

**Neue Marker und ihr diagnostischer Einsatz bei  
pathomolekularen Veränderungen an Chromosom 22**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
vorgelegt von

Kristina Schröder

aus Borghorst

2000

Tag der mündlichen Prüfung:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

17. März 2000

Prof. Dr. W. Wohleben

Prof. Dr. N. Blin

Prof. Dr. E. Meese

„ Das Problem ist, glaub ich, wenn ich mal ganz ehrlich zu euch sein darf, daß ihr selber wohl nie richtig gewußt habt, wie die Frage lautet... Wenn ihr erst mal genau wißt, wie die Frage wirklich lautet, werdet ihr auch wissen, was die Antwort bedeutet. “

*Douglas Adams, Per Anhalter durch die Galaxis*

## **Mein besonderer Dank gilt:**

Herrn Prof. Dr. Nikolaus Blin für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine freundschaftliche Unterstützung und unermüdliche Diskussionsbereitschaft, sowie die Ermöglichung der vielen interessanten Kongreßreisen und Auslandsaufenthalte,

Herrn Prof. Dr. Eckart Meese, Institut für Humangenetik, Homburg/Saar, für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine freundliche Unterstützung während meines Aufenthalts in seiner Abteilung,

Herrn Dr. Hans-Werner Müller, Institut für Humangenetik, Homburg/Saar, für seine Bereitschaft und Geduld, mich in die Methode des Exon-Trappings einzuweißen, sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mir meine beiden Aufenthalte dort sehr angenehm gestaltet haben,

den Kolleginnen und Kollegen meiner Arbeitsgruppe für ihre freundschaftliche Unterstützung (vor allem den Löwinnen!) und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre; im besonderen Frau dipl. biol. Susan Kupka für das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit und Herrn cand. biol. Peter Leistenschneider für den Verzicht auf seinen Computer,

den Kolleginnen und Kollegen aus Dresden, allen voran Priv. Doz. Dr. Oliver Bartsch und Frau Dr. Annett Wagner für die gute Kooperation und den steten Informationsaustausch,

den Kolleginnen und Kollegen aus Porto, die mir nicht nur neue molekulargenetische Methoden, sondern auch die kulturellen und kulinarischen Besonderheiten ihrer Stadt nahe gebracht haben,

Herrn Dr. Bruce Roe, der mich freundlicherweise bei der Zusammensetzung meines Sequenzpuzzles unterstützt hat,

Frau Dr. F. Pedoutour, Herrn Prof. Dr. J. Limon, Frau Prof. Dr. A. Latos-Bielenska für die Überlassung der klinischen Fälle und die Informationen über die Patienten,

Frau Dr. Claudia Labouvie, die mich trotz der Entfernung in allen Lebenslagen unterstützt hat und ohne die es kein Dreamteam gäbe,

meinen Freunden, die immer Verständnis für meine „stressige Arbeit“ hatten und stets für mich da waren

und nicht zuletzt meinen Eltern und meiner Schwester für ihre liebevolle Begleitung während all dieser Jahre.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das Humane Genom Projekt.....	1
Tabelle 1.1.1.: Modellorganismen im Rahmen des HGP .....	3
Tabelle 1.1.2: Stand des HGP .....	4
1.2. Kartierung des menschlichen Genoms .....	4
1.2.1. Genetische Kartierung.....	4
Tabelle 1.2.1.: Übersicht über die Verwendung genetischer Marker.....	5
1.2.2. Physikalische Kartierung.....	6
Tabelle 1.2.2.: Klonierungssysteme .....	7
1.2.3. Transkriptionskartierung und Identifizierung von Genen.....	8
1.3. Chromosom 22 .....	10
Abb. 1.3.: Ideogramm von Chromosom 22 gemäß ISCN.....	10
1.3.1. Kartierung von Chromosom 22 .....	11
1.3.2. Sequenzierung von Chromosom 22.....	13
1.3.3. Hetero-und Euchromatin .....	14
Abb.1.3.3.: Schematische Darstellung eines Chromosoms, die die Verteilung des Hetero-und Euchromatins und deren Aufbau erklärt.....	14
1.3.4. Klinische Bedeutung des Chromosoms 22.....	15
1.3.5. Fallbeispiele.....	19
Abb.1.3.5.4.: Patient K.M. im Alter von 10 Jahren.....	23
1.4. Ziele der Arbeit .....	24
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.1. DNA-Isolierung.....	26
2.1.1. BAC-Isolierung.....	26
2.1.2. Plasmid-Isolierung .....	26
2.2. Exon-Trapping-System zur Isolierung interner Exons .....	26
2.2.1. pSPL3 Vektor .....	29
Abb. 2.2.1.a: Karte des Exon-Trapping Vektors SPL3.....	29
Abb. 2.2.1.b: schematische Darstellung der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pSPL3.....	30
2.2.2. Exon-Kontroll-Plasmid .....	30
2.2.3. Subklonierung der BAC-Fragmente in den Vektor pSPL3.....	30
2.2.3.1. Präparation von pSPL3- und BAC-DNA für die Subklonierung .....	30
2.2.3.2. Ligation.....	32
2.2.3.3. Transformation.....	32
2.2.4. Transfektion durch Elektroporation.....	33
2.2.5. Isolation von Gesamt-RNA .....	34
2.2.6. cDNA-Synthese .....	35
2.2.7. Primäre PCR.....	36
2.2.7.1. Reduktion der Vektor-Produkte durch <i>Bst</i> X I-Verdau.....	36
2.2.8. Sekundäre PCR.....	37
2.2.9. UDG-Klonierung und Analyse der sekundären PCR-Produkte .....	38

2.3. Exon-Trapping-System zur Isolierung von terminalen 3'-Exons .....	40
Abb. 2.3.: schematische Übersicht des 3'-Exon-Trapping-Systems.....	41
2.3.1. pTAG4 Vektor .....	42
Abb. 2.3.1.: Karte des 3'Exon-Trapping Vektors pTAG4. 42	
2.3.2. Exon-Kontroll-Plasmid .....	42
2.3.3. cDNA-Synthese .....	43
2.3.4. Primäre PCR.....	43
2.3.5. Sekundäre PCR.....	44
2.3.6. UDG-Klonierung, Kolonie-PCR und Analyse .....	44
2.4. Sequenzierungen.....	45
2.4.1. Sequenzierung der klonierten Exon-Kandidaten.....	45
2.4.2. Computergestützte Analyse der DNA-Sequenzen.....	45
2.4.2.1. Korrektur der Sequenzdaten und Identifizierung der Exon-Sequenzen.	45
2.4.2.2. Sequenzvergleiche in öffentlichen Datenbanken via Internet .....	46
2.4.3. Sequenzierung des cDNA-Klons J1124.....	46
2.4.3.1. Genome Priming System (GPS <sup>TM</sup> -1) .....	46
Abb.2.4.3.1a: schematische Übersicht des GPS1-Genome Priming Systems.	47
Abb.2.4.3.1b: Transprimer <sup>TM</sup> -1 .....	48
2.4.3.2. Sequenzierung des cDNA-Klons J1124 .....	48
2.5. Charakterisierung der Exon-Kandidaten.....	48
2.5.1. Rückbestätigung der Exon-Kandidaten auf die Ausgangs-DNA .....	49
2.5.2. Zoo-PCR.....	50
2.5.3. PCR am monochromosomalen Hybridpanel.....	50
2.5.4. RT-PCR-Analyse .....	51
2.5.4.1. RNA-Isolierung.....	51
2.5.4.2. RNA-Formaldehydgel .....	51
2.5.4.3. RT (Reverse Transkription)-PCR .....	52
2.6. Southern Blot Analyse .....	53
2.6.1. Insert-Isolierung.....	54
2.6.2. Radioaktive PCR .....	55
2.6.3. Random Primed Labeling.....	55
2.6.4. Southern Transfer von BAC- und genomischer DNA (Passivblot).....	56
2.6.5. Filter Hybridisierung.....	57
2.7. Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	57
2.7.1. Prinzip der FISH .....	57
2.7.2. Objektträgervorbehandlung.....	58
2.7.3. Markierung der FISH-Proben mittels DOP-PCR .....	59
2.7.4. Dot-Blot-Analyse.....	61
2.7.5. Denaturierung der Ziel-DNA .....	62
2.7.6. Denaturierung und Prähybridisierung der Sonden-DNA.....	62
2.7.7. Hybridisierung .....	63
2.7.8. Stringenzwaschen .....	64
2.7.9. Detektion .....	65
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
3.1. BAC-Contig-Erstellung .....	67
3.1.1. Southernblot-Analyse.....	67

3.1.2. FISH-Experimente .....	68
Abb.3.1.2.: Ergebnis eines FISH-Experiments mit der BAC-Sonde 626B6 .....	68
3.2. Exon Trapping .....	68
3.2.1. CenBACs.....	69
Tabelle 3.2.1.: Homologie-Abgleich der centromeren Exon-Kandidaten-Sequenzen .....	70
3.2.2. TeloBACs.....	70
Tabelle 3.2.2.: Homologie-Abgleich der telomeren Exon-Kandidaten-Sequenzen.....	71
3.2.3. 22q13 BACs .....	71
Tabelle 3.2.3.1.: Liste der 22q13-spezifischen BACs, die in Exon-Trapping-Experimenten eingesetzt wurden.....	71
Tabelle 3.2.3.2.: Homologie-Abgleich für die 22q13-spezifischen Exon-Kandidaten-Sequenzen .....	72
3.3. Charakterisierung der centromeren Exon-Kandidaten .....	73
3.3.1. Rückbestätigung der Exonklone auf ihre Ursprungs-BACs .....	73
Abb. 3.3.1.: PCR mit den Primern 199-30 for und rev 74	
3.3.2. Lokalisation der Exon-Klone auf den Contig.....	74
Abb.3.3.2.1.: Detektion des Exons 199-30 als 8,5 kb große Bande auf den BACs 199F2 und 626B6. ....	75
3.3.3. Bestimmung der evolutionären Konservierung.....	76
Tabelle 3.3.3.: Ergebnisse der Zoo-PCR-Analysen für Exon 199-30 und 608-6176	
3.3.4. Bestimmung der Expressionsmuster.....	77
Tabelle 3.3.4.: Ergebnisse der RT-PCR für Exon 199-30 und 608-61.....	77
3.4. Charakterisierung der cDNA J1124 für Exon 199-30 .....	78
3.4.1. Isolierung.....	78
3.4.2. Genome-Priming System (GPS <sup>TM</sup> -1).....	78
3.4.3. Sequenzierung .....	78
3.4.3. Homologieanalyse .....	80
Tabelle 3.4.3.: Sequenzhomologien von J1124 Contig 1 und Contig 2. ....	82
3.5. Sondenherstellung für FISH.....	84
3.5.1. Region 22cen-q12 .....	84
Tabelle 3.5.1.: Liste von BAC-Rekombinanten und ihren entsprechenden Markern auf 22cen-q12.....	84
3.5.2. Region 22q12-qter .....	85
Tabelle 3.5.2.: Liste von BAC-Rekombinanten und ihren entsprechenden Markern auf 22q12-qter. ....	85
3.6. Klinische Fälle.....	86
3.6.1. Deriviertes Chromosom 22 .....	86
Abb. 3.6.1.1.: Ergebnisse der FISH-Experimente für Patientin A.L.....	87
3.6.2. Partielle Monosomie 22q13.....	87
Tabelle 3.6.2.: Liste der in FISH-Experimenten eingesetzten BACs und ihre An- (+) und Abwesenheit (-) auf den deletierten Chromosomen 22 der beiden Patienten.....	88
Abb.3.6.2.: Schematische Darstellung des Ausmaßes der Deletion 22q13 für beide Patienten.....	89

---

3.6.3. Translokation t(4/22).....	90
Abb. 3.6.3.1.: Schematische Darstellung der Vererbung der balancierten Translokation t(4;22)(q22;q12-13) von den Eltern an die Patientin.....	90
Abb. 3.6.3.3.: FISH mit BAC-Sonde 256C5 (D22S102).....	92
3.6.4. Partielle Trisomie 22q.....	93
Tabelle 3.6.4.: Liste der eingesetzten BAC-Sonden und der dazugehörigen Loci.....	93
Abb.3.6.4.: FISH mit 22q-spezifischen biotinylierten BAC-Sonden auf Metaphasechromosomen des Patienten. ....	94
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>96</b>
4.1. Neue exprimierte Sequenzen auf Chromsom 22.....	96
4.1.1. Exon-Kandidaten aus der Region 22q13.....	97
4.1.2. Exon-Kandidaten aus der pericentrischen Region.....	97
4.2. Diagnostischer Einsatz von Chromosom 22-spezifischen BACs-Sets.....	100
4.2.1. Deriviertes Chromosom 22 .....	101
Abb.4.2.1.: Modell zur Entstehung des derivierten Chromosoms 22 in Patientin A.L. .....	101
4.2.2. 22q13 Deletions-Patienten .....	102
4.2.3. Translokation t(4/22).....	102
4.2.4. Duplikation 22q13 .....	102
4.3. Ausblick .....	103
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>107</b>
Anhang .....	114
A. Geräte.....	114
B. Materialien.....	114
C. Puffer und Lösungen.....	116
D. häufig verwendete Internetseiten.....	117

## Abkürzungen und Worterklärungen

Abb.	Abbildung
ACOM	mitochondriale Aconitase
ALL	akute Lymphoblastenleukämie
AK	Antikörper
AMPPD	3-(2'-spiroadamantan)-4-methoxy-4-(3'-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetan
AP	Alkalische Phosphatase
ARSA	Genlocus für Arylsulfatase A
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BCIP	5'-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CES	Cateye Syndrom
CHLC	Cooperative Human Linkage Center
cM	Centimorgan
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalo-Virus
CTG	Cardiotokogramm
CYP2D6	Debrisoquin-4-hydroxylase (Cytochrom P450IID6)
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindol
dNTPs	Deoxynukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
d.h.	das heißt
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	expressed sequence-tag
et al.	und andere
ETOH	Ethanol
EWS	Ewing Sarkom
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoreszin-5-isothiocyanat
for.	forward
g	Gramm
GDB	Genome Database
Glc	Glukose
GTG	Giemsa-Trypsin-Giemsa (Chromosomenbänderung)
h	Stunde
HGP	Human Genome Project
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
HRBT	high resolution banding technique
HUGO	Human Genome Organization

kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar
Mb	Megabase(n)
MCS	multiple cloning site
MGCR	Meningioma Chromosomal Region
min.	Minute
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
NaAc	Natriumacetat
NAGA	Alpha-N-Acetylgalaktosaminidase
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF2	Neurofibromatose 2
o.g.	oben genannt
OT	Objektträger
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAC	P1-derived Artificial Chromosome
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Saline)
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
q	langer Arm eines Chromosoms
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate ( Natriumdodecylsulfat )
spec.	species
SSC	standard saline citrate ( Natriumchlorid-Citrat-Puffer)
STS	sequence-tagged site
TE	Tris-EDTA-Puffer
ter	Ende eines Chromosoms
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
tRNA	transfer-RNA
TU	Technische Universität
U	Unit ( Enzymaktivitätseinheit )
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
VNTR	variable number of tandem repeats
Vol	Volumen
v/v	volume/volume ( Volumen-Volumen-Verhältnis )
w/v	weight/volume ( Gewicht-Volumen-Verhältnis )
w.o.	wie oben
YAC	Yeast Artificial Chromosome
z.B.	zum Beispiel

ansonsten gelten die SI-Einheiten.

Die Vielzahl von Fachtermini, die überwiegend aus dem Englischen stammen, wurden dort wo es für das Verständnis förderlich war, übersetzt. Folgende Begriffe wurden jedoch übernommen, da eine Übersetzung nicht sinnvoll erschien. Die Schreibweise wurde der üblichen internationalen Form angeglichen, wie z.B. Centromer anstelle von Zentromer.

Contig	Sammlung durchgehend überlappender, klonierter DNA-Fragmente
Primer	Oligonukleotid zur Initiation der enzymatischen DNA-Synthese
Repeat	Wiederholungssequenz von Nukleotiden
Screening	Durchsuchen einer Rekombinantenbibliothek nach spezifischen Klonen

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Humane Genom Projekt

Im Jahre 1988 wurde das erste internationale wissenschaftliche Bio-Großprojekt ins Leben gerufen: das Humane Genom Projekt (HGP), um eine fundierte Grundlage für die Erforschung und das Verständnis des humanen Genoms zu erschaffen (National Research Council, 1988). In einem Zeitraum von 15 Jahren sollte das Endziel dieser Initiative die Aufschlüsselung der gesamten Sequenzfolge des menschlichen Genoms sein, welches die beachtliche Größe von  $3 \times 10^9$  Basenpaaren hat (Morton, 1991).

Um die Forschungsschwerpunkte und die Kooperation der beteiligten Arbeitsgruppen zu organisieren, wurde von drei US Behörden (National Institutes of Health NIH, National Center for Human Genome Research NCHGR, Department of Energy Office of Health and Environmental Research DOE) ein 5-Jahresplan aufgestellt (US Department of Health and Human Services, US Department of Energy, 1990).

Die anfänglichen Ziele des Projekts waren:

- a) die Anwendung neuer genetischer Marker (Mikrosatelliten) für eine bessere Auflösung genetischer Karten (Jeffreys *et al.*, 1985)
- b) die Definition von sequenzmarkierten Stellen (sequence-tagged sites, STS) als allgemein gültige physikalische Marker (Olson *et al.*, 1989)
- c) die Entwicklung geeigneter Vektorsysteme zur Klonierung großer DNA-Fragmente
- d) die Erforschung neuer experimenteller Strategien und computergestützter Auswertungsmethoden
- e) der Ausbau von Technologie und Automatisierung der DNA-Sequenzierung.

Da sich die anfänglichen Erfolge schneller als erwartet einstellten, wurde dieser Plan schon nach drei Jahren überarbeitet und die Ziele neu definiert (Collins and Galas, 1993). Hierbei wurden die Schwerpunkte vor allem auf die Erstellung hoch auflösender genetischer Kopplungskarten und physikalischer Karten auf Basis der STS-Marker gelegt. Aber auch die Etablierung neuer Datenverarbeitungstechnologien und Koordination des Informationstransfers zwischen den beteiligten Arbeitsgruppen spielte eine entscheidene Rolle. Darüber hinaus sollten ethische, juristische und soziale Aspekte des durchaus umstrittenen Projektes berücksichtigt und diskutiert werden.

Neben der Kartierung des menschlichen Genoms existieren aber auch andere Forschungsvorhaben, die vom Humanen Genom Projekt gefördert werden. Es handelt sich hierbei um Projekte, die sich zum einen mit der DNA-Sequenzierung von Modellorganismen zum anderen mit der Identifizierung und Charakterisierung der genetischen Variabilität in verschiedenen menschlichen Bevölkerungsgruppen befassen (Human Genome Diversity Project). Untersuchungen an Modellorganismen wie z.B. *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans* haben zunehmend an Bedeutung bei der Aufklärung der normalen Genregulation, genetisch bedingter Erkrankungen, sowie evolutionärer Entwicklungen gewonnen. Eingehende Studien an weniger komplexen und dadurch besser zugänglichen Organismen haben die Grundlage für die Erforschung der Genetik und Biologie des Menschen gebildet. So konnte z.B. die Sequenzierung des Genoms des Fadenwurms als experimentelle Ausgangsbasis für die Sequenzierung des menschlichen Genoms herangezogen werden. Aber auch Zusammenhänge von Genotyp und Phänotyp in weniger entwickelten Spezies erlaubten wertvolle Rückschlüsse auf die Situation im komplexeren *Homo sapiens*. Modellorganismen, die in diesem Zusammenhang untersucht werden, reichen von einzelligen Mikroorganismen (z.B. Bakterien und Hefen) über Invertebraten wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* bis hin zu Vertebraten (z.B. *Fugu rubripes rubripes*) und Säugertieren (z.B. *Mus spec.*, *Rattus norvegicus*) (Tabelle 1.1.1.).

Organismus	Genomgröße [bp]	Bedeutung/Vorteile
Escherichia coli Bakterium	$4,6 \times 10^6$	Struktur, Regulation, Funktion der Gene
Saccharomyces cerevisiae Sproßhefe	$1,5 \times 10^7$	Struktur, Regulation, Funktion der Gene; genetische Analysen
Arabidopsis thaliana Pflanze	$1,5 \times 10^7$	genetische Analysen; Nutzpflanzenforschung
Caenorhabditis elegans Rundwurm	$1,0 \times 10^8$	Entwicklungsbiologie; Sequenzierung
Drosophila melanogaster Fruchtfliege	$1,7 \times 10^8$	Struktur, Regulation, Funktion der Gene; Entwicklungsprozesse, Mutationsstudien
Fugu rubripes rubripes Kugelfisch	$4,0 \times 10^8$	Starke Konservierung d. codierenden Sequenzen; komprimiertes Genom; Identifikation v. Genen
Mus musculus Hausmaus	$3,0 \times 10^9$	Syntänie; Mutagenese- und Kreuzungsexperimente; Tiermodell f. menschl. Erkrankungen,

**Tabelle 1.1.1.:** Modellorganismen im Rahmen des HGP und ihre Bedeutung für die Genetik.

Um ein Projekt solchen Ausmaßes erfolgreich zu gestalten, waren eine detaillierte Organisation der Forschungsvorhaben, sowie ein stetiger Austausch über Erfahrungen und Ergebnisse unerlässlich. Kooperation und Kommunikation zwischen den beteiligten Arbeitsgruppen mußten gewährleistet sein. Aus diesem Grund wurde eine internationale Dachorganisation, die *Human Genome Organization* (HUGO) gegründet, deren multidisziplinäre Zentren in den U.S.A hauptsächlich in den DOE Human Genome Centers am Lawrence Berkeley Laboratory (LBL), am Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL) und am Los Alamos National Laboratory (LANL) zu finden sind. Entsprechend dem Vorbild in den U.S.A. hat man auch in Asien und Europa Programme zur Erforschung des menschlichen Genoms entwickelt. Das weltweite HGP wird mittlerweile von drei HUGO-Zentren aus verwaltet: HUGO America (Bethesda U.S.A.), HUGO Europa (London) und HUGO Pazifik (Tokyo).

Alle Daten, die im Verlauf des Projektes in den unterschiedlichen Forschungseinrichtungen erzeugt worden sind, werden in Datenbanken (z.B. Genome Database, GDB) gesammelt und mithilfe des Internets allen Wissenschaftlern zugänglich gemacht (aktueller Stand s. Tabelle 1.1.2).

	Ziele 1993-1998	Stand Okt.1998	Ziele bis 2003/ heutiger Stand
<b>Genetische Kartierung</b>	Durchschnittliche Auflösung 2-5 cM	Auflösung 1 cM; veröffentlicht Sept.1994	beendet
<b>DNA-Sequenzierung</b>	80 Mb von allen Organismen	180 Mb humane und 11 Mb nicht humane Sequenzen	1/3 der humanen Sequenz bis Ende 2001
<b>Gen-Identifizierung</b>	Entwicklung der Techniken	30.000 ESTs kartiert	Komplette cDNAs
<b>Modell-Organismen</b>	E. coli: gesamte Sequenz Hefe: gesamte Sequenz C. elegans: großer Teil der Sequenz Drosophila: Beginn d. Sequenzierung Maus: Karte mit 10.000 STSs	vollendet Sept. 1997  vollendet April 1996  80% d. Gesamtsequenz 9% d. Gesamtsequenz 12.000 STSs kartiert	-  -  100% Dec.1998  100% 2002

Tabelle 1.1.2: Stand des HGP (Collins et al., 1998)

## 1.2. Kartierung des menschlichen Genoms

### 1.2.1. Genetische Kartierung

Klassische genetische Karten von weniger komplexen Organismen (z.B Drosophila, Maus) beruhen auf Kreuzungsexperimenten mit unterschiedlichen Mutanten, mit deren Hilfe man ermitteln kann, ob zwei bestimmte Genloci gekoppelt vorliegen oder nicht. Da beim Menschen solche Methoden für die Erstellung einer genetischen Karte nicht anwendbar sind, werden polymorphe Marker verwendet. Diese müssen nicht notwendigerweise mit einem Gen oder einer Krankheit verbunden sein. Rekombinationsereignisse während der Meiose führen zu veränderten Genotypen und lassen Rückschlüsse über die Kopplung der betrachteten Marker zu. Aufgrund der Häufigkeitsverteilung dieser Allelkombinationen kann man Aussagen über den genetischen Abstand von bestimmten Loci treffen, die in der Einheit centi-Morgan cM angegeben werden.

Bis 1981 gab es allerdings nur sehr lückenhafte Kopplungskarten des Menschen aus Mangel an geeigneten Markern. Die Entdeckung von sogenannten RFLPs (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen) ermöglichte dann aber einen raschen Fortschritt in der genetischen Kartierung (Botstein *et al.*, 1980). Es standen erstmals Marker zur Verfügung, die sich über das gesamte Genom verteilen. Ein grundsätzliches Problem

dieser Methode liegt allerdings in ihrem begrenzten Informationsgehalt, da RFLPs nur zwei Allele aufweisen. Sind z.B. untersuchte Personen in einem bestimmten Marker homozygot, kann man keine Aussagen über eine Kopplung machen. Informative Allelkombinationen sind aber für eine Kopplungsanalyse unerlässlich. Die Einführung von multiallelen Marker-Systemen, wie Mini- und Mikrosatelliten brachte hier eine deutliche Verbesserung (Jeffreys *et al.*, 1985). Ihre Tandemwiederholungen variabler Anzahl ergaben eine große Menge an Allelen, was die Serie informativer Meiosen drastisch erhöhte. Vor allem die Mikrosatelliten, repetitive Di-, Tri- und Tetranukleotide, etablierten sich als wertvolle genetische Marker, da sie sich zusätzlich zu ihrem hohen Informationsgehalt hervorragend für Multiplex-PCRs eignen und außerdem leicht physikalisch zu kartieren sind (Tabelle 1.2.1.).

