

## Zusammenfassung

Bei dem „Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrom“ (TRPS) handelt es sich um eine autosomal dominante Erkrankung, die durch craniofaziale und skelettale Missbildungen charakterisiert wird. Die genetische Ursache dieser Erkrankung liegt in verschiedenen Mutationsarten des *TRPS1* Gens. Analysen *Trps1* defizienter Mäuse deuten auf eine Funktion von *Trps1* in der Chondrogenese hin. Das *Trps1* Gen kodiert für ein Multizinkfinger(Zf)-Protein, welches neun Zf-Domänen beinhaltet. Diese vermitteln die Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren Gli3a und Runx2 sowie der Histondeacetylase Hdac4, bei denen es sich um Regulatoren der Chondrozytenproliferation und -differenzierung handelt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass *Trps1* erstens über die verschiedenen Zinkfingerdomänen als Adaptorprotein für die Bindung zahlreicher Interaktionspartner dient und zweitens ein Bestandteil von Multiproteinkomplexen ist.

Zur Aufklärung der *Trps1*-Funktion wurden Ko-Immünpräzipitationen (Ko-IPs) mit potenziellen Interaktionspartnern durchgeführt. Dabei konnte eine Interaktion zwischen *Trps1* und weiteren wichtigen Regulatoren der Chondrogenese wie *Mef2c*, *Sin3a* und *Sox9* nicht nachgewiesen werden. Das Hitzeschockprotein *Hsp90 $\beta$*  und die Histondeacetylase *Hdac1* dagegen wurden als neue *Trps1*-Interaktionspartner identifiziert. Interessanterweise interagiert *Trps1* nicht mit *Hdac2*, obwohl dieses eine 85 %ige Homologie zu *Hdac1* aufweist und in vielen Prozessen mit redundanter Funktion beschrieben wurde. Mit Hilfe von Deletions-konstrukten wurden die Interaktionsdomänen für *Trps1* und *Hdac1* eingegrenzt. Dabei ist die *Hdac1* Deacetylasedomäne für die Interaktion notwendig. Diese Domäne ist in allen Hdacs vorhanden, in den *Trps1*-interagierenden Hdacs 1, 4 und 6 konnten jedoch spezifische Sumoylierungsstellen identifiziert werden. Ob die Sumoylierung für die Interaktion von Bedeutung ist, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Für *Trps1* konnten die Zf 7-9 als interaktions-relevanter Bereich identifiziert werden. Dieser ist für die Interaktion mit weiteren Proteinen, wie beispielsweise *Runx2*, einem Hauptregulator der Knochen-entwicklung, verantwortlich. Da *Runx2* ebenfalls mit Hdacs interagiert, wäre die Ausbildung eines gemeinsamen regulatorischen Komplexes möglich. Weitere Hinweise hierfür lieferte die Beobachtung, dass mittels FRET-Analyse keine direkte Protein-Proteininteraktion gezeigt werden konnte.

Demzufolge könnten Trps1 und Hdac1 Bestandteile eines Multiproteinkomplexes sein, in dem sie über andere Proteine verknüpft sind.

Um diese mögliche Komplexbildung zu untersuchen, wurden Gelfiltrationen durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass Trps1 und seine Interaktions-partner in 500-150 kDa großen Komplexen vorliegen. Nach Isolation und Aufreinigung konnten Hdac1, Hdac4 und Hsp90 $\beta$  in Trps1-Komplexen > 500 kDa nachgewiesen werden. Ob diese Komplexe während der Chondrogenese erhalten bleiben, wurde anhand der chondrogenen ATDC-5 Zelllinie untersucht, die bis zum Stadium von hypertrophen Chondrozyten differenziert wurde. Während der Differenzierung reduzierte sich sowohl die Trps1-Proteinmenge als auch das Größenspektrum der Trps1-Komplexe. Im Unterschied zu undifferenzierten ATDC-5 Zellen war in differenzierten Zellen eine geringere Menge an Hdac4 vorhanden und konnte nicht mehr mit Trps1 präzipitiert werden. Hdac1 und Hsp90 $\beta$  lagen auch in differenzierten ATDC-5 Zellen in Trps1-Komplexen > 500 kDa vor. Aufgrund der kalkulierten Größen müssen jedoch noch weitere, bislang unbekannte oder nicht untersuchte, Trps1-Bindepartner vorliegen, deren Identifikation zum Verständnis der Regulation der enchondralen Ossifikation beitragen kann.