

## Abstrakt

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 Kernlokalisierungssignalen 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 ATTTAAA, 5 klassische AATAAA 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.