Markertyp	Anzahl der Loci	Merkmale
Blutgruppen 1910-1960	~ 20	Von Genotyp nicht immer auf den Phänotyp schließbar
Serumprotein 1960-1975	~ 30	Varianten aufgrund elektrophoretischer Variabilität; begrenzt polymorph
HLA-Gewebetypen	1 (Haplotyp)	1 gekoppelte Gruppe; hoher Informationsgehalt; aber nur für 6p21.3
DNA-RFLPs 1975- heute	$> 10^5$	zwei Allelmarker; leichte Kartierung
DNA-VNTRs (Minisatelliten) 1985- heute	$> 10^4$	viele Allele; hoher Informationsgehalt; aber vorwiegend an Chromosomenenden zu finden
DNA-VNTRs (Mikrosatelliten, repetitive Di-, Tri-, und Tetra-Nukleotide) 1989-heute	$> 10^4$	viele Allele; hoher Informationsgehalt; über das gesamte Genom verteilt

**Tabelle 1.2.1.:** Übersicht über die Verwendung genetischer Marker des Menschen

Eine ganze Reihe von genetischen Karten wurde bereits publiziert, welche aber aufgrund der Verwendung von unterschiedlichen Markersets nur schwer oder überhaupt nicht miteinander zu vergleichen waren (Donis-Keller *et al.*, 1987; NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, 1992; Weissenbach *et al.*, 1992). Deshalb entstand im Jahre 1994 in Kooperation mit über 100 Laboratorien eine weitreichende genetische Karte, für die ein einheitliches Set von Referenzfamilien verwendet wurde (CHLC, 1994).

### 1.2.2. Physikalische Kartierung

Zur Erstellung von physikalischen Karten sind eine Reihe unterschiedlicher Techniken entwickelt worden, von denen hier nur drei besonders hervorgehoben werden sollen.

Die ersten physikalischen Karten wurden ursprünglich auf zytogenetischer Ebene in Bezug zum Bänderungsmuster des jeweiligen Chromosoms erstellt. Die unterschiedlichen Bänderungstechniken (z. B. GTG, CBG, Reverse) erlaubten jedoch nur eine geringe Auflösung von ca. 5 Megabasenpaaren (Mb). Ein bedeutender Meilenstein in der zytogenetischen Kartierung wurde mit der Entwicklung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) gelegt (Landegent *et al.*, 1987; Pinkel *et al.*, 1986). Mithilfe dieser Methode war es erstmals möglich, zwei Sequenzen simultan zu lokalisieren und auch relativ zueinander anzuordnen (Lichter *et al.*, 1990; Nederlof *et al.*, 1990). Die maximale Auflösung hierbei liegt auf normalen Metaphasechromosomen bei ungefähr 1 Mb, wobei sie stark abhängig vom Kondensationsgrad des zytogenetischen Präparates ist. Prometaphasechromosomen liegen beispielsweise nicht so dicht verpackt vor, wie die Metaphasechromosomen und Interphasechromosomen erlaubten sogar eine Unterscheidung zweier Proben im Abstand von nur 50-100 Kilobasenpaaren (kb) (Trask *et al.*, 1989; van den Engh *et al.*, 1992). Die Weiterentwicklung dieser Technik in Form der Fiber-FISH (Heiskanen *et al.*, 1994; Heiskanen *et al.*, 1995) oder der released chromatin-FISH, die als Ziel-DNA aus dem Zellkern herausgelöstes Interphasechromatin einsetzt, konnte die Auflösung auf wenige Kilobasen erhöhen (Haaf and Ward, 1994; Heng *et al.*, 1992; Parra and Windle, 1993).

Eine weitere Technik zur physikalischen Kartierung entwickelte sich aus dem Umgang mit somatischen Zellhybriden. Das Radiation Hybrid (RH) Mapping setzt dabei Nager/Mensch Hybridzelllinien ein, die durch Bestrahlung mit hohen Dosen an Radioaktivität entstandene Bruchstücke menschlicher Chromosomen enthalten (Cox *et al.*, 1990; Lawrence *et al.*, 1994; Walter *et al.*, 1994). PCR-Analysen mit spezifischen Primern lassen nach statistischer Auswertung Rückschlüsse auf die Anordnung und Entfernung der Marker zu.

Eine ganz andere Methode, die dem eigentlichen Endziel des HGPs viel näher kommt, ist die sogenannte Contig-Kartierung. Die Konstruktion hoch auflösender physikalischer Karten für jedes einzelne der 24 Chromosomen stellt die Ausgangsbasis für die komplette Sequenzierung des menschlichen Genoms dar. Contigs sind durchgehend

überlappende, klonierte DNA-Fragmente, die in derselben Reihenfolge wie ursprünglich im Genom angeordnet sind. Voraussetzung für diese Form der Kartierung sind Bibliotheken geeigneter Rekombinanten, welche das gesamte menschliche Genom repräsentieren. Diese Bibliotheken können mithilfe geeigneter Sonden durchsucht werden, um Klone zu identifizieren, die auf diese Weise bestimmten Abschnitten eines Chromosoms zugeordnet werden. Klone derselben Region werden dann in Contigs zusammengefaßt und ermöglichen einen direkten Zugriff auf spezifische genomische Bereiche.

Die Entwicklung von Klonierungssystemen spielte dabei eine entscheidene Rolle. Man unterscheidet Vektorsysteme, deren Replikation in bakteriellen Wirtsorganismen erfolgt (Plasmide, Cosmide, BACs), von solchen, die in eukaryotischen Zellen vermehrt werden (YACs).

Die Vektoren weisen dabei erhebliche Unterschiede in Bezug auf ihre Klonierungskapazität, ihre Zuverlässigkeit der identischen Vermehrung und der Art der DNA-Propagierung auf (Tabelle 1.2.2.).

Vektor-Typ	Klonierungs-kapazität	Beispiel	verwendet seit
Plasmid	0,5-12 kb	pBR322, pUC	1977
M13	10-20 kb	M13mp18	1981
Lamda	10-20 kb	EMBL3, FIX	1983
Cosmid	30-45 kb	Lawrist	1981
Fosmid	30-45 kb	pFOS	1992
P1	30-90 kb	pAd10sacBII	1990
PAC	30-250 kb	pCYPAC-1	1993
BAC	30-300 kb	pBAC, pBeloBAC	1992
YAC	300 kb-1 Mb	pYAC	1987

**Tabelle 1.2.2.:** Klonierungssysteme

Um möglichst große zusammenhängende genomische Abschnitte zu kartieren, wurden Systeme entwickelt, die in der Lage sind, bis zu 1 Mb an Fremd-DNA aufzunehmen. Vor allem YAC- und BAC-Bibliotheken wurden zu diesem Zweck eingesetzt.

Physikalische Karten des menschlichen Genoms haben mittlerweile eine Dimension erreicht, die sich in einer einzelnen Karte nicht mehr darstellen läßt. Üblicherweise werden daher integrierte physikalische Karten für jedes einzelne menschliche Chromosom konstruiert und regelmäßig präzisiert.

### **1.2.3. Transkriptionskartierung und Identifizierung von Genen**

Der Anteil an exprimierten Sequenzen im menschlichen Genom macht nur etwa 3% der Gesamtsequenz aus. Doch sind es gerade diese 3%, auf denen das Hauptaugenmerk der Genomforschung liegt. Mithilfe der inzwischen existierenden präzisen physikalischen Karten ist es möglich, aus bereits lokalisierten Sequenzen Gene zu identifizieren.

Für codierende DNAs charakteristisch sind vor allem zwei Eigenschaften, die man sich bei der Identifizierung von Genen zunutze macht. Als erstes die Expression: für gewöhnlich werden alle aktiven Gene in mRNAs umgeschrieben und die primären Transkripte anschließend gespleißt. Ein zweites interessantes Merkmal, das Gene von nicht codierender DNA unterscheidet, ist die Konservierung der Sequenz. Da Gene für wichtige zelluläre Funktionen codieren, wirken sich Mutationen, die zu einer Fehlfunktion oder Änderung des Produkts führen, häufig nachteilig für den Organismus aus. Solche Mutationen gehen im Laufe der Evolution nach natürlicher Selektion oftmals verloren. Daher werden codierende und regulatorische DNA-Sequenzen stärker als nicht codierende Regionen konserviert.

Aus diesem Grund kann man z.B. in einem Zoo-Blot, einem Southern-Blot von genomischer DNA unterschiedlicher Spezies, genomische Klone auf das Vorhandensein von konservierten Sequenzen untersuchen. Positive Signale in mehreren Arten liefern so erste Hinweise auf ein Gen in dem hybridisierten Klon.

Kommt es durch Mutationen während der Evolution z.B. zu Stopcodons, die zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen, werden diese meist ausselektiert. Aus diesem Grund enthalten Gene häufig recht lange offene Leseraster, sogenannte open reading frames (ORFs). Stehen Sequenzen von genomischen Klonen zur Verfügung, können diese mithilfe von speziellen Computerprogrammen analysiert und nach ORFs durchsucht werden.

Es ist aber auch möglich, durch gezielte Isolierung und Amplifizierung von Exons, Gene in bereits lokalisierten Rekombinanten zu identifizieren. Eine effektive Methode stellt hierfür das Exon-Trapping-System dar, das mithilfe eines künstlichen RNA-

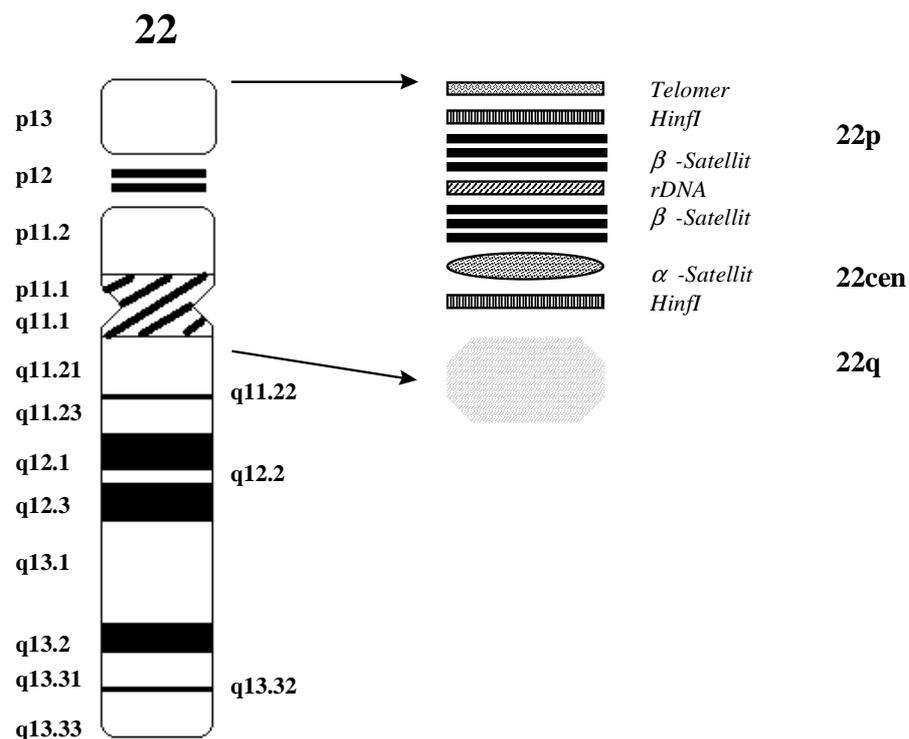
Spleiß-systems exprimierte Sequenzen aus genomischer Ausgangs-DNA selektieren kann (s. Kapitel 2.2. und 2.3.) (Buckler *et al.*, 1991). Genomische Fragmente werden in einen speziellen Spleißvektor kloniert und anschließend in einem eukaryotischen *in vitro* Zellsystem exprimiert und gespleißt. Enthalten diese Fragmente Exons mit funktionsfähigen Spleißerkennungsstellen, können diese als nächstes mit Vektor-spezifischen Primer amplifiziert und subkloniert werden. Am Ende dieser Prozedur steht die Sequenzierung der interessanten Kandidaten. In einer computergestützten Analyse werden die erhaltenen Sequenzen dann in zweierlei Hinsicht untersucht. Zum einem werden DNA-Datenbanken auf Homologien mit bereits bekannten Genen oder Genfragmenten gescreent, zum anderen können Vorhersagen über ein potentielles Protein gemacht werden. Sehen die Ergebnisse vielversprechend aus, werden mit solchen Klonen im Anschluß cDNA-Banken durchsucht, um die komplette Gensequenzen zu erhalten.

Bei anderen Verfahren geht man von Teilsequenzen zahlreicher, zufällig ausgewählter unbekannter cDNA-Klone aus, die man anschließend physikalischen Karten zuordnet. Es ist hierbei ausreichend, wenn von diesen Klonen nur eine kurze Sequenz (ca. 200 bp) bekannt ist, um spezifische Primer zu konstruieren. Auf diese Weise erhält man STS-Fragmente für eine codierende Sequenz, die dann als exprimierte sequenzmarkierte Stellen (expressed sequence tag, EST) bezeichnet werden. Diese EST-Marker können jetzt mithilfe unterschiedlicher physikalischer Kartierungsmethoden durch eine PCR-Analyse lokalisiert werden. Die Zuordnung zu einem Chromosom wird üblicherweise durch PCR an somatischen Nager/Mensch-Zellhybriden vorgenommen, die entweder ganze oder Bruchstücke menschlicher Chromosomen enthalten. Außerdem kann man ESTs auch direkt auf definierte genomische Klone lokalisieren, indem PCR-Reaktionen an lokalisierten Contigs vorgenommen werden. 1998 wurde eine physikalische Karte publiziert, in der mehr als 30.000 auf Genen basierende Marker angeordnet und in eine bestehende genetische Karte integriert wurden (Deloukas *et al.*, 1998).

Das Endziel ist hier natürlich auch die Aufschlüsselung der Sequenz neu kartierter oder gefundener cDNAs. Diese Daten erlauben schließlich Homologieanalysen in umfangreichen Datenbanken und auch Vorhersagen über die möglichen Produkte dieses Gens. Aber erst die Sequenzen von genomischen Klonen, die diese cDNAs repräsentieren, ermöglichen eine genaue Aufklärung der Struktur des Gens und möglicher Funktionen.

### 1.3. Chromosom 22

Das humane Chromosom 22 gehört zur Familie der akrozentrischen Autosomen (13,14,15,21,22) und umfaßt als zweitkleinstes Chromosom mit seiner physikalischen Länge von etwa 40-52 Mb ca. 1,6 -1,8 % des gesamten menschlichen Genoms (Kaplan *et al.*, 1987). Der kurze Arm (22p) enthält eine Reihe von repetitiven Motiven, sowie die Gene, die für die Struktur-RNAs kodieren (Abb.1.3.). Für die klinische und genetische Forschung von Interesse ist vor allem der lange Arm (22q), da hier die Protein-kodierenden Sequenzen lokalisiert sind. Grob läßt sich der lange Arm in drei große Banden unterteilen: 22q11, 22q12 und 22q13, die sich noch in weitere Unterbanden differenzieren lassen. Diese Einteilung wurde nach der klassischen Bänderungstechnik auf zytogenetischer Ebene vorgenommen (Abb.1.3.). Auf diesem Chromosom werden rein rechnerisch ca. 1000-2000 Gene erwartet.



**Abb. 1.3.:** Ideogramm von Chromosom 22 gemäß ISCN. Der Ausschnitt zeigt die Anordnung der verschiedenen repetitiven Sequenzen und der rRNA-Gene im Centromer und p-Arm.

### 1.3.1. Kartierung von Chromosom 22

Mit der Kartierung und Identifizierung von Genen auf Chromosom 22 beschäftigt man sich schon seit fast 25 Jahren. Zwei Aspekte machten das Chromosom 22 zu einem lohnenswerten Forschungsobjekt. Zum einen handelt es um das zweitkleinste menschliche Autosom; eine Tatsache, die die Erstellung von genetischen und physikalischen Karten erleichtert. Zum anderen gibt es in eine Reihe von kongenitalen und neoplastischen Erkrankungen, in die Abberationen dieses Chromosoms involviert sind. Schon im Jahre 1978 wurden die ersten vier Gene auf dem q-Arm von Chromosom 22 beschrieben. Mithilfe von Translokations- und somatischen Hybridpaneln wurden die Gene für mitochondriale Aconitase (*ACONm*), Diaphorase 1 (*DIA1*), Arylsulfatase A (*ARSA*) und N-Azetylgalaktosaminidase (*NAGA*) auf 22 lokalisiert (Bruns *et al.*, 1978; Fisher *et al.*, 1977; Junien *et al.*, 1978). (de Groot *et al.*, 1978; Meera-Khan *et al.*, 1978; Slaughter *et al.*, 1978).

Einhergehend mit der Entwicklung neuer Kartierungstechniken und der Entdeckung neuer Marker konnten genetische Kopplungskarten und physikalische Karten erstellt werden, die sich Jahr für Jahr rasant erweiterten. 1987 waren insgesamt 25 Loci von Genen oder single copy Sequenzen bekannt (Kaplan *et al.*, 1987). Rouleau *et al.* konnten 1989 16 neue RFLPs mit bereits bekannten Markern sowie einigen Krankheitsloci auf 22q koppeln (Rouleau *et al.*, 1989). Im Bericht über den Chromosom 22-Workshops von 1990 wurden dann schon über 70 neue anonyme DNA-Marker und einige neue Gene beschrieben (Emanuel and Seizinger, 1990). Drei Jahre später hatte sich diese Anzahl schon verdreifacht (Emanuel *et al.*, 1993). Im Rahmen dieses dritten Workshops für Chromosom 22 wurde von H. McDermid eine 11 Mb umspannende Restriktionskarte, die vom IGL-Locus (22q11) bis zum Ewing-Sarkom-Bruchpunkt (22q12) reichte, vorgestellt. Der Neurofibromatose 2 (NF2)-Lokus wurde eingegrenzt und zwischen die anonymen Marker D22S212 und D22S31 in der Region 22q12 kartiert.

In späteren Karten erhöhte sich mit der Weiterentwicklung von Klonierungssystemen und molekulargenetischen Techniken die Anzahl zugeordneter Marker exponentiell. Einen großen Anteil der eingesetzten Marker sind die sogenannten STS-Marker ("sequence-tagged site", STS). Ist von einem bestimmten DNA-Klon eine kurze DNA-Sequenz bekannt (ca. 100 bp), lassen sich daraus spezifische Primer entwickeln, die in PCR-Reaktionen das Vorhandensein dieser Sequenz spezifisch nachweisen können. Solche DNA-Abschnitte werden jetzt als sequenzmarkiert (STS) bezeichnet und dienen

nach ihrer Zuordnung zu bestimmten chromosomalen Bereichen als Ankerpunkte bei der Anordnung von Rekombinanten zu Contigs. Auf dieser Basis wurden die Karten immer dichter und präziser (Bell *et al.*, 1995; Buetow *et al.*, 1993; Buetow *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1995; Gyapay *et al.*, 1994). Die Markerdichte in den Regionen 22q11 und q12 war dabei wesentlich höher als in 22q13. Schmitt *et al.* veröffentlichten dann im Jahre 1996 eine integrierte physikalische Karte der distalen Region von Chromosom 22 auf Basis von BAC-Rekombinanten. Parallel wurden hoch auflösende YAC-Karten entwickelt (Collins *et al.*, 1995), deren nachfolgende Versionen im Internet regelmäßig veröffentlicht wurden (ACEDB, 22ace). Kim *et al.* konstruierten eine BAC-Karte für den gesamten q-Arm von 22, der sich auf die YAC-Karte stützte (Kim *et al.*, 1996). Hieraus läßt sich erkennen, daß eine intensive Kooperation und auch ein Materialaustausch zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen immer wichtiger, aber auch üblicher wurde. Im Rahmen des Chromosom 22 Projekts als Teil des HGPs arbeiteten die unterschiedlichen Arbeitsgruppen zusammen und erstellten Karten, die nahezu lückenlos das ganze Chromosom abdeckten. Mit STS-Markern und YAC-Sonden aus der Chromosom 22-Karte vom Sanger Center wurden z.B. 22-spezifische Cosmid-Bibliotheken (LL22NCO1 und LL22NCO3) vom Lawrence Livermore National Laboratory in Kalifornien, die Chromosom 22-Fosmid-Bibliothek von Kim *et al.* (1995) und die PAC-Bibliothek von Pieter de Jong gescreent, um zum einen die Markerdichte zu erhöhen und zum anderen Lücken zu schließen. End- und Vectorette-Sequenzierungen sollten dabei helfen. Auf diese Weise erhaltene neue Klone wurden in Contigs zusammengefaßt und in bestehende Karten integriert. Fiber-FISH-Experimente wurden zusätzlich herangezogen, um die Größe der Lücken in der Sequenz abzuschätzen. So ergab sich durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Bibliotheken und den Einsatz von diversen Methoden ein immer umfangreicheres und hoch auflösendes Werk (Sanger Center webpage).

Ausgehend von diesen Karten wurde parallel dazu vor einigen Jahren die Sequenzierung von Chromosom 22 begonnen. Drei große Arbeitsgruppen mit umfassender Sequenziermaschinerie teilten sich dieses aufwendige Projekt. Am Sanger-Center in Cambridge konzentrierten sich die Sequenzierungsaktivitäten auf die Bereiche 22q11.2-22qter. 22cen-q11.2 wurde von der Keio University Medical School of Science bearbeitet. Die University of Oklahoma, Department of Chemistry beschränkte sich auf den chromosomalen Abschnitt 22q12, war aber federführend in der Optimierung effizienter Sequenzierungstechniken.

### 1.3.2. Sequenzierung von Chromosom 22

Mit der Einführung integrierter physikalischer Karten (Collins *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1996) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap)) standen umfangreiche Ressourcen präzise lokalisierter Rekombinanten zur Verfügung, um die Sequenzierung von Chromosom 22 voranzutreiben. Im Bericht der Tagung zum Chromosom 22 Projekt von 1998 wurde der Stand der Kartierung und Sequenzierung vorgestellt und Strategien der einzelnen Zentren erläutert.

Vor kurzem wurde dann endlich das langersehnte Ziel erreicht und der lange Arm von Chromosom 22 fast komplett durchsequenziert (Dunham *et al.*, 1999). Insgesamt wurden 33,4 Millionen Basenpaare identifiziert, die durch 11 Lücken definierter Größe (<150 kb) von einander getrennt sind. Die Sequenz deckt 97% des q-Arms ab und ist aufgrund technischer und methodischer Grenzen als komplett zu bezeichnen. Das längste zusammenhängende Stück besteht aus >23 Mio bp und stellt auch die größte zusammenhängende Sequenz dar, die bis heute aufgeschlüsselt wurde. Die Sequenzierung des q-Arms hat bisher mindestens 545 Gene und 134 Pseudogene identifiziert; weitere 500-600 Gene werden erwartet, nachdem die Sequenz durch "Genefinder"-Programme analysiert sein wird.

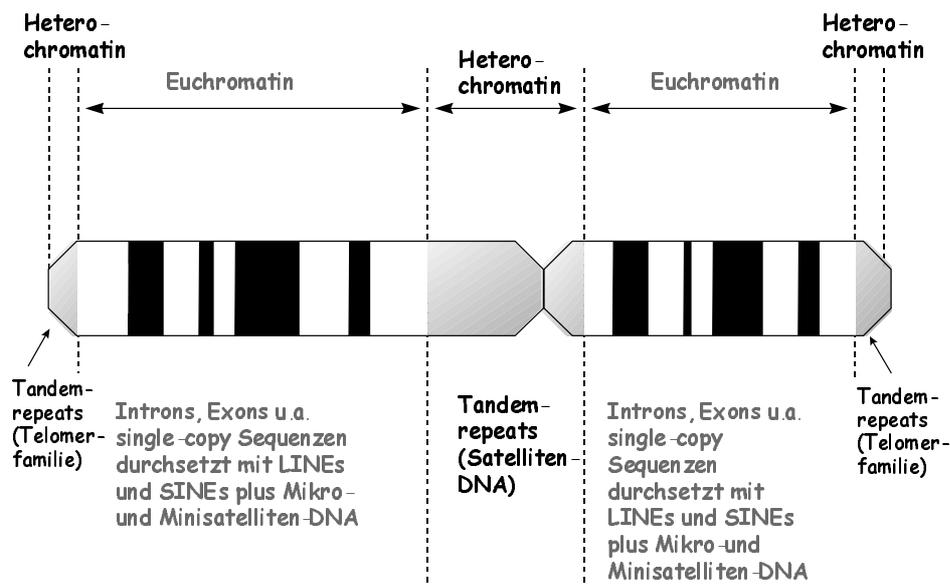
Zwei unterschiedliche Wege wurden beschritten, um die Sequenz des langen Arms von Chromosom 22 zu entschlüsseln. Zum einen wurden Sets aus zusammenhängenden Klonen, die definierte chromosomale Bereiche repräsentierten, nach und nach sequenziert und die Daten zusammengesetzt. Als Alternative hierzu wurde parallel das sogenannte Shotgun-Sequenzieren, herangezogen, bei dem nicht lokalisierte genomische Klone sequenziert und mit Hilfe von speziellen Computerprogrammen den entsprechenden chromosomalen Abschnitten zugeordnet wurden.

