dr. Michael Zeschnigk, Herrn Dr. Dietmar Lohmann und Frau Dr. Claudia Färber danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die angenehme und freundliche Zusammenarbeit. Dies gilt auch für alle Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik, die in irgendeiner Form zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Gernot Glöckner und Herrn Prof. Dr. Andre Rosenthal (Abteilung der Genomanalyse, Institut für molekulare Biotechnologie, Jena) danke ich für die Sequenzierung und Computeranalyse der PAC-Klone. Herrn Prof. Dr. Tarik Möröy und Frau Beate Fraß (Institut für Zellbiologie und Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen) danke ich für die Zusammenarbeit bei der geplanten Herstellung eines Mausmodells.

Allen Ärzten, die uns Material von Patienten zur Verfügung gestellt haben, möchte ich herzlich danken.

Frau Kum-Sun Shin danke ich für die fotografischen Arbeiten.

Persönlich danke ich meiner Tochter Pardis und meinem Mann Parviz für die immerwährende Unterstützung und Anteilnahme. Meinen Eltern, meinen Schwestern und ihren Familien danke ich für das Interesse und ihrer Unterstützung am Verlauf meiner Arbeit.

Lebenslauf

persönliche Daten

Name	Parastoo Momeni
Geburtsdatum	13. Juni 1964
Geburtsort	Iran
Schul Ausbildung	
1970-1975	Grundschule
1976-1978	Orientierungsschule
1978-1982	Gymnasium „22 Bahman“ (Tehran)
Juli 1982	Abitur
Berufsausbildung	
1985-1992	Biologiestudium an der Tehran-Universität
1993 - 1994	Besuch von Kursen zur Erlernung der deutschen Sprache, PNdS (Prüfung zum Nachweis deutscher Sprachkenntnisse)
1994-1997	Biologiestudium an der Gesamt-Hochschule Kassel GHK
1997-1998	Diplomarbeit in der Genetikabteilung der Gesamthochschule Universität Kassel bei Prof. Dr. Wolfgang Nellen mit dem Thema: „Isolierung von Genen für dsRNasen aus Arabidopsis thaliana und Dictyostelium discoideum“.
15. Mai 1998	Beginn der Promotion als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik der Universität GH Essen bei Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Identifizierung und Charakterisierung des menschlichen TRPS1-Gens“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Parastoo Momeni befürworte.
Essen, den 29.5.2001

(Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.
Essen, den 29.5.2001

(Parastoo Momeni)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.
Essen, den 29.5.2001

(Parastoo Momeni)