Wie oben erwähnt, gibt es immer noch Lücken in der Sequenz, die durch schwer zugängliche Regionen im Genom verursacht werden. Problematische Bereiche solcher Art stellen hierbei vor allem repetitive Sequenzen da. Sie sind schwer zu sequenzieren und durch die Tatsache, daß sie im gesamten Genom anwesend sind, nicht leicht bestimmten Chromosomen zuzuordnen. Dadurch kommt es häufig zu falschen Anordnungen in Karten, die sich auch auf Sequenzebene widerspiegeln. Vor allem die

Übergangsregionen zwischen Heterochromatin und Euchromatin, wie sie an den Centromeren und Telomeren von menschlichen Chromosomen vorkommen, sind aus diesem Grund noch unzureichend charakterisiert.

### 1.3.3. Hetero-und Euchromatin

Das Genom läßt sich auf die unterschiedlichste Art und Weise in diverse Abschnitte unterteilen. Eine Möglichkeit ist die Definition von Hetero- und Euchromatin. Unter Heterochromatin versteht man den Bereich des Genoms, der während des gesamten Zellzyklus hochkondensiert bleibt und in dem nur wenige oder gar keine Gene exprimiert werden. Das Euchromatin dagegen ist der Anteil des Kerngenoms, der transkriptionell aktive DNA enthält und der im Gegensatz zum Heterochromatin in relativ entspiralisierter Form vorliegt. Es enthält die Gene mit ihren Introns und Exons, sowie andere "single-copy" Sequenzen, die von verstreut liegenden Repeats, wie SINES und LINES, aber auch Mini- und Mikrosatelliten durchsetzt sind (Abb.1.3.3.).



**Abb.1.3.3.:** Schematische Darstellung eines Chromosoms, die die Verteilung des Hetero- und Euchromatins und deren Aufbau erklärt.

Das Heterochromatin bildet die Telomere und das Centromer eines jeden Chromosoms. An den Telomeren sind Mikrosatelliten in Form des spezifischen Repeats (TTAGGG) zu finden, die die sogenannte Schutzkappe der Chromosomen bilden. Sie verhindern

den Abbau und Verlust von Chromosomenenden durch einen eigenen Replikationsmechanismus. Die Funktion des Centromers ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch man spricht ihm eine entscheidene Rolle beim Aufbau des Spindelapparates und der Paarung der Chromosomen während des Mitosevorgangs zu. Centromere bestehen hauptsächlich aus  $\alpha$ -Satelliten, bei denen es sich um eine sehr variable Familie mit Unterklassen, die für einzelne Gruppen von Chromosomen spezifisch sind, handelt (Waye and Willard, 1989; Willard, 1985).

Im Falle von Chromosom 22 wurde eine alphanucleotidische DNA-Sequenz beschrieben, die spezifisch für Chromosom 22 und Chromosom 14 ist (McDermid *et al.*, 1986a). Aber auch andere spezifische repetitive Motive sind auf 22 identifiziert worden (Metzdorf *et al.*, 1988; Mullenbach *et al.*, 1996).

Es wird vermutet, daß die Grenze zwischen repetitiver nicht transkriptionell aktiver DNA und dem Euchromatin nicht scharf gezogen ist, sondern vermuten vielmehr, daß die Repeats nach und nach auslaufen und schon von Transkriptionseinheiten durchsetzt sind. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit centromernahere Rekombinanten, die sowohl single-copy Sequenzen als auch repetitive Motive enthalten, isoliert werden, um sinnvolles Ausgangsmaterial für die Suche nach exprimierten Sequenzen im pericentrischen Bereich von Chromosom 22 zur Verfügung zu haben. Daß im Bereich 22cen-q11 die für das Cateye Syndrom (CES) kritische Region angesiedelt wird (McDermid *et al.*, 1986b), welche nachweislich auch das Centromer betrifft, machte die Aufgabe auch in klinischer Hinsicht relevant.

#### **1.3.4. Klinische Bedeutung des Chromosoms 22**

Aufgrund der Tatsache, daß viele erworbene und kongenitale Krankheiten oder Syndrome mit Aberrationen des Chromosoms 22 assoziiert sind, ist Chromosom 22 seit Jahren Thema vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Man ist dabei hauptsächlich auf der Suche nach Genen, die für das Auftreten neoplastischer Veränderungen, aber auch für die Ausbildung von kongenitalen Syndromen verantwortlich sind. Dabei wurde festgestellt, daß eine Reihe von Aberrationen des Chromosoms 22 oft mit bestimmten phänotypischen Ausprägungen einhergeht. Bis heute sind etwa 30 Erkrankungen bekannt, die mit Rearrangements auf Chromosom 22 einhergehen. Für den überwiegenden Teil sind auch bereits Krankheitsgene identifiziert worden ("list of disease genes", s. Literatur).

Das bekannteste Beispiel ist das Philadelphia-Chromosom (Nowell and Hungerford, 1960), das aus einer reziproken Translokation  $t(9;22)$  hervorgeht und mit der akuten Lymphoblasten- (ALL) und der chronisch myeloischen Leukämie (CML) (Rowley, 1973) assoziiert ist. Weitere Translokationen, bei denen Chromosom 22 involviert ist, sind der reziproke Stückaustausch zwischen Chromosom 8 und 22 bei Burkitt Lymphomen (Berger *et al.*, 1979) und die nicht-Robertsonsche Translokation  $t(11;22)$  bei Ewing Sarkomen (Delattre *et al.*, 1992) oder Neuroepitheliomen (Aurias *et al.*, 1984; Turc *et al.*, 1984). Diese Translokation verbindet das *EWS*-Gen auf 22q12 mit dem *FLII*-Gen auf 11q24, wobei ein Fusionsgen entsteht, das zu einem oncogenen, chimären Transkriptionsfaktor auf dem derivierten Chromosom 22 führt (Bailly *et al.*, 1994; Delattre *et al.*, 1992). Neueste molekulare Studien lieferten mittlerweile detaillierte Analysen der Bruchpunktregion (Obata *et al.*, 1999). Auch bei Dermatofibrosarkomen Protuberans wurde ein Fusionsgen beschrieben, das nach einer Translokation zwischen den Chromosomen 17 und 22 entsteht. Dabei wird das *COL1A1*-Gen auf Chromosom 17 mit dem *PDGFB*-Gen auf Chromosom 22 (Simon *et al.*, 1997). Deletionen oder Verluste des gesamten Chromosoms 22, die zu neoplastischen Veränderungen führen, sind mit Meningeomen (Dumanski *et al.*, 1987; Dumanski *et al.*, 1990; Zang, 1982), rhabdoiden Tumoren (Biegel *et al.*, 1990; Biegel *et al.*, 1992; Biegel *et al.*, 1996) und außerdem mit der Neurofibromatose Typ 2 (NF2) assoziiert (Rouleau *et al.*, 1993; Trofatter *et al.*, 1993).

Außer neoplastischen Veränderungen sind auch Syndrome beschrieben worden, die mit Aberrationen des Chromosoms 22 in Verbindung gebracht werden. Das sogenannte Cateye-Syndrom ist durch okulare Kolobome, anale und cardiale Defekte sowie mentale Retardierung charakterisiert und geht mit einer Tri- oder Tetraploidie des Bereiches 22q11 meist in Form eines überzähligen derivierten Chromosoms einher (McDermid *et al.*, 1986b). Die kleinste duplizierte Region (CES *critical region*, CESC) auf dem Extra-Chromosom umspannt die Regionen 22pter-q11.2. Die genauen Bruchpunkte konnten allerdings noch nicht bestimmt werden. Als Kandidatenregion wurde auf 22q11.2 die Immunglobulin (IGL)-Region vorgeschlagen (Hough *et al.*, 1995). Der Bereich wurde in den letzten Jahren immer weiter eingegrenzt und H. McDermid und ihre Arbeitsgruppe konnten einen Contig für die kritische Region in der Größe von 150 kb erstellen (McDermid *et al.*, 1999).

Ein weiteres Syndrom, welches seit langem Objekt zahlreicher Forschungen ist, wurde als DiGeorge-Syndrom beschrieben (de la Chapelle *et al.*, 1981). Es handelt sich hierbei um ein Fehlbildungssyndrom mit Aplasie von Thymus und Nebenschilddrüsen in Verbindung mit einem auffälligen Gesichtsausdruck, sowie dem Auftreten von Herzfehlern. Auf cytogenetischer Ebene findet man eine Deletion oder Mikrodeletion im Bereich 22q11, von der man annimmt, daß sie die Ursache für die Entwicklungsstörung des o.g. Phänotyp darstellt (Driscoll *et al.*, 1992a; Driscoll *et al.*, 1992b). Auch der komplexeren Form dieser Entwicklungsstörung, dem sogenannten CATCH 22 (Cardiac defect, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia, chromosome 22q11 deletions) liegt eine Deletion in der Bande 22q11 zugrunde (Wilson *et al.*, 1993). Bei DiGeorge-Patienten, die eine Mikrodeletion aufweisen, konnte die kleinste deletierte Region (MDGCR) auf 250 kb in die Nähe des Markers D22S75 eingegrenzt werden. Eine umfangreiche Karte dieser Region wurde erstellt, und darin gefundene Transkripte sollen einen Beitrag zur Aufklärung des genetischen Hintergrundes dieses Syndroms beitragen (Gong *et al.*, 1996; Lindsay *et al.*, 1996).

Zu Verlusten von Chromosomenstücken kann es desweiteren auch unter Ringbildung kommen. Die Ringformation entsteht durch Bruch des Chromosoms 22 auf beiden Armen, wenn daraufhin die abgebrochen Enden unter Verlust der terminalen Sequenzen wieder miteinander fusionieren (Phelan *et al.*, 1992). Das Fehlen des kurzen Armes scheint hierbei keine gravierenden Auswirkungen auf den Phänotyp eines Kindes zu haben, da der p-Arm von Chromosom 22, wie bei allen akrozentrischen Chromosomen, nur einige Gene für ribosomale RNA und sonst hauptsächlich repetitive Sequenzen enthält. Man geht vielmehr davon aus, daß der Verlust terminaler Sequenzen des q-Armes, d.h. 22q13, für die Ausprägung eines pathologischen Phänotypes verantwortlich ist. Dabei spielt höchstwahrscheinlich die Größe der deletierten Segmente eine wichtige Rolle. Denn die phänotypische Manifestation zeigte sich bisher sehr variabel. Ein einheitliches dysmorphisches Merkmalsmuster konnte bei Ringchromosomen 22 nicht gefunden werden (Schinzel, 1984). Auch in Neurofibromatose 2 (NF2) Patienten wurden Ringchromosomen r(22) beschrieben. Tommerup *et al.* stellten 1992 einen NF2-Patienten mit einem Ringchromosom 22 vor, dessen genauere Untersuchung eine Deletion des Gens für Arylsulfatase (ARSA) ergab, das bisher als distalster Marker in der Region 22q13.3 kartiert wurde (Dumanski *et al.*, 1991). Ein weiteres Ringchromosom in einem NF2-Patienten wurde ebenfalls auf Deletionen in diesem

Bereich hin analysiert (Schmitt *et al.*, 1994) doch hier ergab sich, daß die *ARSA*-Region nicht deletiert war. Ein Fehlen von Sequenzen unterhalb des *ARSA*-Locus auf dem q-Arm konnte allerdings mangels weiterer genetischer Marker nicht ausgeschlossen werden.

Neben den Ringchromosomen wurden auch Fälle mit interstitiellen oder terminalen Deletionen der Region 22q13 beschrieben, die nicht mit Ringbildung einhergehen. Watt *et al.* (1985) war der erste, der eine partielle Monosomie in 22q vorgestellt hat. Eine ausführliche zytogenetische Analyse ergab den Karyotyp  $\text{rec}(22), \text{dup } p, \text{inv}(22)(p11q12), \text{del } (22)(q13)$ , der aus Rekombinationsereignissen während der Meiose zwischen einem normalen und einem invertierten Chromosom 22 ( $\text{inv}(22)(p11q12)$ ) der Mutter resultierte. Nachfolgend wurden 4 weitere Fälle publiziert, in denen bei allen Patienten Deletionen im Bereich 22q13 festgestellt werden konnten (Herman *et al.*, 1988; Kirshenbaum *et al.*, 1988; Narahara *et al.*, 1992; Romain *et al.*, 1990). Auch diese Untersuchungen erfolgten ausschließlich zytogenetisch oder biochemisch. Phelan *et al.* publizierten 1992 zum ersten Mal die molekulare Analyse einer solchen Deletion und präzisierten auf diese Weise die Lage des Bruchpunktes. Nesslinger *et al.* (1994) haben 2 Jahre später eine Sammlung von 7 Fällen mit Deletionen im Bereich 22q13 dargestellt. Dabei wurden die Krankheitsbilder der einzelnen Patienten miteinander verglichen und nur vereinzelt Übereinstimmungen im Phänotyp beobachtet. Mithilfe einer molekulargenetischen Analyse konnte eine kritische Region für die Ausdehnung der Deletion ermittelt werden. Zwei weitere Patienten mit Deletionen im Bereich 22q13 wurden von Doheny *et al.* (1997) beschrieben (Doheny *et al.*, 1997). In unserer Arbeitsgruppe wurden später 3 Fälle mit terminalen Deletionen des Bereichs 22q13 bearbeitet (Schröder *et al.*, 1998) und mit den Patienten der bereits publizierten Studien verglichen. Die Diversität der einzelnen Krankheitsmerkmale macht es sehr schwer, einen eindeutigen Phänotyp zu bestimmen. Trotzdem faßt man Deletionen dieser Art unter dem 22q13-Deletionssyndrom zusammen.

### 1.3.5. Fallbeispiele

#### 1.3.5.1. Deriviertes Chromosom 22

##### *Patientin A.L.*

Die klinischen Befunde dieser Patientin wurden mir freundlicherweise von Prof. J. Limon, Institut f. Genetik und Biologie, Medizinische Akademie, Danzig, Polen zusammengestellt.

Das Mädchen wurde am 05.08.1998 als fünftes Kind gesunder, nicht miteinander verwandter Eltern geboren. Die Mutter war zu diesem Zeitpunkt 39, der Vater 38 Jahre alt. Die drei Brüder der Patientin (17, 10 und 4 Jahre alt) und die 14 Jahre alte Schwester sind nachweislich gesund. In der Familie mütterlicherseits wurden einige Tumoren festgestellt. Die Großmutter der Patientin wurde aufgrund eines diagnostizierten Meningeoms operiert, ihre Tante und deren 14-jähriger Sohn hatten beide ein Pheochromozytom. Die Familie des Vaters wies keine genetischen Erkrankungen auf.

Das Mädchen kam aufgrund falscher Lage mit einem Kaiserschnitt in der 39. Schwangerschaftswoche zur Welt. Das Gewicht betrug 2200g, die Länge 52 cm und der Kopfumfang 32 cm. Der Apgar score wurde mit 7/9/1 angegeben. Außerdem zeigte sie eine Neugeborenen-Hyperbilirubinämie, sowie einige Anomalien.

Im Alter von 5 Wochen betrug das Gewicht des Kindes 2600g (3. Perzentile), die Länge 55 cm (25. Perzentile) und der Kopfumfang 33 cm (3. Perzentile). Nach klinischer Untersuchung wurden folgende Gesichtsauffälligkeiten festgestellt: ein rundes Gesicht mit breiter Stirn, Hypertelorismus, spärliche Wimpern und Augenbrauen, Hakennase, langes Philtrum, kleiner Mund, hypoplastischer Kiefer, tief sitzende Ohren. Darüberhinaus hat das Mädchen lange Finger und Zehen, sowie eine Klinodaktylie der Daumen und einen lang gestreckten Rücken.

Auffällige Herzgeräusche deuten auf einen Herzfehler hin. Die Genitalien sind normal ausgepägt. Ultraschalluntersuchungen des Gehirns und Abdomens ergaben ebenfalls normale Befunde. Blutbild und Urinanalyse zeigen keine Auffälligkeiten.

Im Alter von 4-5 Monaten wies das Kind eine gemäßigte psychomotorische Retardierung mit vor allem schlechter Kontrolle über die Kopfbewegungen und milder Hypotonie auf.

Der zytogenetische Befund weist auf ein deriviertes Chromosom 22 hin.

Dieser Fall sollte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von präzise kartierten Markersonden molekulargenetisch analysiert werden.

### **1.3.5.2. partielle Monosomie 22q13**

#### ***Patientin C.B.***

Eine ausführliche Beschreibung der Patientin wurde bereits veröffentlicht (Schröder *et al.*, 1998). Aus diesem Grund möchte ich an dieser Stelle nur eine kurze Zusammenfassung der auffälligsten Befunde geben.

Bei der Patientin handelt es sich um das dritte Kind gesunder, nicht verwandter Eltern (Mutter 29, Vater 32 Jahre alt). Das Mädchen wurde in der 40. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 4500g (>97. Perzentile), einer Länge von 56 cm (>97. Perzentile) und einem Kopfumfang von 36,5 cm (>97. Perzentile) geboren. Der Apgar score betrug 8/9/10. Das übermäßige Wachstum wurde auch bei folgenden Untersuchungen im Alter von 4 und 8 Monaten, sowie 3 Jahren und 8 Monaten weiterhin beobachtet.

Zu den Dysmorphiezeichen des Kindes gehören unter anderem ein grobes Gesicht mit einem breiten Nasenrücken und hohem Gaumen, sowie lange Finger und Zehen. Darüberhinaus wurden Muskelhypotonie und organische Fehlbildungen, wie Schwerhörigkeit, Hypoplasie des frontalen Hirnlappens und eine rechte polyzystische Niere beschrieben. Die Entwicklung des Kindes ist verzögert und es kann weder laufen noch sprechen.

Die zytogenetische Analyse ergab eine *de novo* Deletion 22q13.2-qter.

#### ***Patient P.P.***

Der Fall dieses Patienten wurde in derselben Studie veröffentlicht und wird hier nur kurz zusammengefaßt (Schröder *et al.*, 1998).

Der Junge wurde 1994 als erstes Kind gesunder und nicht verwandter Eltern (Mutter 30, Vater 31 Jahre alt) in der 39. Schwangerschaftswoche geboren. Aufgrund eines pathologischen CTGs wurde ein Kaiserschnitt durchgeführt. Das Geburtsgewicht betrug 2500 g (10. Perzentile), die Länge 48 cm (25. Perzentile). Ein persistierender Duktus arteriosus wurde am 15. Lebenstag geschlossen und ein kleiner Ventrikelseptumdefekt hat sich

selbst verschlossen. Schwerhörigkeit und Strabismus, sowie Muskelhypotonie wurden ebenfalls diagnostiziert. Die Entwicklung des Jungen ist verzögert, was sich vor allem in seiner Sprachfähigkeit äußert. Ansonsten weist der Junge keine offensichtlichen Dysmorphien auf. Eine Chromosomenanalyse ergab ein auffällig verkürztes Chromosom 22.

Diese beiden Fälle wurden mir zur molekulargenetischen Untersuchung zugestellt, um das Ausmaß der Deletion zu bestimmen.

### **1.3.5.3. Translokation t(4/22)**

#### ***Patientin 97C101***

Über diesen Patient lagen mir leider keine ausführlichen klinischen Befunde vor, so daß ich hier nur eine kurze Zusammenfassung der Auffälligkeiten gebe, die ich freundlicherweise von Frau Dr. F. Pedeutour, Laboratoire de Génétique, l'Hôpital de l'Archet, Nizza, Frankreich erhalten habe.

Das Mädchen wurde im Jahre 1997 als Kind gesunder, miteinander verwandter Eltern (Cousin und Cousine) geboren. Bei der Geburt hatte das Kind schwere Anfälle, die als benigne Neugeborenen-Epilepsie diagnostiziert wurden. Antiepileptische Therapien schlugen anfangs nicht an, aber mittlerweile ist die Erkrankung unter Kontrolle. Zytogenetische Untersuchungen der Eltern ergaben sowohl bei der Mutter als auch bei dem Vater die gleiche Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 22, t(4;22)(q22;q12-13.1). Von beiden wurden jeweils die Translokationschromosomen an die Tochter vererbt. Es wurde vermutet, daß der Bruchpunkt der Translokation auf einem der beiden Chromosomen einen rezessiven Genloкус für diese Art der Epilepsie betreffen könnte. Mit diesen Überlegungen wurden uns Metaphasepräparate aus Lymphozyten der Patientin und ihrer Eltern geschickt, um die Situation auf Chromosom 22 genauer zu untersuchen.

### **1.3.5.4. Partielle Trisomie 22q13**

#### ***Patient K.M.***

Die nachfolgenden klinischen und zytogenetischen Befunde wurden am Institut für Medizinische Genetik, Medizinische Akademie, Poznan, Polen durchgeführt und mir freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Der Junge wurde im Februar 1987 als 1. Kind gesunder, nicht miteinander verwandter Eltern geboren. Die Mutter war zu dem Zeitpunkt 28, der Vater 36 Jahre alt. In der Familie sind ansonsten keine genetischen Erkrankungen, geistige Behinderungen, angeborene Malformationen oder Fehlgeburten bekannt. Während der Schwangerschaft wurde verzögertes intrauterines Wachstum des Föten festgestellt. Das Kind wurde dann aufgrund einer akuten Hypoxie mit einem Kaiserschnitt in der 36. Woche auf die Welt geholt. Das Geburtsgewicht betrug 1580g, der Apgar score 4.

Während des ersten Besuchs des Patienten in der genetischen Beratung im Alter von 3 Monaten wurden neben einige Dysmorphien, ein Leistenbruch und ausgeprägte Hypotonie diagnostiziert.

### *Dysmorphien und organische Fehlbildungen*

Im Alter von 10 Jahren war der Junge nur 20 kg schwer und fiel durch eine generelle Muskelatrophie und ausgeprägte Spontanbewegungen auf. Sein Unterhautgewebe ist sehr schwach entwickelt. Die klinische Untersuchung ergab weiterhin Mikrozephalie mit einer hohen, prominenten Stirn und folgende Gesichtsdysmorphien: kurze Lidspalten, Telekanthus, eine kurze Nase mit hypoplastischen Nasenflügeln und einem ausgeprägten Nasenrücken, kurzes Philtrum, bogenförmiger Mund mit dünner Oberlippe, sowie kleine, tief sitzende Ohrmuscheln mit preaurikulären Anhängseln auf der linken Seite (Abb.1.3.5.4.).

Der Junge hat Klumpfüße mit Ulnardeviation und Kontrakturen der Ellbogen- und Kniegelenke. Außerdem wurde eine Gaumenspalte festgestellt. Die Haut des Kindes ist sehr dünn und marmoriert und von Ekzemen befallen. Darüberhinaus hat es irreguläre, kariöse Zähne und leidet an Sialorrhoe.

Weitere Untersuchungen ergaben einen linksseitigen Leistenbruch, genitale Hypoplasie mit Kryptorchismus und Hypospadie, sowie einen angeborenen Herzfehler.



**Abb.1.3.5.4.:** Patient K.M. im Alter von 10 Jahren.

### *Verhaltensauffälligkeiten*

Das Kind weist eine schwerwiegende mentale Retardierung auf und leidet von Geburt an an Schlaflosigkeit. Es hält keinen geregelten Tages- und Nachtrhythmus ein. Darüberhinaus treten während der wenigen Schlafstunden regelmäßig Apnoen (Atempausen) auf. Im Alter von 2-4 Jahren zeigte der Junge eine auffällige Autoaggression und Neigung zur Selbstverstümmelung. Das hat sich in letzter Zeit gebessert und kommt nur noch während Aufregungen vor. Auffällig ist weiterhin eine ausgeprägte Hyperaktivität des Jungen. Daneben treten Eßstörungen zusammen mit permanenter Verstopfung und gelegentlichen Blutungen im Verdauungstrakt auf.

### *Weitere Auffälligkeiten*

Das Wachstum des Kindes ist extrem verzögert. Ab dem ersten Lebensjahr kam es immer wieder zu Anfällen, die sich im Alter von drei Jahren noch verschlimmerten. Eine antikonvulsive Therapie wurde angewendet. Außerdem ist der Junge besonders anfällig für Atemwegserkrankungen.

### *Zytogenetischer Befund*

Die zytogenetische Analyse von Lymphozyten-Chromosomen wurde nach Standardbänderungstechniken (HRBT, GTG) durchgeführt. Dabei ergaben die Untersuchungen der Eltern normale Karyotypen. Beim Kind wurde durchgehend eine Duplikation des distalen Bereichs des q-Arms von Chromosom 22 gefunden und als folgender Karyotyp beschrieben: 46,XY,dup(22)(q13.1-13.3). Mithilfe unserer umfangreichen Rekombinantensammlung von Chromosom 22 sollte diese Duplikation in der vorliegenden Arbeit auf molekularer Ebene untersucht werden.

## **1.4. Ziele der Arbeit**

Im Rahmen des Humanen Genom Projektes werden täglich neue Sequenzen entschlüsselt und neue Gene identifiziert. Am ergiebigsten sind dabei die euchromatischen Regionen der Chromosomen. In Richtung des Heterochromatins wird die Analyse jedoch aufgrund repetitiver Sequenzen komplizierter und deshalb sind diese Bereiche bisher noch nicht ausreichend charakterisiert. Auch Chromosom 22, dessen langer Arm erst kürzlich durchsequenziert wurde, weist gerade in diesen Regionen Lücken auf. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit ein Contig des Übergangsbereiches 22cen-22q11 erstellt werden, um zur Aufklärung seiner Struktur beizutragen. Interessant ist auch die Frage, ob in dieser Region Gene vorhanden sind. Da es in pericentrischen Regionen immer wieder zu Instabilitäten und chromosomalen Rearrangements, wie z.B. Translokationen kommt, könnten Gene in diesen Abschnitten eine wichtige klinische Bedeutung besitzen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es daher, nach transkribierten

Sequenzen in dem Contig zu suchen. Dazu sollte die Methode des Exon Trappings für BAC-Rekombinanten etabliert und für daraus resultierende Kandidatenklone komplette cDNAs isoliert und sequenziert werden.

Die Assoziation von Chromosom 22 mit vielen neoplastischen und kongenitalen Erkrankungen, erhöht den Bedarf an geeigneten Markern, die eine molekulare Aufklärung klinischer Fälle erlauben. Deshalb sollten im dritten Teil der vorliegenden Arbeit Sets von geeigneten BAC-Rekombinanten aus unterschiedlichen klinisch relevanten Regionen auf Chromosom 22 zusammengestellt und auf ihre Anwendbarkeit in FISH-Experimenten überprüft werden. Mithilfe dieser präzise lokalisierten Sonden sollten verschiedene klinische Fälle auf molekularer Ebene analysiert werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. DNA-Isolierung**

#### **2.1.1. BAC-Isolierung**

Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) werden im *E. coli*-Stamm DH10B vermehrt und können deshalb wie Plasmide nach dem Standardprotokoll für alkalische Lyse (modifiziert nach Birnboim & Doley, 1979) isoliert werden. Bakterienstocks der BACs wurden auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) selektiv angezüchtet und einzelne Kolonien als Übernachtskultur nochmals in Flüssig-LB-Medium (400 ml-Kulturen) angereichert. Die Isolierung und Aufreinigung der DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll mit Hilfe eines Säulensystems der Firma QIAGEN. Nach alkalischer Lyse der Bakterien wurden die Zelltrümmer entfernt und die extrachromosomale DNA aus dem Überstand an eine Säulenmatrix gebunden. Nach der Elution wurde die gereinigte DNA mit Isopropanol gefällt und in einem adäquaten Volumen TE-Puffer resuspendiert. Die einzelnen Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **2.1.2. Plasmid-Isolierung**

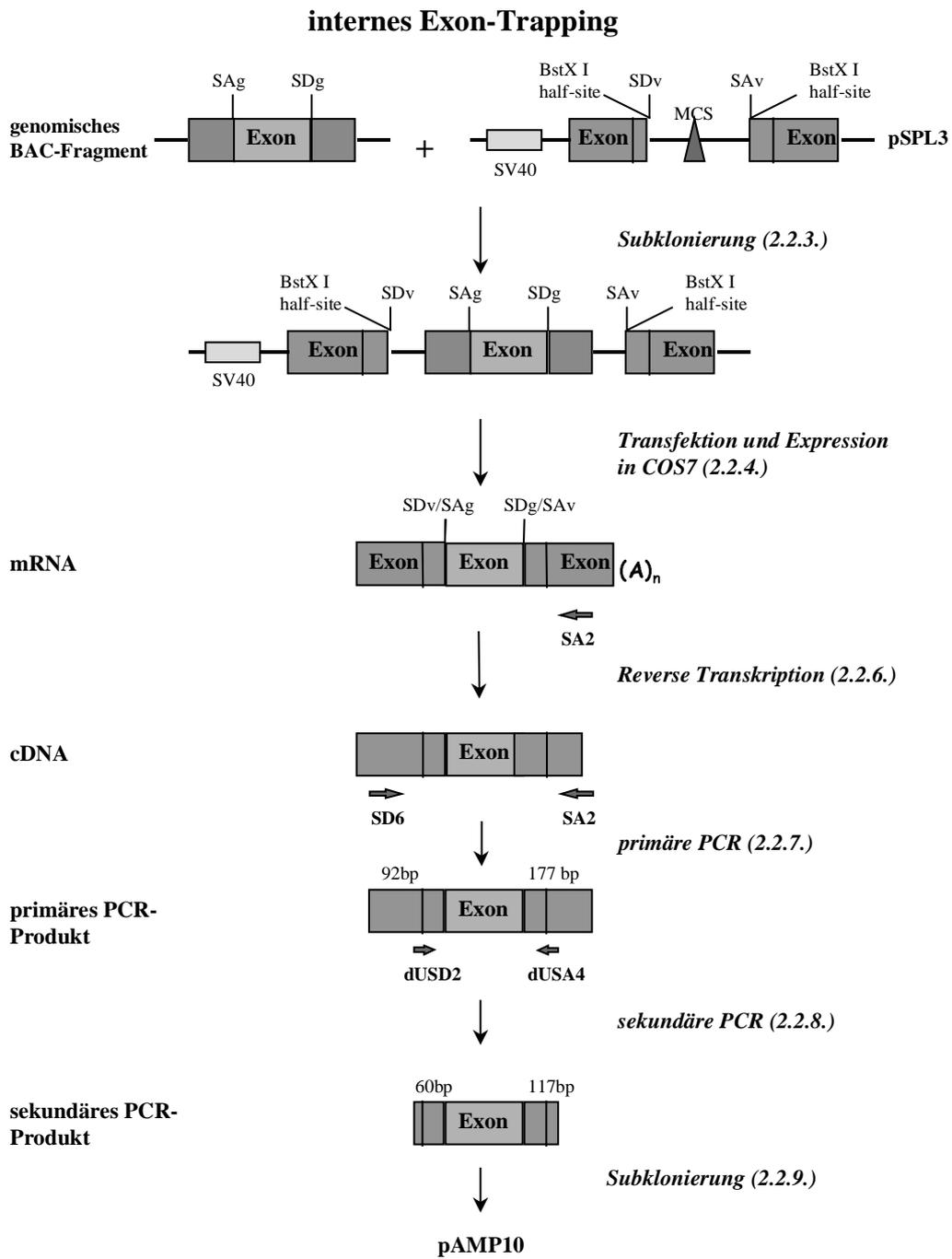
Plasmid-DNA jeglicher Art wurden mit dem JetStar MidiPrep Kit (Genomed) isoliert. Hierbei wurde genau nach der beiliegenden Arbeitsvorschrift vorgegangen.

### **2.2. Exon-Trapping-System zur Isolierung interner Exons**

Mithilfe des natürlichen Spleiß-Apparates eukaryotischer Zellen ist es möglich, transkribierte Sequenzen aus genomischer DNA, die dafür in speziell konstruierte Vektoren kloniert wird, zu isolieren. Diese Methode wurde 1991 von Buckler et al. entwickelt und im Laufe der Jahre weiter verbessert (Church et al., 1994). Das System ist mittlerweile kommerziell erhältlich und wird von der Firma GibcoBRL Life Technologies vertrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde mit diesen Komponenten gearbeitet und das Protokoll für den Einsatz von BAC-Rekombinanten genomischer DNA optimiert. Das System wurde für eine Reihe von 22-spezifischen und einige auf anderen Chromosomen lokalisierte telomer nahe BACs verwendet.

Bei dieser Technik wurde zunächst genomische DNA in den sogenannten Exon-Trapping-Vektor pSPL3 subkloniert, dessen Klonierungsstelle von einer funktionsfähi-

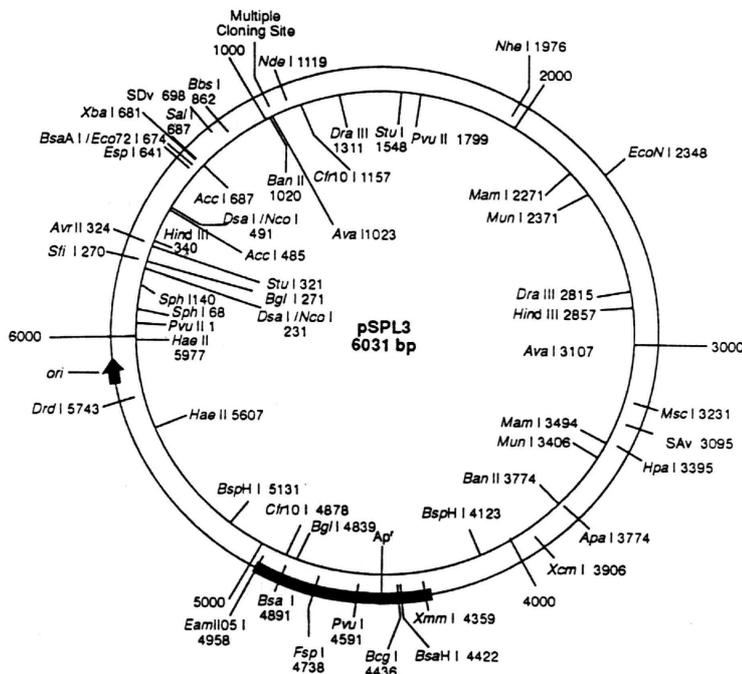
gen Splice-Donor und einer Splice-Akzeptorstelle flankiert wird. Diese pSPL3-Rekombinanten werden in *E.coli* Bakterien propagiert, isoliert und in die Affennierenzelllinie COS7 transfiziert. In den Säugerzellen werden die Rekombinanten dem natürlichen Spleißprozeß der Zelle unterzogen. Enthalten die Inserts vollständige Exonsequenzen in der richtigen Orientierung, werden die Spleiß-Donor- und Akzeptorstellen entsprechend miteinander verbunden. Es entstehen Fusionsprodukte (RNAs) aus Vektorsequenzen und Exons der eingesetzten Ziel-DNA. Nach 1-2-tägiger Kultivierung der Säugerzellen wird RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben (Erststrangsynthese). Um die rekombinante RNA bzw. cDNA von der zelleigenen RNA bzw. cDNA zu trennen, wird eine PCR mit Vektor spezifischen Primern durchgeführt. Ein Amplifikationsprodukt wird allerdings nur dann gebildet, wenn Spleißsignalsequenzen des Vektors mit Spleißsignalsequenzen der genomischen DNA korrekt verknüpft wurden. Natürlich entstehen bei diesem Prozeß auch Vektor-Vektor-Spleißprodukte. Diese werden jedoch mit dem Restriktionsenzym BstXI nach der primären PCR gespalten und können so bei einer anschließenden PCR mit "nested" Vektor-Primern nicht mehr weiter amplifiziert werden. Bei dieser 2.PCR werden dUMP-Reste an die cDNA angefügt, die eine direkte ligasefreie Subklonierung der Fragmente in den Vektor pAmp10 erlauben (UDG-Klonierung). Die entstehenden *E.coli* Kolonien der transformierten pAmp10-Rekombinanten werden in der sogenannten Kolonie-PCR direkt für eine Amplifikationsreaktion mit dem sekundärem Primerpaar eingesetzt, um die korrekte Produktgröße zu testen. Dabei werden flankierende Vektorsequenzen in einer Größe von 177 bp mitamplifiziert, d.h. Klone, die Exons enthalten, müssen größer als diese Vektor-Vektor-Produkte sein. Positive Klone können jetzt näher charakterisiert und sequenziert werden.



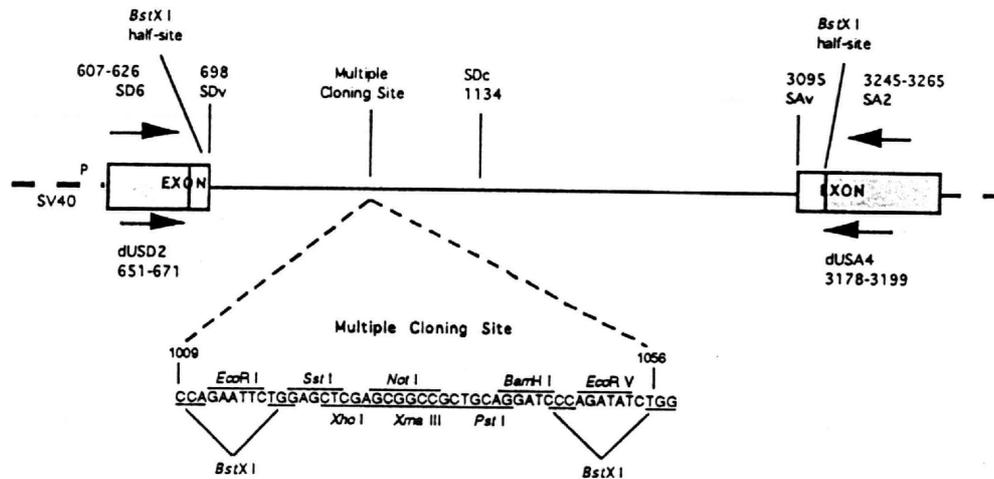
**Abb.2.2.1:** schematische Übersicht des internen Exon-Trapping-Systems. MCS: mutiple cloning site; SDv: vektorielle Spleißdonorstelle; SAv: vektorielle Spleißakzeptorstelle; SDg: genomische Spleißdonorstelle; SAg: genomische Spleißakzeptorstelle; SA2, SD6, dUSA4 und dUSD2 sind die Bezeichnungen der verwendeten Primer.

### 2.2.1. pSPL3 Vektor

Der Spleißvektor pSPL3 (6031 bp) enthält sowohl ein Gen für Ampicillinresistenz und ein Replicon zur Selektion und Vermehrung in prokaryotischen E.coli- Zellen, als auch einen SV40-Origin und -Promotor für die effektive Replikation und Transkription in eukaryotischen COS7 Zellen. Das besondere dieses Vektors stellt das HIV-tat1-Genfragment dar, welches die Exonfalle ausmacht. Das Kernstück bilden ein Intron, welches die multiple Klonierungsschnittstelle (multiple cloning site, MCS) enthält, und 2 flankierende Exonfragmente, die die funktionellen Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen liefern. Der Rest des Gens ist durch das Hasen- $\beta$ -Globin Gen ersetzt. Die HIV-tat1-Spleißstellen sind mit jeder anderen Spleißerkennungssequenz kompatibel und ermöglichen so das korrekte Spleißen der klonierten Sequenzen. Der SV40-Origin garantiert eine hohe Kopienzahl des Vektorkonstrukts in den Säugerzellen, während der SV40-Promotor entsprechend die Transkriptionsfrequenz der Rekombinanten steigert. BstX I Erkennungsstellen in der MCS erlauben die spätere Eliminierung von Vektor-Vektor-Spleißprodukten (Abb. 2.2.1.a, b).



**Abb. 2.2.1.a:** Karte des Exon-Trapping Vektors SPL3. Restriktionsenzyme, die nur einmal im Vektor schneiden, sind im äußeren Kreis dargestellt. Enzyme, die mindestens zweimal schneiden, sind im inneren Kreis abgebildet. Apr: Ampizillinresistenz; ori: origin of replication; SAV: virale Spleißakzeptorstelle; virale SDv: Spleißdonorstelle



**Abb. 2.2.1.b:** schematische Darstellung der Intron-, Exon-Elemente und der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pSPL3. SV40: Simian Virus Promotor; SDv: vektorielle Spleißdonorstelle; SAv: vektorielle Spleißakzeptorstelle; SDc: kryptische Spleißdonorstelle; SD6 und SA2: Primer für die primäre PCR; dUSD2 und dUSA4: Primer für die sekundäre PCR; Primer sind durch Pfeile angedeutet, Sequenzdaten stehen darunter.

## 2.2.2. Exon-Kontroll-Plasmid

Um den Erfolg des Exon-Trapping -Systems überprüfen zu können, wird parallel zur eingesetzten Ziel-DNA ein Kontrollplasmid der gesamten Prozedur unterworfen. Es handelt sich um ein 3,6 kb großes Fragment subklonierter genomischer DNA des humanen Gens tau (microtubule-associated protein) in pSPL3, das ein 66 bp großes Exon erhält. Das sekundäre PCR-Produkt zeigt nach gelelektrophoretischer Auftrennung eine Größe von 247 bp (177 bp Vektor + 66 bp Exon).

## 2.2.3. Subklonierung der BAC-Fragmente in den Vektor pSPL3

### 2.2.3.1. Präparation von pSPL3- und BAC-DNA für die Subklonierung

#### *Restriktion der BAC-DNA*

Für die Subklonierung der BAC-DNA wurden jeweils 2,5µg der einzelnen Klone mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, Phenol-Chloroform behandelt und anschließend gefällt. Die zwischen 100 und 150 kb großen Rekombinanten wurden hierbei in unter

schiedlich große Fragmente mit sogenannten "sticky ends", d.h. 5'-überstehende Enden, zerlegt. Diese zeigen sich für Ligationen besonders geeignet, da sie ein problemloses Dephosphorylieren linearisierter Vektoren ermöglichen und für die T4-DNA-Ligase eine relativ große Verknüpfungsstelle bieten (Winnacker, 1984).

#### Restriktionsansatz:

2,5 µg BAC-DNA  
 5 µl 10x Restriktionspuffer  
 1 µl EcoRI bzw. HindIII (10 U/µl)  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Ansatz ü.N. bei 37°C inkubieren und das Enzym anschließend 10 min bei 80°C inaktivieren.

Zur Reinigung des Restriktionsverdaus 1 Volumen Phenol-Chloroform-Lösung (1:2) zugeben, sorgfältig mischen und 5 min bei RT zentrifugieren.

Die obere wässrige Phase in ein frisches Eppendorfgefäß überführen.

DNA mit 1/10 Vol NaAcetat (3 M) und 2,5 Vol EtOH absolut fällen.

Pellet in 10µl TE-Puffer aufnehmen (DNA-Konzentration ca.250ng/µl).

#### ***Linearisierung und Dephosphorylierung des Vektors pSPL3***

2,5 µg der Vektor-DNA wurde ebenfalls mit dem Restriktionsenzym EcoRI behandelt und dadurch an der Klonierungsstelle geöffnet. Um eine Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern, wurde das Plasmid nach der Linearisierung mithilfe der alkalischen Phosphatase (CIP, calf intestine alkaline phosphatase) dephosphoryliert, d.h. die endständige 5'-Phosphatgruppe abgespalten.

#### Linearisierung des Vektors:

2,5 µg Vektor-DNA (pSPL3)  
 5 µl 10x Restriktionspuffer  
 1 µl EcoRI (10 U/µl)  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Ansatz ü.N. bei 37°C inkubieren, das Enzym danach 10 min bei 80°C inaktivieren und DNA wie oben fällen.

### Dephosphorylierung des Vektors:

15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
2  $\mu$ l 10x CIP-Puffer  
3  $\mu$ l CIP (1U/ $\mu$ l)

Vektorpellet in H<sub>2</sub>O lösen, resuspendieren, Puffer und Enzym zugeben.  
1 h bei 37°C inkubieren.  
1/10 Vol 200 mM EDTA zugeben und CIP für 10 min bei 65°C inaktivieren.  
DNA wie oben PCI reinigen und fällen.  
Pellet in 10  $\mu$ l TE-Puffer aufnehmen (DNA-Konzentration ca. 250 ng/ $\mu$ l).

### **2.2.3.2. Ligation**

Dephosphorylierte DNA des Vektors (pSPL3) und die genomischen EcoRI- Fragmente wurden im Verhältnis 1:3 zusammengemischt. Dabei können sich die überlappenden komplementären Enden finden und eine Basenpaarung eingehen. Die Ligase schließt dann die Lücke im Phosphatrückrad der DNA, indem sie freie 3'OH-Enden mit 5'-Phosphatenden verknüpft. Die Reaktion wurde mit dem Rapid Ligation Kit der Firma Boehringer durchgeführt. Als Kontrollreaktion wurde eine Ligation ohne genomische DNA nur mit Vektor-DNA durchgeführt.

### Ligationsansatz:

1 $\mu$ l Vektor-DNA (/dephosphoryliert, 250 ng/ $\mu$ l)  
3 $\mu$ l BAC-DNA (EcoRI, 250 ng/ $\mu$ l)  
in SpeedVac eindampfen und in 5 $\mu$ l 1x DNA-Verdünnungspuffer aufnehmen.

5 $\mu$ l 2x Ligasepuffer  
0,5 $\mu$ l T4-Ligase (5 U/ $\mu$ l)  
zugeben, 15-20 min bei RT inkubieren und dann bei 4°C aufbewahren.

### **2.2.3.3. Transformation**

Bei der Transformation wurden die rekombinanten pSPL3-Konstrukte mit kompetenten E.coli Zellen, Max efficiency DH5 $\alpha$  Competent Cells (GibcoBRL), auf Eis inkubiert. Dabei lagern sich die DNA-Moleküle an die Bakterienzellwand an und werden in die Zelle aufgenommen. Der anschließende Hitzeschock aktiviert das Reparatursystem der Bakterien, die jetzt ihre Zellwand wieder in Stand setzen können. In einem reichhaltigen

Medium wurden die transformierten Zellen dann vermehrt und ein Teil zur Kontrolle der Transformationseffizienz auf Selektivagarplatten ausgestrichen. Der Rest des Transformationsansatzes wurde in größerem Volumen Ampicillin-haltigem LB-Medium angezüchtet und zur DNA-Isolierung verwendet. Als Kontrolle wurde das Plasmid puc19 unter gleichen Bedingungen transformiert.

SOC-Medium (100ml):

1,0 ml 2M Glucose (steril filtriert)

1,0 ml 2m Mg<sup>2+</sup>-Lösung (steril filtriert), 1M MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O und 1M MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

0,25 ml 1M KCl-Lösung

ad 100ml LB-Medium

auklavieren und immer frisch ansetzen

1. Zellen auf Eis auftauen lassen.
2. je 100µl Zellen in eisgekühlte 12ml Gefäße pipettieren
3. Ligationsansatz 1:5 verdünnen und davon je 2µl zu den kompetenten Zellen pipettieren.
4. Vorsichtig mischen und 30 min auf Eis inkubieren.
5. Hitzeschock für 45 sec bei 42°C und dann 2 min auf Eis.
6. 0,9 ml SOC-Medium zugeben und 1 h bei 225 rpm und 37°C schütteln.
7. je 10µl und 100µl pro Ansatz auf LB-Amp-Platten (100 µg Amp/ml) ausstreichen.
8. restliche Lösung in 20ml LB-Amp-Medium anzüchten und ü.N. bei 37°C auf dem Schüttler inkubieren.
9. DNA-Isolierung mit dem Quiagen Miniprep-Kit (Durchführung laut Herstellerprotokoll).
10. Photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts.
11. Kontrolle der Subklonierung durch EcoRI-Verdau der isolierten DNA (1µg) und anschließender gelelektrophoretischer Analyse.

**2.2.4. Transfektion durch Elektroporation (Neumann et al., 1987; Zimmermann, 1982)**

Durch das Anlegen von kurzen, starken elektrischen Impulsen an Zellen bilden sich nm-große Poren in der Zellmembran. Fremd-DNA wird durch diese Poren aufgenommen und kann dann dort vermehrt und transkribiert werden. Die Bedingungen zur Durchführung der Elektroporation sind stark variabel und müssen für einzelne Zelllinien bzw. Versuchsansätze erprobt werden.

Bei den hier eingesetzten COS7-Zellen handelt es sich um Affenierenzellen (African-green monkey kidney cells), die mit einem Derivat des SV40-Virus (Simian Virus 40), bei dem ein Defekt im Origin vorliegt, transformiert worden sind. Für das Experiment

wurden die Zellen in 10% FKS-haltigem (fötales Kälberserum) D-MEM-Medium bei 37°C in einem 5%CO<sub>2</sub>-Brutschrank kultiviert. Zwei 75cm<sup>3</sup> Kulturflaschen (zu 75-80% bewachsen) waren ausreichend für 3 Transfektionsexperimente. Als Kontrollen wurden das Exon-Kontrollplasmid, sowie unverdauter pSPL3-Vektor in den Transfektionsexperimenten eingesetzt, um die später aus diesen Transfektanten isolierte RNA als Kontrollen in den anschließenden PCR-Reaktionen zu verwenden. Für die Elektroporation wurden pro Ansatz 3-5µg DNA und 1-3 x 10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

1. Elektroporationsküvetten (BioRad) auf Eis vorkühlen.
2. 10µl (3-5µg) Plasmid-DNA-Mischung des subklonierten BACs und 90µl PBS in die Küvetten füllen.
3. 6-Well-Makroplatten (Greiner; Well-Durchmesser: 3,5 cm) mit jeweils 5ml supplementiertem D-MEM-Medium füllen und im 37°C/5% CO<sub>2</sub>- Brutschrank vorwärmen.
4. Zellen abernten.
  - Medium abgießen
  - 5ml frische Trypsin/EDTA-Lösung (0,25% Trypsin, 1 mM EDTA) in jede Flasche geben und 2-5 min bei RT inkubieren.
  - Zellen durch heftiges Bewegen der Kulturflasche ablösen und 5 ml D-MEM Medium zugeben.
  - Zellen in 50 ml Falconubes sammeln und 8 min bei 1200 rpm zentrifugieren.
  - Medium abgießen und Zellen in 10 ml kaltem PBS resuspendieren und in einem Falcontube sammeln.
  - nochmals wie oben zentrifugieren und dann PBS abgießen.
  - Zellen pro Transfektion in 0,7 ml PBS resuspendieren
5. Je 0,7 ml Zellsuspension zur DNA in den vorgekühlten Küvetten pipettieren und 10 min auf Eis inkubieren.
6. Zellen nochmals kurz aufmischen und Küvette in die Küvettenhalterung des Elektroporators (Gene Pulser Transfection Apparatus Version 2-89; BioRad) stellen.
7. Puls mit folgenden Einstellungen geben: Spannung: 1,2 kV; Kapazität: 25µf; Zeitkonstante: 0,6.
8. Zellsuspension 10 min auf Eis halten.
9. Dann in 5ml vorinkubiertes D-MEM Medium in den 6-Well-Makroplatten pipettieren und mindestens 24h im Brutschrank inkubieren.

### **2.2.5. Isolation von Gesamt-RNA**

Die RNA-Isolation wurde nach dem Protokoll des TRIzol-Reagenz der Firma Gibco BRL durchgeführt. TRIzol ist eine monophasische Lösung für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen auf der Basis von Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Zellaufschluß und Homogenisierung werden in einer Lösung unter Bewahrung der Integrität der RNA bewerkstelligt. Die Trennung der Lösung in eine wässrige und eine

organische Phase wird durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation erreicht. Die gelöste RNA verbleibt in der wässrigen Phase und kann mit Isopropanol gefällt werden. Das System hat den Vorteil, daß es einfach und schnell zu handhaben ist und deshalb eine parallele Isolierung einer größeren Anzahl von Proben erlaubt. Die Ausbeute an RNA von Zellkulturen liegt bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  bei etwa 8-10 µg RNA. Die Arbeiten wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt, wie sie in der Methodensammlung von Sambrook et al.(1989) beschrieben sind. Die gewonnene RNA wurde in 10µl DEPC-H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendiert und die Konzentration photometrisch (Pharmacia GeneQuant) bestimmt.

### 2.2.6. cDNA-Synthese

Die RNA wurde in einer Reversen Transkriptions-Reaktion in die stabilere Form der cDNA umgeschrieben. Dafür wurde die SuperScript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (GibcoBRL) verwendet, die neben ihrer eigentlichen Funktion zusätzlich RNase H-Aktivität unterdrückt, was den RNA-Abbau während der Erststrangsynthese erheblich minimiert und so die Ausbeute an kompletten cDNA Sequenzen deutlich erhöht. Außerdem wird diese Transkriptase in ihrer Aktivität nicht durch tRNA und rRNA behindert, was eine cDNA Synthese aus Gesamt-RNA-Isolat ermöglicht. Als Primer für die Erststrangsynthese diente das Oligonukleotid SA2, das an eine komplementäre Sequenz in der Nähe der vektorialen Spleißakzeptorstelle SA<sub>v</sub> bindet.

Primer SA2: 5' ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC 3'

#### Reaktionsansatz

1 µl Oligonuklotid SA2 (20µM)  
3 µg RNA  
ad 12 µl DEPC-H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Ansatz 5 min bei 70°C denaturieren und 1 min auf Eis abkühlen.

+ 4 µl 5x Erststrangpuffer  
+ 2 µl 0,1 M DTT  
+ 1 µl 10 mM dNTP-Mischung

sorgfältig mischen und 2 min bei 42°C inkubieren

+ 1µl SuperScript II Reverse Transkriptase

Ansatz 30 min bei 42°C inkubieren.

+ 1µl RNase H

Zum Abbau des RNA-Stranges 10 min bei 55°C inkubieren und auf Eis stellen, Aufbewahrung bei -20°C.

### 2.2.7. Primäre PCR

Um die gewünschten rekombinanten cDNAs von der zelleigenen cDNA der Affenzellen zu trennen, wurden Primer gewählt, die flankierend zu der Spleißakzeptor- (SAv) und der Spleißdonorstelle (SDv) des Vektors liegen. So wurde in einer kurzen PCR (6Zyklen) nur die rekombinanten Spleißprodukte amplifiziert.

#### Primer

SA2: 5' ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC 3'

SD6: 5' TCTGAGTCACCTGGACAACC 3'

#### PCR-Ansatz

8,0 µl cDNA  
 4,0 µl 10 x PCR-Puffer (Pharmacia)  
 0,4 µl 20 mM dNTP-Gemisch  
 2,0 µl 20 µM Primer SA2  
 2,0 µl 20 µM Primer SD6  
 ad 37,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

5 min bei 94°C im PCR-Block denaturieren und bei 80°C halten.

+ 2,5 µl 1 x PCR-Puffer mit 2,5 U Taq-Polymerase (Pharmacia)

schnell einpipettieren, um eine Verdunstung des Ansatzes zu vermeiden ("hot start").

#### PCR-Bedingungen

6 Zyklen	1 min	94°C	Denaturierung
	1 min	60°C	Annealing
	5 min	72°C	Extension
1 Zyklus	10 min	72°C	abschließende Extension
1 Zyklus	∞	55°C	konstante Endtemperatur

#### 2.2.7.1. Reduktion der Vektor-Produkte durch BstX I-Verdau

Bei der zufälligen Subklonierung der Rekombinanten kann es vorkommen, daß in dem klonierten Fragment kein Exon und demnach auch keine funktionellen Spleißerken-

nungssignale vorhanden sind. Diese Sequenzen werden dann beim Spleißen in der Zelle herausgeschnitten und die vektoriellen Exons zusammengefügt, wobei eine BstX I- Restriktionsschnittstelle entsteht. Mithilfe eines BstX I-Verdaues können diese unerwünschten Vektorprodukte gespalten und somit als Matrize für die sekundäre PCR eliminiert werden. Es wurden 5µl des Vektoransatzes nicht verdaut, um in der sekundären PCR den Erfolg des Verdaus zu überprüfen und falsch positive Exons unterscheiden zu können.

1. 2µl BstX I (10U/µl; GibcoBRL) zur primären PCR-Reaktion zugeben und ü.N. bei 55°C inkubieren.
2. Um die Restriktion so vollständig wie möglich zu erreichen, am nächsten Tag weitere 0,4 µl BstX I zu pipettieren und nochmals 2 h bei 55°C inkubieren.

### 2.2.8. Sekundäre PCR

Die zweite PCR wird mit einem anderen vektorspezifischen Primerpaar ausgeführt, dessen Sequenzen innerhalb des Produktes der primären PCR liegen ("nested" Primer). Diese Reaktion erhöht zum einen die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte und zum anderen werden dUMP-Reste angehängt, die eine Ligase-freie Klonierung mit dem UDG-System (GibcoBRL) in den Vektor pAmp 10 erlauben.

#### Primer

dUSA4: 5' CUACUACUACUACACCTGAGGAGTGAATTGGTCG 3'  
dUSD2: 5' CUACUACUACUAGTGAAGTGCAGTGTGACAAGC 3'

#### PCR-Ansatz

5,0 µl BstX I-behandeltes primäres PCR-Produkt  
4,5 µl 10 x PCR-Puffer (Pharmacia)  
0,5 µl 20 mM dNTP-Gemisch  
1,0 µl 20 µM Primer dUSA4  
1,0 µl 20 µM Primer dUSD2  
ad 47,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

5 min bei 94°C im PCR-Block denaturieren und bei 80°C halten.

+ 2,5 µl 1 x PCR-Puffer mit 2,5 U Taq-Polymerase (Pharmacia)

zugeben.

PCR-Bedingungen

30 Zyklen	1 min	94°C	Denaturierung
	1 min	60°C	Annealing
	3 min	72°C	Extension
1 Zyklus	10 min	72°C	abschließende Extension
1 Zyklus	∞	10°C	konstante Endtemperatur

5µl der PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung ausgewertet.

**2.2.9. UDG-Klonierung und Analyse der sekundären PCR-Produkte**

Für die direkte Klonierung der sekundären PCR-Produkte wurde das Ligase-freie pAmp-System der Firma GibcoBRL verwendet. In der vorangegangenen PCR-Reaktion wurden durch die eingesetzten Primer dUMP-Reste an beide Enden der Amplifikationsprodukte angehängt. Das Enzym Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) ist in der Lage, Uracil-Reste aus der DNA zu entfernen, was zur Folge hat, daß sich an diesen Stellen die Basenpaarung auflöst und 3'-überhängende Enden entstehen. Diese sind komplementär zu den Enden des Vektors pAmp 10 (ungerichtete Klonierung) und pAmp 1 (gerichtete Klonierung) und können durch Annealing kloniert werden. Die rekombinanten pAmp 10 Moleküle können direkt in Bakterien transformiert werden. Pro Ansatz wurden 10-20 Einzelkolonien gepickt und in einer Kolonie-PCR amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die einzelnen Klone ausgewertet und vielversprechende Kandidaten in größerer Menge kultiviert und daraus DNA zur anschließenden Charakterisierung isoliert.

Klonierungsansatz

2 µl	sekundäres PCR-Produkt (100 ng)
2 µl	pAmp10 oder pAmp1-Vektor (25 ng/µl)
1 µl	10 x PCR-Puffer (Pharmacia)
5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
1 µl	UDG (1U/µl)

1. Ansatz 30 min bei 37°C inkubieren.
2. 5µl des Ansatzes in 100 µl hochkompetente DH5α-Zellen transformieren (s.xxx) und auf Ampizillin-LB-Agarplatten ausstreichen.
3. ü.N. bei 37°C kultivieren.
4. 10-20 Einzelkolonien pro Platte picken und in einer Kolonie-PCR direkt amplifizieren.

Primer

SA4: 5' CACCTGAGGAGTGAATTGGTTCG 3'

SD2: 5' GTGAACTGCACTGTGACAAGC 3'

PCR-Ansatz

                  gepickte Einzelkolonie  
5,0 µl 10 x PCR-Puffer (Pharmacia)  
0,5 µl 20 mM dNTP-Gemisch  
1,0 µl 20 µM Primer SA4  
1,0 µl 20 µM Primer SD2  
2,5 µl 1 x PCR-Puffer mit 2,5 U Taq-Polymerase (Pharmacia)  
ad 50 µl           H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

PCR-Bedingungen

1 Zyklus           5 min 94°C   Anfangsdenaturierung  
30 Zyklen        45 sec 94°C   Denaturierung  
                  30 sec 60°C   Annealing  
                  1 min 72°C   Extension  
1 Zyklus        10 min 72°C   abschließende Extension  
1 Zyklus        ∞       10°C   konstante Endtemperatur

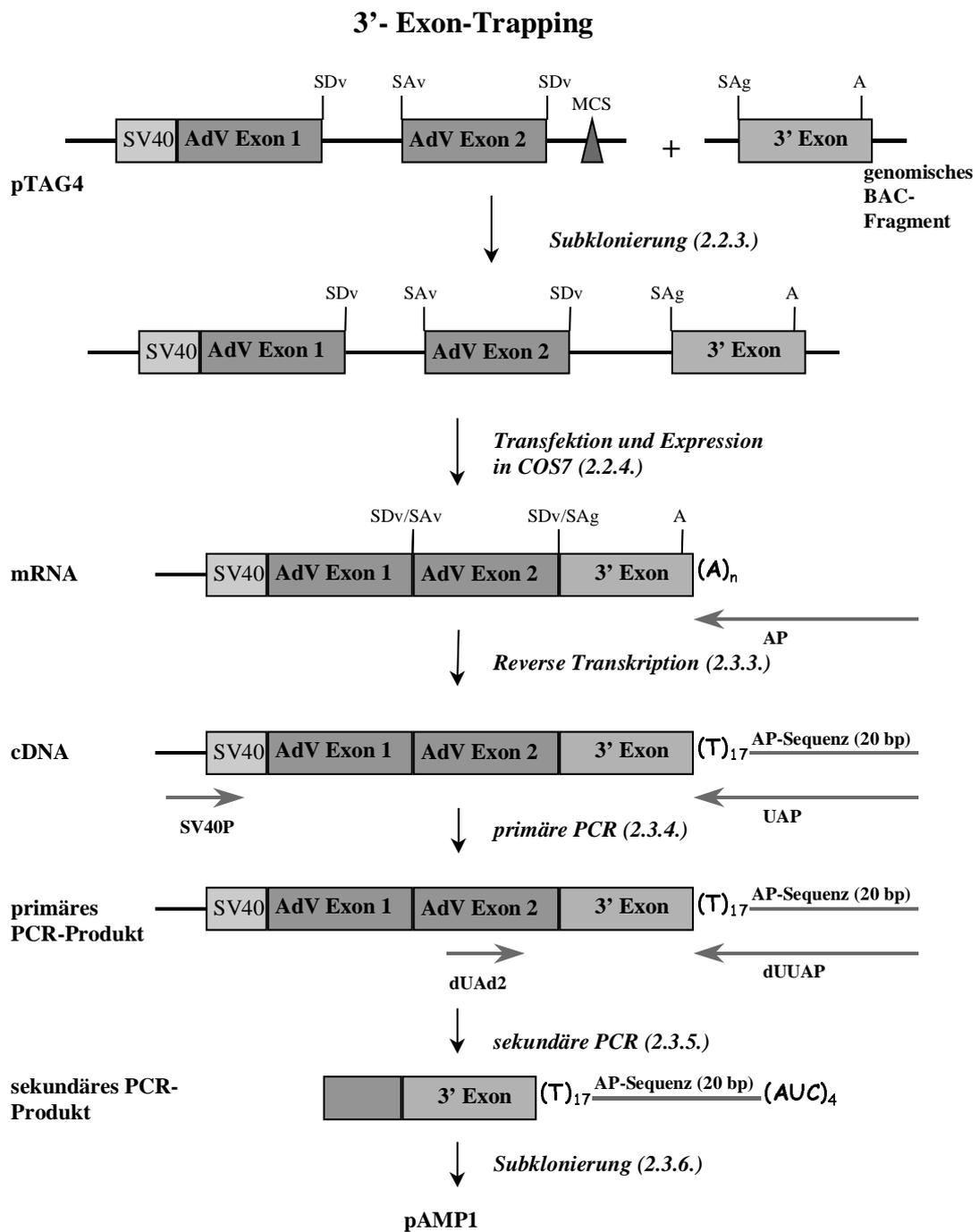
5µl der PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung ausgewertet. Aus größeren Übernachtskulturen der Exon-Kandidaten wurden sowohl Glycerolstocks angelegt als auch DNA, wie unter 2.1.2. beschrieben, zur weiteren Charakterisierung isoliert.

### 2.3. Exon-Trapping-System zur Isolierung von terminalen 3'-Exons

Die 3'-Exon-Trapping-Methode wurde von D. Krizmann (Krizman and Berget, 1993) entwickelt und ist speziell für die Isolierung der größeren, terminalen 3'-Exons von reifen mRNAs geeignet. Auch dieses System ist kommerziell bei der Firma GibcoBRL erhältlich und wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Da das 3'-Exon-Trapping-System weitestgehend den Prinzipien des internen Exon-Trapping-Systems folgt, möchte ich hier nur auf die Unterschiede in den beiden Techniken eingehen.

Um terminale Exons zu "fangen", wird ein Vektor eingesetzt, der nur eine einzige Spleiß-Signal-Sequenz, den 3'-Spleißdonor, enthält. Für die inklonierte genomische DNA bedeutet das, daß sie zusätzlich zur funktionellen Spleißakzeptorstelle auch eine Erkennungssequenz (AATAAA; ATTAATA) für die Polyadenylierung besitzen muß, die bei der Transkription das Anhängen einer poly(A)-Kette an das 3'-Ende gewährleistet. Nach der Transfektion der Rekombinanten in COS7 Zellen entstehen also mRNAs, die sich aus vektorialen Exons und einem 3'-Exon der untersuchten genomischen DNA zusammensetzen. Wichtig bei der späteren Umschreibung der RNA in cDNA ist der hierbei eingesetzte Primer. Er stammt ursprünglich aus dem 3'-RACE-System (Rapid Amplification of cDNA Ends) zur Isolierung vollständiger cDNA-Klone aus cDNA-Bibliotheken (Frohmann M.A., 1988). Dieser sogenannte Adaptor-Primer (AP) besteht am 3'-Ende aus einer 17 bp-langen Oligo d(T)-Region, die am Poly(A)-Ende der mRNA bindet (Initiation der cDNA-Synthese). Das 5'-Ende des Oligonukleotids enthält eine 20 bp lange Adaptorsequenz, die in die synthetisierte cDNA eingefügt wird und die späteren spezifischen PCR-Reaktionen mit dem Universal Adapter Primer UAP erlaubt. Auch im 3'-Exon-Trapping-System werden "nested" Primer für die 2. PCR eingesetzt, um die Spezifität der Produkte zu erhöhen. Für die primäre Amplifikation wird hier ein Primer aus der SV40-Promotor-Region gewählt, der Primer für die sekundäre PCR hingegen liegt kurz vor der 5'-Spleißstelle des Adenovirus-Exon 2, wobei er als reverser Primer in beiden Reaktionen der UAP eingesetzt werden kann (Abb. 2.3.).

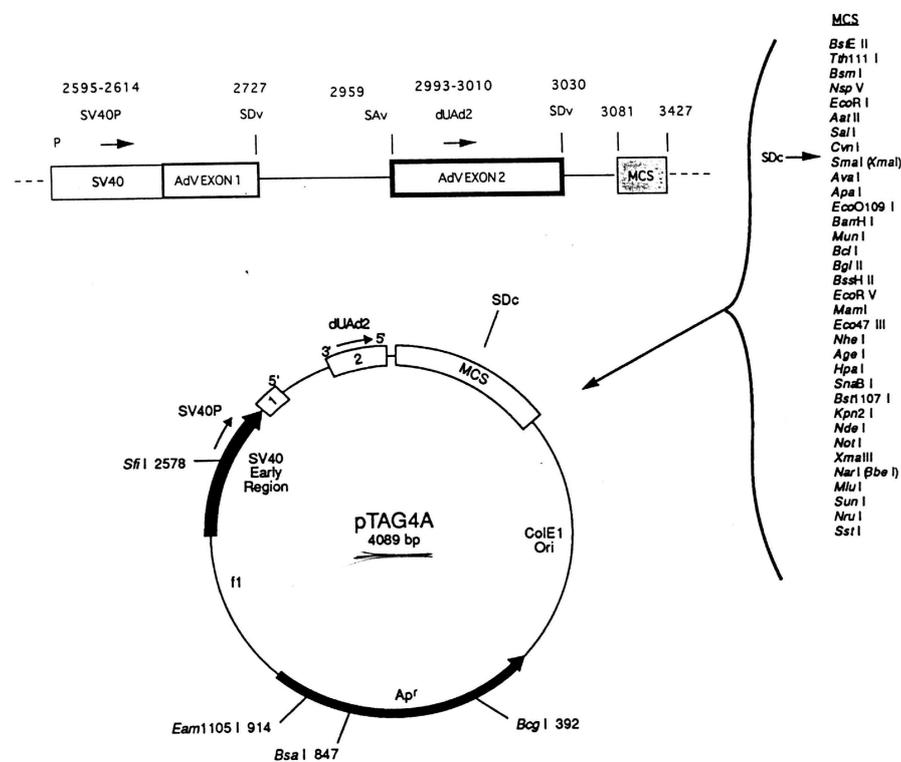
Im Gegensatz zum internen Exon-Trapping-System entstehen hier keine spezifischen Vektor-Produkte, die unterdrückt werden müssen, da zum Entstehen einer reifen mRNA sowohl eine funktionelle 5' Spleiß-Signalsequenz als auch die Polyadenylierungsstelle vorhanden sein müssen.



**Abb. 2.3.:** schematische Übersicht des 3'-Exon-Trapping-Systems. AdV: Adenovirus; MCS: mutiple cloning site; SDv: vektorielle Spleißdonorstelle; SAV: vektorielle Spleißakzeptorstelle; SAg: genomische Spleißakzeptorstelle; A: Polyadenylierungssignal; AP: Adapterprimer; UAP, dUAd2, dUUAP und AP sind die Bezeichnungen der verwendeten Primer.

### 2.3.1. pTAG4 Vektor

Der 4 kb große 3'-Exon-Trapping-Vektor pTAG4 (Abb.2.3.1.) enthält ebenfalls ein Gen für Ampicillinresistenz und ein Replicon zur Selektion und Vermehrung in prokaryotischen E.coli- Zellen, als auch einen SV40-Origin und -Promotor für die effektive Replikation und Transkription in eukaryotischen COS7 Zellen. Flankierend vom SV40 Promotor liegt ein Adenovirus-Genfragment bestehend aus Ad-Exon1, Ad-Intron1 und Ad-Exon2, welche die Spleiß-Signal-Sequenzen liefern. Danach folgt die multiple Klonierungsstelle, in die das genomische DNA-Fragment subkloniert wird.



**Abb. 2.3.1.:** Karte des 3'Exon-Trapping Vektors pTAG4. Oben sind die Exon-Intron-Segmente und die multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) dargestellt. Die rechts aufgelisteten Enzyme schneiden nur ein einziges Mal in der MCS. P: SV40 early Promotor; SDv: vektorielle Spleißdonorstelle; SAV: vektorielle Spleißakzeptorstelle; SDC: kryptische Spleißdonorstelle.

### 2.3.2. Exon-Kontroll-Plasmid

Auch bei diesem System wird parallel ein Exon-Kontroll-Plasmid (T2MX) eingesetzt, das aus einem 600 bp langem Fragment in pTAG4 sublonierter SV40 Virus-DNA be-

steht. Dieses Insert enthält ein 3' terminales Exon von 260 bp Länge. Das sekundäre PCR-Produkt zeigt nach der Auftrennung auf dem Agarosegel eine Größe von etwa 395 bp (50 bp Ad-Exon-Sequenzen + 260 bp Exon + > 17 bp dT + 32 bp vom UAP-Primer).

Die Schritte von der Subklonierung der BAC-DNA in den Vektor pTAG4 bis zur RNA-Isolation aus den transfizierten COS7-Zellen erfolgte genauso wie unter 2.2.3.-2.2.5. für das interne Exon-Trapping beschrieben. Im Anschluß sind nur die Reaktionen erwähnt, die sich in Material und Methodik von internen Exon-Trapping-System unterscheiden (Abb.2.3.).

### 2.3.3. cDNA-Synthese

Die reverse Transkription wurde mit dem oben erwähnten Adapter-Primer durchgeführt, wobei aufgrund des Oligo d(T)-Restes alle mRNA-Moleküle amplifiziert wurden.

#### Primer

AP: 5' GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'

### 2.3.4. Primäre PCR

Die rekombinante Erststrang-cDNA wurde mit dem Primer SV40P, der aus dem transkribierten SV40-Promotorbereich des Vektors stammt, und dem Primer UAP (Universal Amplification Primer), der komplementär zur eingeführten Adaptorsequenz ist, durchgeführt.

#### Primer

SV40P: 5' AGCTATTCCAGAAGTAGTGA 3'

UAP: 5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'

#### PCR-Ansatz

5,0 µl	cDNA
5,0 µl	10 x PCR-Puffer (Pharmacia)
0,5 µl	20 mM dNTP-Gemisch
2,5 µl	10 µM Primer SV40P
2,5 µl	10 µM Primer UAP
ad 47,5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

5 min bei 94°C im PCR-Block denaturieren und bei 80°C halten.

2,5 µl 1 x PCR-Puffer mit 2,5 U Taq-Polymerase (Pharmacia) zugeben.

PCR-Bedingungen

1 Zyklus	2 min	58°C	Annealing
	40 min	72°C	Primerverlängerung
30 Zyklen	45 sec	94°C	Denaturierung
	45 sec	60°C	Annealing
	2 min	72°C	Extension
1 Zyklus	10 min	72°C	abschließende Extension
1 Zyklus	∞	55°C	konstante Endtemperatur

**2.3.5. Sekundäre PCR**Primer

dUAd2: 5' CAUCAUCAUCAUCAGTACTCTTGGATCGGA 3'

dUUAP: 5' CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'

PCR-Ansatz

1,0 µl	primäres PCR-Produkt, 1:10 verdünnt
5,0 µl	10 x PCR-Puffer (Pharmacia)
0,5 µl	20 mM dNTP-Gemisch
1,0 µl	20 µM Primer dUAd2
1,0 µl	20 µM Primer dUUAP
ad 47,5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

5 min bei 94°C im PCR-Block denaturieren und bei 80°C halten.

2,5 µl 1 x PCR-Puffer mit 2,5 U Taq-Polymerase (Pharmacia)

zugeben.

PCR-Bedingungen

30 Zyklen	45 sec	94°C	Denaturierung
	45 sec	60°C	Annealing
	2 min	72°C	Extension
1 Zyklus	10 min	72°C	abschließende Extension
1 Zyklus	∞	10°C	konstante Endtemperatur

**2.3.6. UDG-Klonierung, Kolonie-PCR und Analyse**

Die sekundären PCR-Produkte wurden gerichtet in den Vektor pAmp1 (s. xxx) subkloniert. Die Kolonie-PCR wurde mit den Primer der sekundären PCR ohne dUMP-Reste (Ad2; UAP) durchgeführt, Plasmid-DNA isoliert und wie für das interne Exon-Trapping-System beschrieben analysiert.

## 2.4. Sequenzierungen

### 2.4.1. Sequenzierung der klonierten Exon-Kandidaten

Die Sequenzierung der erhaltenen Exon-Kandidaten wurde mithilfe eines Sequenzierautomaten (ABI 373A DNA Sequencer) der Firma Applied Biosystems vorgenommen. Die eigentliche Reaktion folgt dabei dem Prinzip der Sanger-Methode (Sanger et al., 1977), die auf dem enzymatischen Kettenabbruch durch Didesoxynukleotide (ddNTPs) beruht. Bei einer manuellen Sequenzierung werden die DNA-Fragmente in vier Kettenabbruchreaktionen radioaktiv markiert und auf einem Sequenzgel in vier Spuren aufgetrennt. Im Gegensatz hierzu werden bei der automatisierten Sequenzierung Didesoxynukleotide eingebaut, die mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher spektroskopischer Eigenschaften markiert sind. Setzt man vier verschiedene Fluorophore ein, ist es möglich, alle vier Kettenabbruchreaktionen gemeinsam in einer Gelspur elektrophoretisch aufzutrennen. Die markierten Banden laufen während der Elektrophorese an einem Fluoreszenzdetektor vorbei und eine effiziente Software wertet die eingelesenen Daten aus. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierung mit dem ABI PRISM<sup>TM</sup>Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit der Firma ABI Applied Biosystems durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers und können dort detailliert nachgelesen werden. Für jede Plasmidsequenzierung wurde zwischen 0,5 und 1 µg DNA eingesetzt und als Primer dienten M13/pUC Forward und Reverse (GibcoBRL), die Klonierungsstellen der pAMP-Vektoren flankieren.

#### Primer

M13/pUC Forward: 5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'

M13/pUC Reverse: 5' AGCGGATAACAATTTACACACAGG 3'

### 2.4.2. Computergestützte Analyse der DNA-Sequenzen

#### 2.4.2.1. Korrektur der Sequenzdaten und Identifizierung der Exon-Sequenzen

Die Daten aus der automatischen Sequenzierung wurden gesammelt und mithilfe eines Sequenz-Editor-Programms (ABI) dargestellt. Nicht eindeutig identifizierte Nukleotide

wurden, wenn nötig anhand des Chromatogramms korrigiert. Ob die Spleißreaktion an den Rekombinanten korrekt verlaufen war, konnte mit dem Sequenzanalyse-Programm DNAsis1 (MWG Biotech) überprüft werden. Die Spleißerkennungssignale flankierenden Vektorsequenzen wurden dabei identifiziert und eliminiert. Die verbleibende DNA-Sequenz sollte das "getrappte" Exon repräsentieren. Die Exon-Kandidaten wurden in diesem Programm noch auf das Vorhandensein eines offenen Leserahmens ("Open Reading Frames", ORF) hin untersucht, d.h. die Sequenz sollte wenigstens in einem der drei möglichen Leseraster nicht von einem Stop-Kodon unterbrochen sein. Die 3'-Exon-Kandidaten wurden zusätzlich nach dem Polyadenylierungs-Signal (AATAAA, ATATAA) 10-30 bp vor der poly(A)-Kette der reifen mRNA durchleuchtet. Um vektorielle Exons auszusortieren, wurden die Sequenzen gegen alle während des Versuchs eingesetzten Vektorsequenzen gescreent (BAC-Vektor pBAC, beloBAC; Exon-Trapping-Vektoren: pSPL3, pTAG4; Sequenzier-Vektoren: pAMP1, pAMP10).

#### **2.4.2.2. Sequenzvergleiche in öffentlichen Datenbanken via Internet**

Die Exon-Kandidatensequenzen wurden über das Internet mit öffentlichen DNA- und Protein-Datenbanken (z.B. European Molecular Biotechnology Laboratory EMBL GenBank, GenomeDataBase GDB, SwissProt) verglichen, um Homologien zu bereits bekannten Genen aufzuspüren. Mit dem Programm BLASTN wurden die Kandidaten auf Nukleinsäureebene untersucht und BLASTX wurde entsprechend zur Analyse auf Proteinebene angewendet. Diese Programme stehen funktionsbereit auf der WWW-Seite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> zur allgemeinen Verfügung.

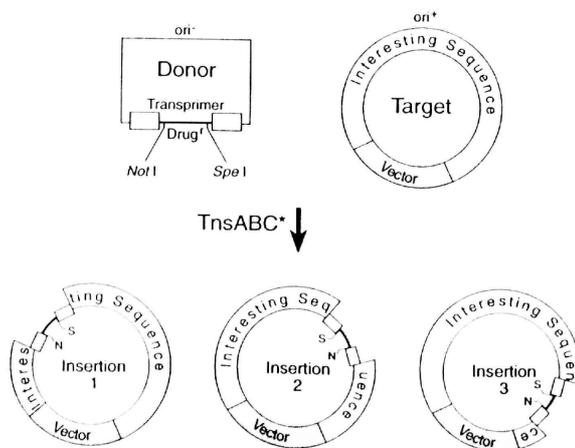
#### **2.4.3. Sequenzierung des cDNA-Klons J1124**

##### **2.4.3.1. Genome Priming System (GPS<sup>TM</sup>-1)**

Mithilfe des GPS<sup>TM</sup>-1 Genome Priming Systems ist es möglich, in vitro eine Population von Templates zur DNA-Sequenzierung herzustellen, in die zufällig verteilte Primerbindungsstellen eingeführt werden. Diese Methode bietet sich vor allem bei DNA-Fragmenten an, für die eine einmalige Sequenzierung nicht ausreicht, um die gesamte

Basenfolge zu bestimmen. Im Gegensatz zum klassischen Primer-walking und Subklonierungs-Techniken ermöglicht das GPS<sup>TM</sup>-1 System eine schnellere Analyse von großen DNA-Abschnitten.

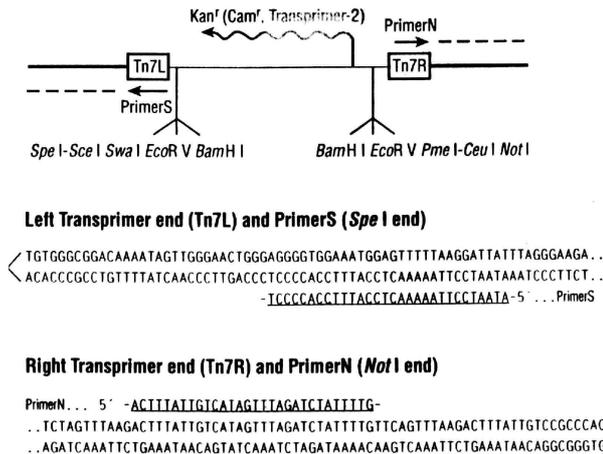
Die Methode beruht auf einem TN7 Transposonsystem, bei dem eine TnsABC Transposase die sogenannten Transprimer<sup>TM</sup> zufällig in die Ziel-DNA verteilt einsetzt. Dabei wird pro DNA-Molekül nur ein Transposon eingeführt ("Targetimmunität"), was zur Folge hat, daß eine DNA-Population entsteht, in der jeder einzelne Klon eine Insertion an unterschiedlicher Position trägt (Abb.2.4.3.1).



**Abb.2.4.3.1a:** schematische Übersicht des GPS1-Genome Priming Systems.

Die Transprimer tragen neben einem Antibiotika-Resistenzgen auch die Primerbindungsstelle für speziell von der Firma mitgelieferte Sequenzierprimer. Von den Transposons aus kann jetzt parallel in beide Richtungen ins Insert hineingelesen werden. Diese Ziel-DNAs können parallel sequenziert und anschließend zusammengesetzt werden.

In der vorliegende Arbeit wurde das System dazu verwendet, in eine ungefähr 9 kb große cDNA (J1124) Transprimer einzusetzen und sie so schnell und effizient zu sequenzieren.



**Abb.2.4.3.1b:** Transprimer<sup>TM</sup>-1: Lokalisation der Sequenzier-Primer (PrimerN und PrimerS); Selektion des Transprimers über Kanamycin.

### 2.4.3.2. Sequenzierung des cDNA-Klons J1124

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierung mit dem ABI PRISM<sup>TM</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit der Firma ABI Applied Biosystems durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers und können dort detailliert nachgelesen werden.

Die mit dem GPS<sup>TM</sup>-1 System hergestellten Klone der cDNA J1124 wurden mit den von der Firma gelieferten Primern N und S (New England Biolabs) sequenziert. Es wurden dazu 0,5 bis 1µg DNA eingesetzt, sowie 3 pmol der Primer.

#### Primer

PrimerN: 5' ACTTTATTGTCATAGTTTAGATCTATTTTG 3'

PrimerS: 5' ATAATCCTTAAAACTCCATTTCACCCCT 3'

## 2.5. Charakterisierung der Exon-Kandidaten

### *Primer-Design*

Als erstes wurde für jeden Exon-Kandidaten ein spezifisches Primerpaar gewählt, um die darauffolgenden PCR-Analysen durchführen zu können.

Die Primer-Sequenzen wurden mit dem Programm Primer3 Version 0,2c ausgesucht.

Das Programm errechnet automatisch die Schmelztemperatur der Oligonukleotide, wobei die Annealingtemperatur in den folgenden Versuchen um jeweils 2°C darunter festgelegt wurde.

#### *Verwendete Primer*

Name	Richtung	Sequenz 5'-3'	T <sub>Ann</sub> [°C]	Produktgröße [bp]
199-30	for rev	ATGTCAAGCAGAAATAGGGAGC ACCCATACCTGCTCTCATG	57	143
608-61	for rev	GTTGCCCAGCTTCATTAAGC TGTGCAAGTAGAAGTCTCAGCC	54	110
142-14	for rev	CATGAAAGGCACCCTGGTAG GGACCGTGTTCATTCTG	55	82
32-3	for rev	GAGTCTTGACTCTACCCCCTG AAAGACGCAGAGCCTCAGAG	57-58	64
32-9	for rev	AGCAGGTTTCAACTGACGG GGTATTCACGCAGTTCCCAT	54	174
GAPDH	for rev	ACCCAGAAGACTGTGGATGG GGATGACCTTGCCCACAG	55-57	115
β-Aktin	for rev	TGTACCCTGGCATTGCCGAC CAGCGAGGCAGGATGGAG	54-57	124

### **2.5.1. Rückbestätigung der Exon-Kandidaten auf die Ausgangs-DNA**

Um die Exon-Kandidaten auf die Ausgangs-DNA rückzubestätigen wurden mit den spezifischen Primern PCR-Reaktionen durchgeführt. Als Target-DNA wurden jeweils 40 ng der entsprechenden BAC-DNA und 250 ng genomische Human-DNA (Plazenta-DNA) eingesetzt. Der jeweilige Exon-Klon (je 20 ng) diente hierbei als Positiv-Kontrolle, H<sub>2</sub>O anstatt DNA als Negativ-Kontrolle. Die einzelnen PCR-Reaktionen variieren nur in der unterschiedlichen Annealing-Temperatur (T<sub>Ann</sub>) für die einzelnen Primer-Paare. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 6%-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend analysiert, wobei 500ng des 1KB-Marker (GibcoBRL) zur Größenbestimmung dienen.

Für die Lokalisation der Exon-Kandidaten 199-30 und 608-61 innerhalb des 22-spezifischen perizentrischen BAC-Contigs wurden alle BACs des Contigs mit den entsprechenden Primern wie oben beschrieben gescreent.

PCR-Ansatz

DNA  
 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (AGS)  
 2,0 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,25 µl 20 mM dNTP-Gemisch  
 0,5 µl 20 µM Forward-Primer  
 0,5 µl 20 µM Reverse-Primer  
 0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl; AGS)  
 ad 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

PCR-Bedingungen

1 Zyklus      5 min 94°C    Erstdenaturierung  
 30 Zyklen    30 sec 52-61°C    Annealing  
                  1 min 72°C    Extension  
                  1 min 94°C    Denaturierung  
 1 Zyklus      30 sec 52-61°C    abschließendes Annealing  
 1 Zyklus      5 min 72°C    abschließende Extension  
 1 Zyklus      ∞      4°C    konstante Endtemperatur

**2.5.2. Zoo-PCR**

Um Information über die evolutive Konservierung der Exons zu erhalten, wurden an genomischer DNA von verschiedenen Säugetieren (Maus, Ratte, Hase, Schimpanse, Lamm) PCR-Reaktionen unter denselben Bedingungen wie unter 2.5.1. beschrieben vorgenommen. Dabei wurden jeweils 100 ng Säuger-DNA eingesetzt.

**2.5.3. PCR am monochromosomalen Hybridpanel**

Der hier eingesetzte monochromosomale Hybridpanel enthält 24 Mensch/Nager Hybridzelllinien, mit deren Hilfe sich die chromosomale Lokalisation von DNA-Abschnitten bestimmen läßt. Jedes der Hybride enthält jeweils ein menschliches Chromosom. Die PCR-Reaktionen wurden mit jeweils 50 ng DNA der Zelllinien und den spezifischen Exon-Primern wie unter 2.5.1. beschrieben durchgeführt.

## 2.5.4. RT-PCR-Analyse

### 2.5.4.1. RNA-Isolierung

Für die erfolgreiche Isolierung und die weitere Analyse von RNA sind grundsätzlich einige Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Es sollten immer Handschuhe getragen und alle Schritte müssen auf Eis ausgeführt werden. Für alle Puffer und Lösungen wird ausschließlich DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O verwendet. Pipettenspitzen und Pipetten werden nur für Arbeiten mit RNA eingesetzt. Zu benutzende Glaswaren werden vor Gebrauch mindestens 4h bei 240°C gebacken. Metallteile wie Spatel, Pinzetten oder Homogenisatoren werden vor dem Sterilisieren gründlich mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mehrere Stunden oder ü.N. in Korsolin eingeweicht.

Die RNA wurde nach dem RNApure -System der Firma PeqLab isoliert. Dabei wurden 2ml RNApure pro 100 mg Gewebe, bzw. 2,6 ml/25 cm<sup>3</sup> bei Zellkulturen eingesetzt. Die weiteren Schritte wurden laut den Angaben des Herstellers durchgeführt. Insgesamt wurde RNA aus 14 verschiedenen menschlichen Geweben und 8 Tumorzelllinien isoliert.

### 2.5.4.2. RNA-Formaldehydgel

Um die Qualität der isolierten RNA zu überprüfen, wurde ein denaturierendes Formaldehydgel gefahren und die Menge und Qualität der RNA nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht beurteilt.

#### Gel

0.5 g	Agarose
5.0 ml	10x MOPS
36.0 ml	DEPC-H <sub>2</sub> O

aufkochen und auf 65°C abkühlen. 9.0 ml Formaldehyd (lichtgeschützt) auf 65°C vorwärmen und erst kurz vor dem Gießen des Gels zur gelösten und abgekühlten Agarose geben.

### Proben-Vorbereitung

RNAs auf Eis auftauen lassen.

je Probe

1.75 µl Formaldehyd

1.0 µl 10x MOPS

5.0 µl Formamid

1.0 µl BPB

0.5 µl Ethidiumbromid

mischen und 3µl RNA (ca.5-8µg) zugeben.

Proben 15 min bei 65°C denaturieren und dann auf Eis stellen.

### Laufbedingungen

Laufpuffer: 1x MOPS

60-90 min bei 90 V, 250 mA

#### **2.5.4.3. RT (Reverse Transkription)-PCR**

Bei dieser besonderen Art der PCR werden nicht DNA- sondern RNA-Moleküle als Matrize eingesetzt. Dazu wird die RNA in einem ersten Schritt mit dem Enzym Reverse Transkriptase in einzelsträngige, stabilere cDNA umgeschrieben. Anschließend wird nach Zugabe von spezifischen Primern und Taq-Polymerase eine PCR nach dem üblichen Schema durchgeführt. Ein Anwendungsgebiet der RT-PCR ist zum Beispiel die Messung der Expressionsstärke von bekannten oder noch unbekanntem Genen in verschiedenen Geweben. Die Menge an mRNA in einer Zelle ist hierbei häufig ein Hinweis auf die Aktivität des zugehörigen Gens. Diese Methode ist 1000-10000 mal sensitiver als traditionelle RNA-Blotting-Techniken, da auch sehr geringe Mengen oder schon degradierte RNA detektiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression zweier Exon-Kandidaten in 14 verschiedenen menschlichen Geweben, sowie 8 Tumorzelllinien untersucht. Um genaue Aussagen über die Menge der mRNA machen zu können, bediente man sich eines internen Kontrollstandards. Im selben Reaktionsgefäß wurden Primer für die zu überprüfende Sequenz, sowie je nach Produktgröße Primer für die ubiquitär exprimierten Haushaltsgene GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) oder  $\beta$ -Aktin eingesetzt. Diese Enzyme kommen in allen Zellen von Bakterien bis zu Säugetieren und höheren Pflanzen vor. Nach Auftrennung der Produkte in einem 6%-igen PAA-Gel wurden die Banden densitometrisch ausgewertet, was eine semiquantitative Aussage zur Expression der untersuchten Sequenzen ermöglichte.

Als Primer der RT-Reaktion wurden Random Hexamers , als Reverse Transkriptase M-Mlv-RT der Firma PeqLab benutzt.

### RT-Ansatz

2,0 µg	RNA
2,0 µl	Hexanukleotide
ad 21 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

5 min bei 70°C denaturieren und auf Eis abkühlen.

3,0 µl	10x Reaktionspuffer (PeqLab)
1,0 µl	Ribonuklease-Inhibitor (30U/µl; MWG)
2,0 µl	20 mM dNTP-Gemisch
3,0 µl	M-Mlv-RT (50U/µl; PeqLab)

### RT-Bedingungen

60 min	37°C
5 min	95°C
∞	4°C

### PCR-Ansatz

5,0 µl	cDNA aus RT-Ansatz
2,5 µl	10 x PCR-Puffer (AGS)
2,0 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
0,25 µl	20 mM dNTP-Gemisch
0,5 µl	20 µM Forward-Primer
0,5 µl	20 µM Reverse-Primer
0,5 µl	20 µM GAPDH for oder β-Aktin for
0,5 µl	20 µM GAPDH rev oder β-Aktin rev
0,5 µl	Taq-Polymerase (5U/µl; AGS)
ad 25 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

PCR-Bedingungen s. 2.5.1.

## **2.6. Southern Blot Analyse**

Die von Edwin M. Southern 1975 entwickelte Technik (Sambrook et al., 1989) stellt eine der grundlegenden Methoden in der Molekularbiologie dar. Sie wird häufig zur Lokalisation von bestimmten DNA-Sequenzen im Genom eingesetzt. Hierbei wird die gewünschte DNA (z.B. BACs, genomische DNA) mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen verdaut und die dabei entstehenden Fragmente im Agarosegel nach ihrer Größe

aufgetrennt. Anschließend wird die DNA im Gel mit einer schwachen Säure depuriniert und dann mit einer starken Base hydrolysiert. Die entstandenen einzelsträngigen kleineren Fragmente können so leichter auf eine Membran (Nylon oder Nitrocellulose) übertragen werden. Die relative Position der Fragmente im Gel bleibt beim Transfer auf den Filter erhalten. Man unterscheidet im allgemeinen zwischen Aktivblot und Passivblot. Beim Aktivblotten wird die DNA entweder durch Elektrophorese oder unter Anlegen eines Vakuums auf den Filter transferiert. Beim Passivblot nutzt man Kapillarkräfte aus, die die DNA vom Gel in die Membran ziehen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Passivblot eingesetzt.

Nach dem Transfer wird die DNA auf dem Filter durch UV-crosslinking immobilisiert. Die an die Membran gebundene DNA kann dann direkt mit radioaktiv markierten Sonden (DNA oder RNA) hybridisiert werden. Die Spezifität, mit der die DNA-Sonde ihre homologen Abschnitte in der filtergebundenen DNA erkennt, kann durch die Einstellung von Stringenzbedingungen während des Hybridisierungsvorgangs bestimmt werden. Die Stabilität der Hybride wird durch Temperatur, Formamid- und Ionengehalt der Hybridisierungs- und Waschlösungen beeinflusst. Unspezifisch gebundene Proben können daher mittels der Posthybridisierungs-Waschschritte entfernt werden. Die Lokalisation der Sonden-DNA wird anschließend durch Autoradiographie detektiert.

### **2.6.1. Insert-Isolierung**

Aus den Exon-Kandidatenklonen wurden die insertierten humanen DNA Fragmente isoliert und dienten in folgenden Southern Blot Analysen als Hybridisierungsproben. Die Inserts wurden in einem Doppolverdau mit den Restriktionsenzymen SallI und XbaI aus dem Plasmidvektor pAMP1/pAMP10 ausgeschnitten und die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Insertbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN) gereinigt. Der Erfolg der Insert Isolierung wurde anschließend in einem Agarosegel kontrolliert.

Ebenso wurde mit dem cDNA-Klon J1124 verfahren, dessen Insert in Southern und Northern- Experimenten als Sonde eingesetzt wurde. Als Restriktionsenzyme wurden hierbei NotI und SallI verwendet.

### 2.6.2. Radioaktive PCR

Die Exon-Kandidaten wurden auch als Sonden in Southern- oder Northern-Hybridisierungen eingesetzt und dafür mithilfe der sogenannten „heißen PCR“ markiert. Dabei wurden während der Amplifikation  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTPs in die Produkte eingebaut. Zur Reinigung der Sonde wurde das heiße Amplifikationsprodukt standardmäßig mit absolutem EtOH gefällt. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurde parallel die gleiche Reaktion mit nicht radioaktiven Nukleotiden durchgeführt und auf einem 6%-igen PAA-Gel analysiert. Alle Schritte wurden unter Einhaltung der Sicherheitsbestimmungen für radioaktives Arbeiten ausgeführt.

#### PCR-Ansatz

2,0 $\mu\text{l}$	Exon-Plasmid-DNA (20 ng/ $\mu\text{l}$ )
5,0 $\mu\text{l}$	10 x PCR-Puffer (AGS)
4,0 $\mu\text{l}$	25 mM $\text{MgCl}_2$
0,5 $\mu\text{l}$	dNTP-Gemisch (5mM dTTP, 5mM dGTP, 5mM dATP, 0,25 mM dATP)
1,0 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{M}$ Forward-Primer
1,0 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{M}$ Reverse-Primer
1,0 $\mu\text{l}$	Taq-Polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ ; AGS)
ad 45 $\mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
+ 5,0 $\mu\text{l}$	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (xxx $\mu\text{Ci}$ )

#### PCR-Bedingungen

1 Zyklus	5 min	94°C	Erstdenaturierung
30 Zyklen	30 sec	$T_{\text{Ann}}$	Annealing
	1 min	72°C	Extension
	1 min	94°C	Denaturierung
1 Zyklus	30 sec	$T_{\text{Ann}}$	abschließendes Annealing
1 Zyklus	5 min	72°C	abschließende Extension
1 Zyklus	$\infty$	4°C	konstante Endtemperatur

### 2.6.3. Random Primed Labeling

Die Methode der "random primed" Markierung (Feinberg und Vogelstein, 1983) beruht auf der Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden in allen möglichen Basenkombinationen an die zu markierende DNA. Diese Primer stellen dem Klenowenzym das

nötige freie 3'OH-Ende zur Synthese komplementärer DNA-Stränge zur Verfügung. Bei dieser Reaktion werden die als Substrat angebotenen markierten dNTPs ( $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) und die nicht markierten eingebaut. Da die eingesetzte DNA nur als Template zur Synthese der markierten DNA dient und während der Reaktion nicht degradiert wird, können nach dieser Methode auch kleinste Mengen an DNA (10 ng) markiert werden. Außerdem sind in dem als Primer dienenden Hexanukleotid-Gemisch alle Sequenzkombinationen enthalten, so daß sie an die eingesetzte DNA in statistischer Verteilung binden, was eine Markierung der gesamten DNA in nahezu gleichen Anteilen ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl BAC-DNAs, Exon-Klone, cDNAs und andere Plasmide radioaktiv markiert und als Sonden in der Southern-Hybridisierung eingesetzt.

#### Markierungsansatz

20 ng DNA  
 1  $\mu\text{l}$  5 mM dTTP  
 1  $\mu\text{l}$  5 mM dATP  
 1  $\mu\text{l}$  5 mM dGTP  
 2  $\mu\text{l}$  Hexanukleotide  
 ad 16  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

Ansatz 10 min bei 80°C denaturieren und auf Eis stellen.

+ 1  $\mu\text{l}$  Klenow-Enzym  
 + 3  $\mu\text{l}$   $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP

#### **2.6.4. Southern Transfer von BAC- und genomischer DNA (Passivblot)**

Depurinierungspuffer: 0.25 N HCl  
 Denaturierungspuffer: 1.5 M NaCl/0.5 M NaOH  
 (=Transferpuffer)  
 Neutralisierungspuffer: 1.5 M NaCl/0.5 M Tris-HCl pH 7.0

1. Gel 15 min in 0.25 N HCl depurinieren.
2. Gel 15 min in 1.5 M NaCl/0.5 M NaOH denaturieren.
3. Transfer ü.N. in 1.5 M NaCl/0.5 M NaOH auf eine Nylonmembran.
4. Membran 15 min in 1.5 M NaCl/0.5 M Tris-HCl pH 7.0 neutralisieren.
5. Membran beidseitig crosslinken

## 2.6.5. Filter Hybridisierung

Hybridisierungs-Mix: (Hyb-Mix)	15% Formamid 7% SDS 1% BSA 0.2 M Phosphat-Puffer	<u>Phosphat-Puffer:</u> 0.5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 9.8) 0.5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 4.2) gegeneinander titrieren bis pH
7.2	1 mM EDTA	
Waschpuffer1:	2x SSC (Stock: 20x) 0.1% SDS (Stock: 10%)	<u>20x SSC:</u> 3 M NaCl 0.3 M Na <sub>3</sub> -Citrat pH 7.0 mit Zitronensäure einstellen
Waschpuffer2:	0.1x SSC 0.1% SDS	

1. Filter 1h bei 42°C in 20 ml Hyb-Mix prähybridisieren.
2. radioaktiv markierte (supprimierte) DNA-Probe 5 min bei 100°C denaturieren
3. Hyb-Mix erneuern und Probe zugeben.
4. Ü.N. bei 42°C hybridisieren.
5. 2x 10 min bei 42°C mit Waschpuffer1 waschen.
6. 2x 10 min bei 60°C mit Waschpuffer2 waschen.
7. Filter in Frischhaltefolie einpacken und einen Röntgenfilm in der entsprechenden Kassette auflegen.
8. je nach Strahlungsintensität mehrere Stunden bis ü.N. bei -70°C inkubieren
9. Film entwickeln und auswerten

## 2.7. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

(modifiziert nach Pinkel et al., 1986; 1988)

### 2.7.1. Prinzip der FISH

Mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung lassen sich auf Chromosomenpräparaten bestimmte Genombereiche durch spezifische, markierte Sonden anfärben. Um das Chromatingerüst den DNA-Fragmenten zugänglicher zu machen, werden die OT einer geeigneten Vorbehandlung unterzogen. Dann werden Sonden- und Ziel-DNA denaturiert und bei 37°C in einer feuchten Kammer ü.N. hybridisiert. Handelt es sich bei den Sonden um komplexe genomische Proben, wie bei den hier eingesetzten BACs, muß vorher eine Blockierung der ubiquitären repetitiven Sequenzen vorgenommen werden. Dies wird mit

Hilfe von repetitiver Human-DNA (Cot 1-DNA) erreicht, die dabei im Überschuß eingesetzt wird und in einer Prähybridisierungsreaktion ("Preannealing") die Repeats abfängt. Nach der eigentlichen Hybridisierung werden die unspezifisch gebundenen Sonden durch Waschen der Präparate in Lösungen mit definiertem Salzgehalt und definierter Temperatur entfernt (Stringenzwaschen). Bei der Detektion der markierten Proben wird die hohe Bindungsaffinität zwischen Biotin und Avidin ausgenutzt, indem mit einem Fluorochrom gekoppeltes Avidin an die eingebauten Biotinmoleküle der Sonde bindet. Meistens ist eine Signalverstärkung erforderlich, die durch Anlagerung eines biotinylierten Anti-Avidin Antikörpers und einer zweiten Schicht Fluorochrom-markiertem Avidin erreicht wird. Die Gegenfärbung der Chromosomen erfolgt mit Propidiumiodid (rot) oder DAPI (blau). Die Ergebnisse können dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes ausgewertet und direkt mit einer Kamera dokumentiert werden.

Die FISH läßt sich in folgende Schritte unterteilen:

1. Vorbehandlung der Chromosomenpräparate
2. Herstellung der Sonden-DNA
3. Denaturierung der Ziel- und Sonden-DNA
4. Renaturierung, d.h. eigentliche in situ Hybridisierung
5. Stringenzwaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen
6. Detektion der hybridisierten Sonde durch Immunfluoreszenz

### **2.7.2. Objektträgervorbehandlung**

In einer enzymatischen Behandlung der Metaphasepräparate wird zelluläre RNA entfernt, um Hintergrundsignale, die bei DNA-RNA-Hybridisierung entstehen können, zu verhindern. Zusätzlich wird mit Hilfe eines Verdaus von zellulären Proteinen durch Proteinase K eine bessere Permeabilität des Zellkerns erreicht, damit die Chromosomen für die Sonde leichter zugänglich werden.

*Material*

RNase-Stammlösung (100 µl/ml H<sub>2</sub>Odd)  
 Pepsin A  
 MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O  
 Formaldehyd (mind. 35%)  
 HCl (1N)  
 aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%)  
 Glasküvetten

5x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung):

750mM NaCl  
 15mM KCl  
 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 7.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH7,4

20x SSC

3M NaCl  
 300mM Na-Citrat  
 pH 7,4

*Durchführung:*

1. OT auf geeignete Metaphasen am Phasenkontrastmikroskop durchsuchen und Zielregion der Hybridisierung auf der Rückseite mit einem Diamantstift markieren.
2. OT 5min bei 37°C in 2x SSC waschen.
3. 100µl RNaselösung auf OT auftragen, mit einem Deckglas abdecken und 1h bei 37°C inkubieren.
4. OT 5 min. in 2x SSC, dann 5min. in 1x PBS bei jeweils 37°C waschen.
5. OT 8 min. in einer auf 37°C vorgewärmte Pepsin/ HCl - lösung (10mg Pepsin / 100ml 0.01N HCl, pH2.0) inkubieren.
6. OT 5min bei RT in 1x PBS waschen.
7. OT 10 min bei RT in einer 1% Formaldehyd/ 1x PBS/ 50mM MgCl<sub>2</sub> -Lösung nachfixieren.
8. 3x 5 min bei RT in 1x PBS waschen.
9. Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100% EtOH), jeweils 5 min.
10. OT lufttrocknen lassen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahren.

**2.7.3. Markierung der FISH-Proben mittels DOP-PCR**

Mithilfe der DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR) kann DNA unspezifisch amplifiziert werden. Die DOP-Primer enthalten dafür innerhalb ihrer Sequenz 6 variable Nukleotide, die ubiquitäres Anlagern der Primer an die Template-DNA erlauben.

Hier werden mithilfe der DOP-PCR Biotin-gekoppelte Nukleotide in verschiedene BAC-DNAs eingebaut.

DOP-Primer (6MW): 5' CCGACTCGANNNNNNATGTGG 3'

#### PCR-Ansatz

1,0 µl	40ng BAC-DNA
2,0 µl	10 x PCR-Puffer (AGS)
2,0 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
2,0 µl	2 mM dTTP
2,0 µl	2 mM dCTP
2,0 µl	2 mM dGTP
1,0 µl	2 mM dATP
5,0 µl	0,4 mM Bio-14-dATP
2,0 µl	20 µM DOP-Primer
0,5 µl	Taq-Polymerase (5U/µl; AGS)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

#### PCR-Bedingungen

1 Zyklus	5 min	94°C	Erstdenaturierung
8 Zyklen	1 min	40°C	Annealing
	4 min	72°C	Extension
	1 min	94°C	Denaturierung
20 Zyklen	1 min	56°C	Annealing
	2 min	72°C	Extension
	1 min	94°C	Denaturierung
1 Zyklus	1 min	56 °C	abschließendes Annealing
1 Zyklus	5 min	72 °C	abschließende Extension
1 Zyklus	∞	4 °C	

1% iges Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Produkte.

#### DNase Verdau

*Verdünnungspuffer* (f. DNase): 50% Glycerin  
 25 mM Tris  
 1 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,01 U/µl DNase

1µl verdünnte DNase pro Ansatz zugeben.

1 min 37°C  
 3 min 95°C  
 ∞ 4°C

1% iges Agarosegel zur Überprüfung der Fragmentgröße (Optimum zw. 200 und 500 bp).

#### Fällung der Proben mit Cot1-DNA

PCR-Ansatz

+

10µg Cot1

25 µg Heringsperma-DNA

25µg t-RNA

0,1 Vol 3M NaAc

2,5 Vol EthOH abs

ü.N. bei -20°C

DNA-Pellet in 50% Hybridisierungs-Mix aufnehmen.

#### **2.7.4. Dot-Blot-Analyse**

Mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse wurde der Einbau der Biotin-gekoppelten Nukleotide in die DNA-Sonden überprüft. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der markierten Sonde angesetzt und auf eine Nylonmembran aufgebracht. Der Einsatz von enzymkonjugiertem (alkalische Phosphatase) Streptavidin, das sehr hohe Affinität für Biotin hat, macht eine Farbreaktion möglich, bei der die alkalische Phosphatase (AP) die Substrate BCIP und NBT zu einem violetten Präzipitat umsetzt. Die Markierungseffizienz konnte im Vergleich mit einer Biotin-markierten Kontroll-DNA nach der Intensität des Farbkomplexes beurteilt werden (Schneider und Müller, 1988). Alle Proben wurden vor der Hybridisierung mit Hilfe des Dot Blots überprüft.

##### *Material:*

Puffer 1: 0.1 M TrisHCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5

Puffer 2: 3% BSA/Puffer 1

Puffer 3: 0.1 M TrisHCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

##### *Antikörperlösung:*

Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1 mg/ml, 1:1000 verd.) bzw. Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (0.75 mg/ml, 1:5000) in Puffer 2 verdünnen

##### *NBT/BCIP:*

27 µl NBT (Nitroblue tetrazolium, 75 mg/ml) und 21 µl BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 50 mg/ml) in 5 ml Puffer 3

*Verdünnungsreihen*

- a) Kontroll-DNA, Biotin-markiert, Konzentration: 200 pg/μl
  - b) Kontroll-DNA, DIG-markiert, Konzentration: 5 μg/μl
  - c) Proben-DNA, Biotin-markiert, Konzentration: ca. 20 ng/μl
  - d) Proben-DNA, DIG-markiert, Konzentration: ca. 20 ng/μl
- Verdünnen auf: 400 pg, 200 pg, 100 pg, 50 pg

1. Je 2 μl der Verdünnungsreihen auf die Membran auftragen, Membran crosslinken
2. 15 Minuten in Puffer 2, RT
3. 15 Minuten mit Antikörperlösung bei RT inkubieren
4. 5 x 3 Minuten mit ca. 100 ml Puffer 1 waschen
5. 5 Minuten mit Puffer 3 bei RT equilibrieren
6. Membran mit 5 ml NBT/BCIP-Puffer 3 im Falcon und lichtgeschützt färben

**2.7.5. Denaturierung der Ziel-DNA***Material:*

auf OT fixierte und vorbehandelte Chromosomen  
aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%)  
Deckgläser (24x60 mm)  
Heizplatte

Denaturierungslösung:  
70% Formamid  
2x SSC

*Durchführung:*

1. 100μl der Denaturierungslösung auf den OT geben, mit Deckglas abdecken und 2,5 min. bei 80°C auf der Heizplatte denaturieren.
2. Deckglas abrutschen lassen und OT 5 min. in kaltem 70%igem EtOH waschen.
3. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) je 5 min. dehydrieren und lufttrocknen lassen.

**2.7.6. Denaturierung und Prähybridisierung der Sonden-DNA**

Da die verwendeten Rekombinanten aus einer genomischen Bibliothek stammen, liegen in den klonierten DNA-Fragmenten neben den single-copy- auch repetitive Sequenzen vor. Diese stören die eigentliche Hybridisierung, da sie die Repeats auf den Chromosomen detektieren und so unerwünschte Zusatzsignale ergeben. Deshalb ist es notwendig diese Repeats in einer Prähybridisierungsreaktion (Preannealing) zu blockieren. Inkubiert man die Sonden-DNA vor der Hybridisierung für einige Stunden mit Cot1-DNA, hat sie

die Möglichkeit, in dieser Zeit die Repeats abzufangen und verhindert so, daß sich markierte repetitive Sequenzen später an die Chromosomen binden können.

*Material:*

Ethanol, absolut  
Cot-1 DNA (1µg/µl)  
20x SSC  
Dextransulfat

Formamid deionisiert:

50 ml Formamid mit ca. 5g Ionenaustauscher (AG 501-X8(D), 20-50 mesh, Bio-Rad) mischen und 1 h bei RT rühren lassen. Durch einen Whatman-Filter filtrieren und in Aliquots abfüllen. Aufbewahrung bei -20 °C.

Na-Phosphat-Puffer:

500 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit 500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7,2 einstellen, autoklavieren.

50 % Hybridisierungs-Mix:

50% FA  
20% DxSO<sub>4</sub>  
2x SSC  
50mM Na-Phosphat-Puffer

*Durchführung*

1. 4 µl Sonde (80ng) und 4µl Cot1-DNA (4µg; 50x) auf 30µl mit H<sub>2</sub>O dd auffüllen und 2 ½ Vol EtOH abs. und 1/10 Vol 3M NaAc (pH 4,5) ü.N. bei -20°C fällen.
2. 30 min bei 4°C bei 14000rpm zentrifugieren.
3. Pellet in 500 µl 70% igem Ethanol waschen und 30 min. bei 4°C und 14000 rpm zentrifugieren.
4. Ethanol abnehmen und Pellet 5 min. im Vakuum trocknen.
5. Pellet in 10µl 50% Hybridisierungs-Mix resuspendieren (8 ng Sonde/µl).
6. Sonde in einem Wasserbad bei 90°C für 5 min. denaturieren.
7. Kurz abzentrifugieren und 4-5h bei 37°C preannealen.

### **2.7.7. Hybridisierung**

**Material**

Deckgläser (20x20 mm)  
Fixogum  
Metallbox  
in 50% Hyb-Mix gelöste, denaturierte und preannealte Sonde  
vorbehandelte und denaturierte Chromosomenpräparate

*Durchführung*

1. 10 µl der Hybridisierungslösung auftragen, mit einem Deckglas abdecken und mit Fixogum verschließen.
2. In einer feuchten Kammer ü.N. bei 37°C hybridisieren.

**2.7.8. Stringenzwaschen**

Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, werden die Präparate nach der Hybridisierung unter bestimmten Stringenzbedingungen gewaschen. Wieviele Fehler bei der Basenpaarung zwischen Ziel- und Proben-DNA toleriert werden sollen, d.h. welcher Homologiegrad der Hybride detektiert werden soll, kann man durch Veränderung der Salzkonzentration und der Temperatur der Waschlösungen relativ genau einstellen. Beim Nachweis von sigle-copy-Sequenzen wird mit hoher Stringenz, d.h. mit niedrigem Salzgehalt und hoher Temperatur, gewaschen. Dabei werden alle Sonden herausgelöst, die keine hohe Übereinstimmung mit der Zielsequenz aufweisen. So lassen sich unspezifische Zusatzsignale weitestgehend verhindern.

*Material:*Waschlösung1:

50% Formamid  
2x SSC

Waschlösung2:

0,1x SSC

BT-Puffer:

0,15 M NaHCO<sub>3</sub>  
0,6 mM Na<sub>3</sub>Citrat  
0,1% Tween 20  
pH 8,0

*Durchführung*

1. Fixogum mit einer Pinzette entfernen und Deckgläser in einer 50% Formamid / 2x SSC-Lösung kurz abspülen.
2. 3x5 min bei 46°C in 50% Formamid / 2x SSC waschen.
3. 3x5 min bei 60°C in 0.1x SSC waschen.
4. 5 min in BT-Puffer waschen.

### 2.7.9. Detektion

Um die hybridisierten Sequenzen sichtbar zu machen, wurde ein Fluorescein-isothiocyanat-markiertes Avidinderivat (ExtrAvidin-FITC) eingesetzt, das eine sehr hohe Bindungsaffinität zu dem in die Sonde eingebauten Biotin besitzt. Eine Verstärkung des Signals wurde mit Hilfe eines biotinylierten Anti-Avidin D-Antikörpers und darauf aufbauend einer zweiten Schicht ExtrAvidin-FITC erreicht.

Für die Hintergrundfärbung der Chromosomen wurde eine Mischung aus Propidiumiodid (rot) und DAPI (blau) verwendet. Um ein vorschnelles Ausbleichen der Präparate zu verhindern, wurden diese Farbstoffe zusammen mit Antifadelösung aufgetragen. Anschließend wurden die Metaphasen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und zur Dokumentation mit einer Kamera (Kappa) aufgenommen und der ISIS-Software (Meta Systems) ausgewertet.

#### *Material*

##### BT-Puffer:

0,15 M NaHCO<sub>3</sub>  
 0,6 mM Na<sub>3</sub>Citrat  
 0,1% Tween 20  
 pH 8,0

BSA ( 96-99% Rinderserumalbumin)

##### Antikörperlösung 1:

ExtrAvidin-FITC (1:330 in 3% BSA/BT-Puffer)

##### Antikörperlösung 2:

Bio-Anti-Avidin D-Antikörper (1:250 in 3% BSA/BT-Puffer)

Propidiumiodid (95-98%)

Propidiumiodid-Stammlösung: 100µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DAPI-Stammlösung: 100µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Antifade (Vectashield mounting medium for fluorescence)

##### Antifadelösung:

1.0µg Propidiumiodid/ml Antifade

0.4µg DAPI/ml Antifade

---

*Durchführung**Blockieren unspezifischer Bindungsstellen*

1. 100µl einer 3% igen BSA/ BT-Lösung auftragen, mit einem Deckglas abdecken und 10 min bei RT inkubieren.
2. Deckglas entfernen und OT 5 min. bei 42°C in BT- Puffer waschen.

*Detektion der Biotin-markierten Sonde*

1. 100µl Antikörperlösung 1 auf OT geben, mit einem Deckglas abdecken und 1h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
2. Deckglas abrutschen lassen und OT 3x5 min. bei 42°C in BT-Puffer waschen.
3. 100µl Antikörperlösung 2 auf OT geben, mit einem Deckglas abdecken und 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
4. Deckglas abrutschen lassen und OT 3x5 min. bei 42°C in BT-Puffer waschen.
5. 100µl Antikörperlösung 1 auf OT geben, mit einem Deckglas abdecken und 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
6. Deckglas abrutschen lassen und OT 3x5 min. bei 42°C in BT-Puffer waschen.
7. 20µl einer Propidiumiodid/ DAPI/ Antifadelösung auftragen und Deckglas auflegen.
8. überschüssige Antifadelösung im Filterblock entfernen.
9. Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop analysieren und mit einer Kamera dokumentieren.

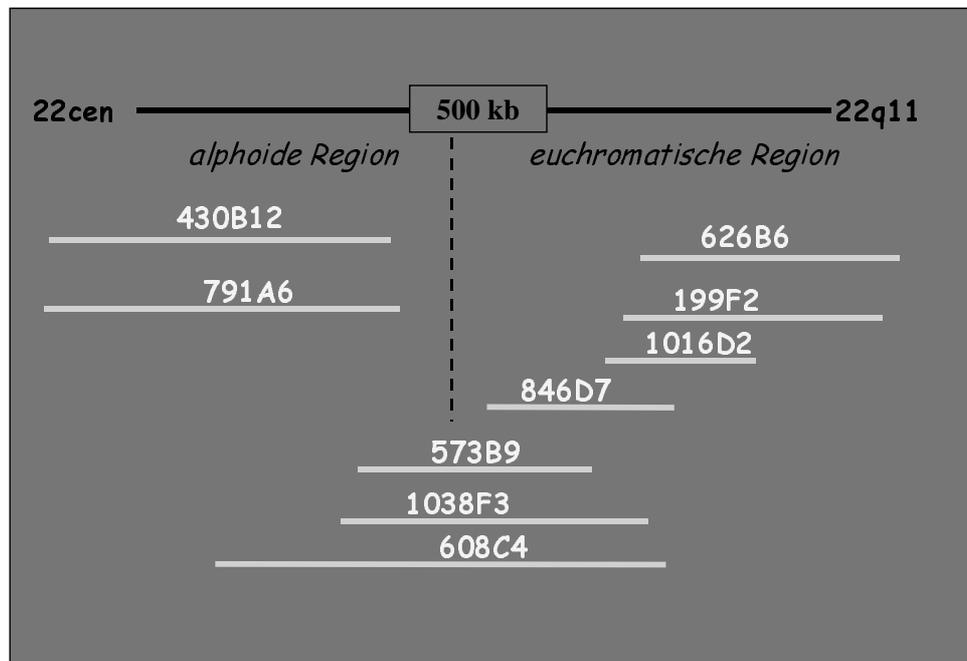
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. BAC-Contig-Erstellung

##### 3.1.1. Southernblot-Analyse

Eine humane BAC-Bibliothek wurde mit fünf Cosmiden aus der proximalen Region von 22q11 durchsucht: N29H9, N114C4, N65D4, N89E2 und N38F3 (cen-22q11) (Dissertation H. Schmitt, 1996). Diese Cosmide waren von Xie et al. (1994) in einem Contig angeordnet worden, der die pericentrische Region des Chromosom 22 abdeckte. Insgesamt konnten 58 BACs für diese Sonden identifiziert werden.

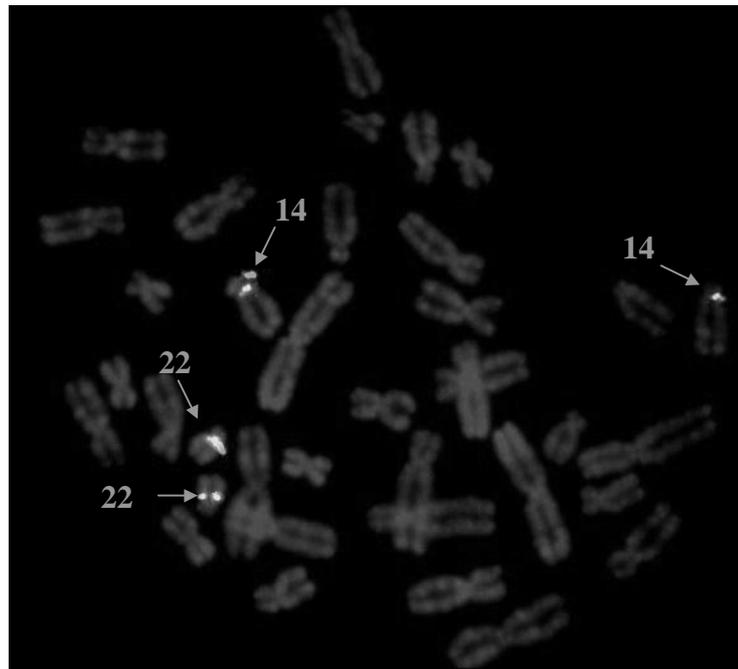
Diese 58 BACs wurden in der vorliegenden Arbeit den einzelnen Cosmiden individuell zugeordnet. Identische und falsch positive Klone wurden aussortiert. Mithilfe umfangreicher Southernblot-Analysen wurde ein Contig aus 9 BAC-Rekombinanten (Cen BACs) erstellt, der einen Bereich von etwa 500 kb umspannt. Durch Zuordnung der BACs zu den lokalisierten Cosmiden konnte die Orientierung des Contigs festgelegt werden. Zusätzlich wurde der Contig mit der alphoiden Sonde D22Z2 hybridisiert. 5 Klone zeigten positive Banden für das 22-spezifische Repeat, was die Lokalisation des Contigs in den Hetero-Euchromatin-Übergangsbereich bestätigte (Abb. 3.1.1.).



**Abb. 3.1.1.:** "CenBAC-Contig", der einen 500 kb großen pericentrischen Bereich auf Chromosom 22 überspannt.

### 3.1.2. FISH-Experimente

Die BACs 1016D2, 199F2 und 626B6 wurden mithilfe der DOP-PCR Biotin markiert und zur Rückbestätigung auf Normalmetaphasen hybridisiert. Alle drei Klone zeigten Signale im Centromer von Chromosom 22 und ein zweites Paar im Centromer von Chromosom 14 (Abb.3.1.2.). Diese zusätzlichen Signale auf Chromosom 14 sind nicht weiter ungewöhnlich, da die Centromere von 22 und 14 eine enge Verwandtschaft aufweisen.



**Abb.3.1.2.:** Ergebnis eines FISH-Experiments mit der BAC-Sonde 626B6. Signale wurden im Centromer von Chromosom 22 detektiert, sowie im Centromer von Chromosom 14.

### 3.2. Exon Trapping

Der im vorigen Abschnitt beschriebene Contig liegt in einer bisher wenig charakterisierten Region, ist aber in klinischer Hinsicht durchaus relevant, da es in pericentrischen Bereichen immer wieder zu Instabilitäten und chromosomalen Rearrangements kommt. Aus diesem Grund wurden ausgewählte Contig-Rekombinanten (CenBACs) in Exon-Trapping-Experimenten eingesetzt, um putative Gene in dieser Region zu identifizieren.

Zusätzlich wurden 4 BACs aus telomeren Hetero-Euchromatin-Übergangsbereichen (TeloBACs) nach exprimierten Sequenzen durchsucht. Da die Anzahl an Genen zum Zeitpunkt der Versuche (1997) im distalen Bereich von Chromosom 22 noch wesentlich geringer war, als in den genauer charakterisierten Regionen 22q11 und 22q12, wurden außerdem 10 BACs aus dem Bereich 22q13 analysiert. Insgesamt konnten für die 16 eingesetzten BACs 20 Exon-Kandidaten identifiziert werden.

### 3.2.1. CenBACs

Um transkribierte Sequenzen in dem erstellten Contig (Abb.3.1.1.) zu identifizieren, wurden mit den BACs 199F2 und 608C4 Exon-Trapping-Experimente durchgeführt.

Die Rekombinanten wurden nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* in die Spleißvektoren pSPL3 und pTAG4 subkloniert und die Sammlung der entstandenen Subklone mit Elektroporation in COS7-Zellen transfiziert. Die RNA wurde aus den Zellen isoliert und in die stabilere Form der cDNA umgeschrieben. Die Trennung der rekombinanten cDNAs von den zelleigenen Transkripten erfolgte mithilfe von vektorspezifischen Primern (primäre und sekundäre PCR). Die PCR-Produkte konnten dann mit der Uracil-DNA-Glykosylase in die Vektoren pAmp1 und pAmp10 subkloniert werden. Für jeden eingesetzten BAC wurden durch Kolonie-PCRs 10-20 Einzelkolonien nach Exon-Kandidaten durchsucht. Aus den ausgewählten Subklonen wurde Plasmid-DNA für die Sequenzierung isoliert.

Aufgrund der Ergebnisse des 3'Exon-Trappings wurden 5 Kandidaten für den BAC 199F2 sequenziert. Für den BAC 608C4 konnten leider keine vielversprechenden Sequenzen isoliert werden. Das interne Exon-Trapping resultierte in je einem Kandidaten für 199F2 und 608C4. Die flankierenden Vektorsequenzen wurden mithilfe eines Computerprogramms (Assembly-Lign, Kodak) identifiziert und daraufhin eliminiert. Die so ermittelten Sequenzen wurden mit öffentlichen Datenbanken über das Internet abgeglichen (BlastN, NCBI). Die Ergebnisse der Homologie-Suche sind in Tabelle 3.2.1. dargestellt.

BAC	Exon-Klon	Sequenz-Homologien	Übereinstimmung [%]
3'Exon-Trapping			
199F2	22	pUC-Vektor	100
	24	H.sapiens gene for casein kinase II ; ALU-Sequenzen	100
	26	pTAG4-Vektor Sequenz ;	100
	29	keine relevante Homologie	
	30	ORF, keine relevante Homologie	
internes Exon-Trapping			
199F2	27	Spleißakzeptorstelle SA <sub>v</sub> nicht bestimmbar	
608C4	61	keine relevante Homologie	

**Tabelle 3.2.1.:** Homologie-Abgleich der centromeren Exon-Kandidaten-Sequenzen

Da die Sequenzanalysen für 199F2-30 (199-30) und 608C4-61 (608-61) keine relevanten Homologien ergaben, schienen sie vielversprechende Kandidaten für neue Gene zu sein. Deshalb wurden diese zwei Klone in folgenden Experimenten genauer analysiert. 199F2-29 sah ebenfalls vielversprechend aus, doch ein Sequenzvergleich von 199-29 und 199-30 ergab, daß die beiden Sequenzen fast identisch sind. Da innerhalb von 199-30 ein offener Leserahmen identifiziert werden konnte, wurde dieser in nachfolgenden Experimenten eingesetzt. Das 3'Exon 199-30 hat eine Größe von 327 bp und das interne Exon 608-61 ist 171 bp groß.

### 3.2.2. TeloBACs

Zusätzlich wurden BAC-Rekombinanten untersucht, die zwar nicht Chromosom 22-spezifisch sind, aber andere Hetero-Euchromatin-Übergangsbereiche repräsentieren. Es handelte sich um ein Set aus 4 Klonen, die als sogenannte TeloBACs bezeichnet werden, da sie telomere und subtelomere Repeat-Sequenzen enthalten: 32C8, 142B11, 247D9, 571G2 (H.Schmitt, Dissertation, 1996). Da in solchen Bereichen eine hohe Gendichte erwartet wird (Saccone *et al.*, 1992), wurden diese BACs auf transkribierte Sequenzen hin gescreent.

Internes und 3'Exon-Trapping wurden wie unter 3.2.1. beschrieben durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die erhaltenen Exon-Kandidaten und die Ergebnisse eines DNA-Datenbankabgleichs zusammengefaßt (Tabelle 3.2.1.). Keiner der erhaltenen Exon-Klone wies Homologien zu ESTs, cDNAs oder bekannten Genen auf. Klon 142-13 ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit Sequenzen des pTAG4-Vektors, einem der eingesetzten Spleißvektoren.

BAC	Exon-Klon	Sequenz-Homologien	Übereinstimmung [%]
internes Exon-Trapping			
32C8	3	keine relevanten Homologien	
142B11	14	keine relevanten Homologien	
	15	keine relevanten Homologien	
	17	keine relevanten Homologien	
571G2	54	keine relevanten Homologien	
3'Exon-Trapping			
32C8	9	keine relevante Homologie	
142B11	13	pTAG4-Vektor Sequenz	100
247D9	35	Sequenz ist etwa 208 bp vom 3' Ende her identisch zu 3BAC247-36	100
	36	keine relevanten Homologien	

**Tabelle 3.2.2.:** Homologie-Abgleich der telomeren Exon-Kandidaten-Sequenzen

Aufgrund der Datenfülle konnten in der vorliegenden Arbeit nicht alle Exon-Kandidaten bearbeitet werden. Die ausführliche Charakterisierung der telomeren Exons wurde in den Diplomarbeiten von M. Küffner (Charakterisierung humaner subtelomerer Sequenzen aus einer BAC-Bibliothek, 1998) und A. Schiemann (Exprimierte Sequenzen in subtelomeren Abschnitten humaner Chromosomen, 1998) vorgenommen und kann dort nachgelesen werden.

### 3.2.3. 22q13 BACs

Um nach transkribierten Sequenzen in der bisher relativ Gen-armen chromosomalen Region 22q13 zu suchen, wurden folgende BAC-Rekombinanten ausgewählt (Tabelle 3.2.3.1.)

BAC	Marker
585A10	<i>CYP2D6</i>
358H9	D22S94
1031C7	N37F4
801E10	D22S22
104F1	D22S22
426B6	D22S22
299D3	D22S45
115C9	D22S23
276D9	D22S55
384D8	ARSA

**Tabelle 3.2.3.1.:** Liste der 22q13-spezifischen BACs, die in Exon-Trapping-Experimenten eingesetzt wurden. *CYP2D6*: Cytochrom P450, Subfamilie IID, Polypeptid 6; ARSA: Arylsulfatase A

Internes und 3'Exon-Trapping, wie unter 2.2. und 2.3. beschrieben, wurden für alle 10 BAC-Rekombinanten durchgeführt. Es wurden 38 Kandidatenklone isoliert und sequenziert. Nach Überprüfung auf Vektoranteile und repetitive Sequenzen blieben 7 interessante Klone übrig. Homologie-Abgleiche sind in Tabelle 3.2.3.2. dargestellt. Für die Klone 384-42 und 585-78 wurden 100%ige Übereinstimmungen mit bereits bekannten Genen der Region 22q13 gefunden (*ARSA* und RNA-Polymerase II). 426-37 ist homolog zu einem EST auf 22q12-qter und 426-51 sowie 104-5 zeigten Übereinstimmungen mit zwei Cosmiden der Region 22q12. Für die Kandidaten 299-39 und 426-60 wurden in der Gendatenbank keine verwandten Sequenzen gefunden.

Da der lange Arm von Chromosom 22 bis auf wenige Lücken im Laufe der Arbeit komplett sequenziert wurde (Dunham *et al.*, 1999), wurden nach Veröffentlichung dieser Daten erneut Homologie-Abgleiche vorgenommen. Die drei Exon-Kandidaten des BACs 426B6 zeigten jetzt Übereinstimmungen mit einem neuen Gen auf 22q13.3 und 299-39 entsprach einem Teil des BAC-Klons 299D3. Zwei Sequenzen sind nach wie vor unbekannt. Aus Zeitgründen wurden diese Klone bisher noch nicht näher charakterisiert.

BAC	Exon-Klon	Sequenz-Homologien (Januar 1998)	Sequenz-Homologien (Februar 2000)	Übereinstimmung [%]
internes Exon-Trapping				
426B6	37	EST AA316755 auf 22q12-ter	humanes Gen auf 22q13.31-13.33; ähnelt dem Hefe-Gen YOR070C; putativer GTPase-Aktivator	100
104F1	5	humanes Cosmid N65D1 (22q12)	humanes Cosmid N65D1 (22q12)	100
299D3	39	keine relevante Homologie	humaner BAC-Klon 299D3	100
3'Exon-Trapping				
426B6	51	humanes Cosmid N87F1 (chr22)	humane DNA-Sequenz von Klon RP3-477J10 auf 22q13.31-13.33; enthält 3'Ende eines Gens für ein neues Protein, da dem Hefe-Gen YOR070C ähnelt	100
426B6	60	keine relevante Homologie	s. 426B6-51	100
384D8	42	Arylsulfatase A ( <i>ARSA</i> ); humane BAC-Sequenz 384D8	Arylsulfatase A ( <i>ARSA</i> ); humane BAC-Sequenz 384D8	
585A10	78	H.sapiens Gen RNA Polymerase II	H.sapiens Gen RNA Polymerase II	100

**Tabelle 3.2.3.2.:** Homologie-Abgleich für die 22q13-spezifischen Exon-Kandidaten-Sequenzen

### 3.3. Charakterisierung der centromeren Exon-Kandidaten

Um eine genauere Charakterisierung der centromeren Exon-Klone zu unternehmen, wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Rückbestätigung der Kandidaten 199-30 und 608-61 auf ihre Ausgangs-BACs
2. Southernhybridisierung auf den gesamten Contig
3. Bestimmung der evolutionären Konservierung (Zoo-PCR)
4. Bestimmung der Expressionsmuster mithilfe von RT-PCR-Experimenten

Die Ergebnisse der Punkte 3. und 4. möchte ich in der vorliegenden Arbeit nur tabellarisch zusammen fassen, da sie in der Dissertation von S. Salemi (1999) detailliert ausgeführt wurden.

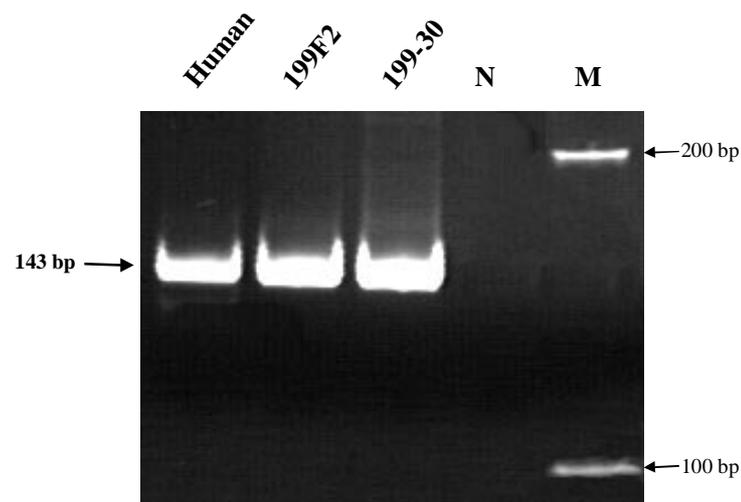
#### *Primer*

Mit dem Programm Primer 0.5 (Whithead Institute for Biomedical Research) wurden für die Exon-Kandidaten 199-30 und 608-61 spezifische Primer erstellt.

<b>Exon-Kandidat</b>	<b>Primer</b>	<b>Produktgröße</b>
199-30	for ATGTCAAGCAGAAATAGGGAGC rev ACCCCATACCTGCTCTCATG	143 bp
608-61	for GTTGCCAGCTTCATTAAGC rev TGTGCAAGTAGAAGTCTCAGCC	110 bp

#### 3.3.1. Rückbestätigung der Exonklone auf ihre Ursprungs-BACs

Um die Herkunft der Exon-Kandidaten 199-30 und 608-61 zu bestätigen, wurden sie auf ihre Ursprungsklone 199F2 und 608C4 sowie auf genomische Human-DNA rückhybridisiert. Beide Kandidaten zeigten sowohl positive Signale in ihren entsprechenden BACs als auch in Human-DNA. Als Positivkontrolle wurden 20 ng des jeweiligen Exon-Klons eingesetzt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse in PCR-Experimenten mit Exon-spezifischen Primern (s. 3.3.) verifiziert. Abb. 3.3.1 zeigt die Ergebnisse der PCR mit den spezifischen Primern für 199-30.

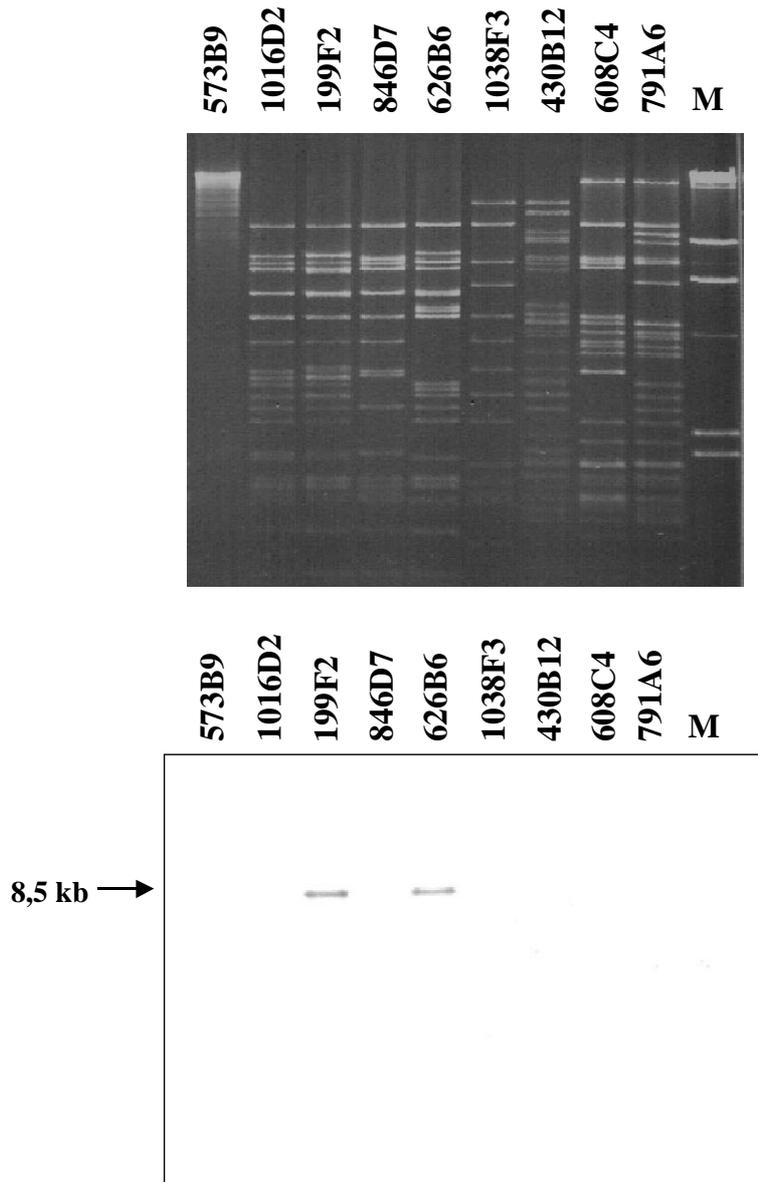


**Abb. 3.3.1.:** PCR mit den Primern 199-30 for und rev an gesamt genomische Human-DNA, an BAC 199F2 und als Positivkontrolle an dem Exonklon 199-30. M: Marker (100 bp-ladder, MBI); N: Negativkontrolle.

### 3.3.2. Lokalisation der Exon-Klone auf den Contig

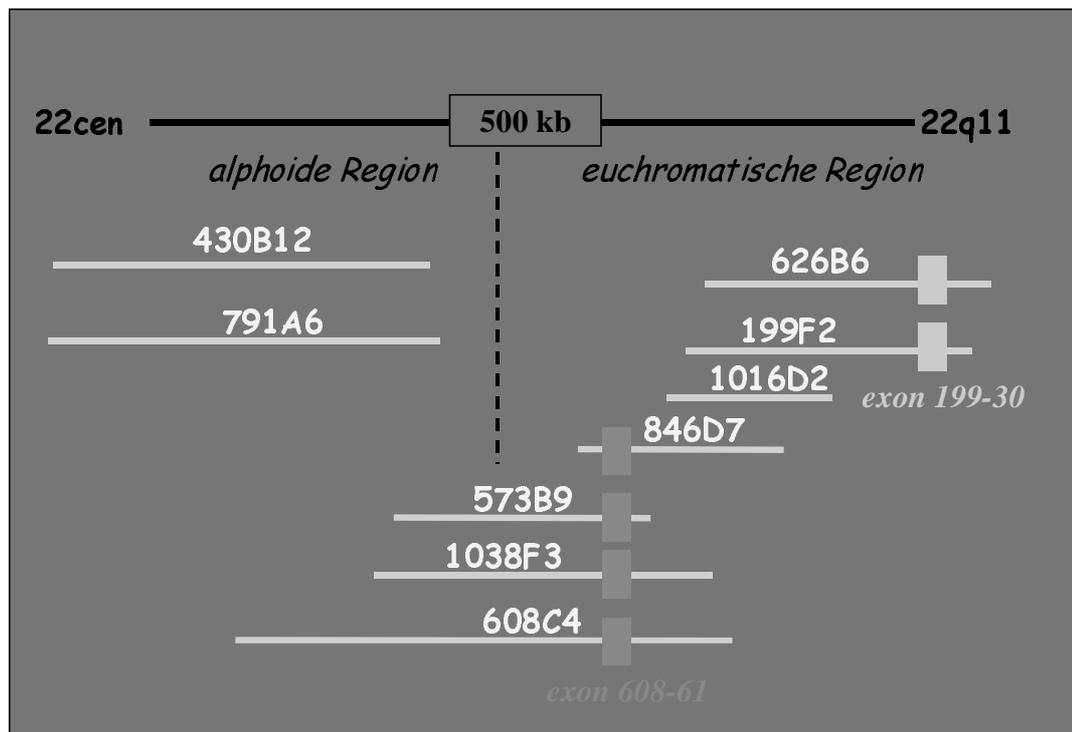
Um die Lokalisation der Exons auf dem gesamten Contig zu erfassen, wurden PCR-Reaktionen mit den Exon-spezifischen Primern für 199-30 und 608-61 für alle BACs des Contigs durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß 199-30 neben der 143 bp großen Bande in BAC 199F2 dieselbe Bande in BAC 626B6 zeigte. 608-61 konnte als 110 bp große Bande sowohl in dem Ursprungs-BAC 608C4 als auch in 846D7, 573B9 und 1038F3 detektiert werden.

Die PCR-Ergebnisse wurde bestätigt, indem Inserts der Exon-Klone 199-30 und 608-61 radioaktiv markiert und nacheinander auf einen Southern-Filter mit allen BAC-Rekombinanten des Contigs hybridisiert wurden. Dabei stellte sich heraus, daß 199-30 auf den BACs 199F2 und 626B6 die gleiche 8,5 kb große Bande zeigte (Abb. 3.2.2.1.).



**Abb.3.3.2.1.:** Detektion des Exons 199-30 als 8,5 kb große Bande auf den BACs 199F2 und 626B6. Oben ist das Gelbild des Restriktionsverdaus der Contig-BACs zu sehen. Unten ist das entsprechende Autoradiogramm nach Hybridisierung mit dem Insert des Exon-Klons 199-30 dargestellt. M: KB-Marker (Gibco)

Exon 608-61 wurde als 4 kb große Bande auf den BACs 608C4, 846D7, 573B9 und detektiert. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse dieses Abschnitts graphisch zusammengefaßt (Abb. 3.3.2.2.).



**Abb.3.3.2.2.:** BAC-Contig, der den Übergang zwischen Hetero-und Euchromatin auf Chromosom 22 überspannt mit Lokalisation der neuen Exon-Kandidaten.

### 3.3.3. Bestimmung der evolutionären Konservierung

Um die evolutionäre Konservierung der beiden Exons zu untersuchen, wurden an genomischer DNA verschiedener Spezies PCR-Reaktionen vorgenommen, wie unter 2.5.2. beschrieben. Die Resultate sind in Tabelle 3.3.3. zusammengefaßt. Beide Exons konnten in allen getesteten Spezies nachgewiesen werden (Dissertation S. Salemi, 1999).

genomische DNA	199-30	608-61
humane Plazenta	++	++
Schimpanse	++	++
Maus	+	+
Ratte	+	+
Hase	+	+
Lamm	+	+

**Tabelle 3.3.3.:** Ergebnisse der Zoo-PCR-Analysen für Exon 199-30 und 608-61.

### 3.3.4. Bestimmung der Expressionsmuster

Um Aussagen über die Expressionsmuster der beiden Exons machen zu können, wurde RNA aus 14 verschiedenen menschlichen Geweben, sowie 8 humanen Karzinomzelllinien isoliert und in RT-Experimenten eingesetzt. Als interner Kontrollstandard wurden den Reaktionsansätzen Primer für das Haushaltsgen *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) zugesetzt, die ein Amplifikationsprodukt von 115 bp ergaben. Für den Nachweis des Exons 608-61 wurden als Standard Primer für das Gen  $\beta$ -*Aktin* verwendet, die ein 124 bp großes Produkt ergaben. Mit einer Ausnahme zeigten beide Exons Expression in allen getesteten Geweben und Zelllinien, allerdings in unterschiedlicher Stärke. Die Expression von 199-30 konnte nur in der Brustkarzinomzelllinie MCF7 nicht nachgewiesen werden. Die nachfolgende Tabelle faßt die Ergebnisse für beide Exons zusammen (Tabelle 3.3.4.; Dissertation S. Salemi, 1999)

Gewebe	199-30	608-61
<i>menschliches Gewebe</i>		
Schilddrüse	+	+/-
Antrum	++	+
Struma	+/-	+/-
Niere	+/-	+/-
Ovar	+	+/-
Colon	++	+
Milz	++	+
Haut	+	+
Muskel	+	+/-
Hoden	+/-	+/-
Plazenta	+	+
Pankreas	+/-	+/-
Duodenum	+/-	++
Mamma	+/-	+
<i>Karzinom-Zelllinien</i>		
An-3-Ca (Endometrium Adenokarzinom)	+/-	+
MKN 45 (Magen-Karzinom)	+	++
Panc-1 (Pankreas-Karzinom)	+/-	+
MCF7 (Brust-Karzinom)	-	+
GLC4 (kleinzelliges Lungenkarzinom)	++	+
U373 (Glioblastom)	+	+
HL-60 (Leukämie)	++	+
K562 (Chronisch Myeloische Leukämie)	++	+

**Tabelle 3.3.4.:** Ergebnisse der RT-PCR für Exon 199-30 und 608-61 in verschiedenen humanen Geweben und Karzinom-Zelllinien. ++: stark positiv, +: positiv, +/-: schwach positiv, -: negativ.

### **3.4. Charakterisierung der cDNA J1124 für Exon 199-30**

#### **3.4.1. Isolierung**

Nach Ermittlung der Expressionsmuster der Exon-Kandidaten 199-30 und 608-61 wurden die Klone an das Ressourcenzentrum nach Heidelberg geschickt, um mit ihnen cDNA-Bibliotheken nach entsprechenden cDNA-Klonen zu durchsuchen. Das Screening ergab einen positiven Kandidaten für das Exon 199-30. Der Klon J1124 stammt aus einer Milz-spezifischen cDNA-Bibliothek und hat die beachtliche Insertgröße von 8,5 kb. Für das Exon 608-61 konnte keine cDNA gefunden werden.

#### **3.4.2. Genome-Priming System (GPS<sup>TM</sup>-1)**

Der cDNA-Klon J1124, der für das Exon 199-30 isoliert wurde, zeigte eine Insertgröße von 8,5 kb. Die Sequenzierung des Insert erfolgte mithilfe des sogenannten Genome-Priming-Systems (GPS<sup>TM</sup>-1), das eine schnelle Analyse von großen DNA-Abschnitten ermöglicht. Dazu wurden Transposons (Transprimer<sup>TM</sup>-1) an unterschiedliche Stellen in die cDNA eingefügt, aus denen heraus mit spezifischen Primern in zwei Richtungen gelesen werden konnte (s.2.4.3.1). Insgesamt wurden mehr als 30 Klone isoliert, die das Transposon an unterschiedlichen Stellen innerhalb der cDNA zeigten, und für die Sequenzierung eingesetzt.

#### **3.4.3. Sequenzierung**

Die Sequenzierung der Klone erfolgte nach dem Cycle-Sequencing-Prinzip und wurde mit einem ABI 377 durchgeführt. 34 Klone wurden mit den Primern S und N (GPS-Priming System) sequenziert. Nicht alle Sequenzierungen lieferten zufriedenstellende Ergebnisse. Im Durchschnitt wurden pro Sequenzierung 150-250 bp exakt gelesen. Insgesamt konnten 20 Sequenzen ausgewertet werden. In Kooperation mit Bruce Roe an der University of Oklahoma wurden die ermittelten Basenabfolgen in Contigs aneinandergereiht. Die Überlappungen zwischen den einzelnen Sequenzen waren so groß, daß nur zwei Contigs erstellt werden konnten. Contig 1 zeigte eine Länge von 792 bp und Contig 2 eine Länge von 1213 bp. Insgesamt konnten 2005 bp des gesamten Inserts erfolgreich sequenziert werden. Aufgrund der Schwierigkeiten bei den eigenen

Experimenten wurde die Firma MWG mit Sequenzierungen der bisher nicht auswertbaren Klone beauftragt. Auch die Firma hatte Probleme, diese Klone zu sequenzieren und kam zu keinen weiteren Ergebnissen.

### J1124 Contig1

```

1   AAGATACTGTTTATTTTCTGATAGACTTCATAGCACTCCGTGGTACTGA
51  GATTTTCTAAAATTTAGAAAACAACGTTAGTAATTATGTTTGTCTACTAT
101 AATAATTATGTTTTTCTTCTTTTCACTTTTTCAGGTTTTCCATTAATATAAA
151 AAGTAAAATTTCTATACATTTCCATTTATTTTAAATCAAAGCAGTGTCAA
201 CAAATCTACATTACCTATAGAATATAAAGAGAAGTATGTGAAACTTTATA
251 AACATTTAAGTTATACTTTCCTGACAGACAACCCCATACCTGCTATCATG
301 TCATCTACAGCACTCATTTTCAGCAATACTTGTTC AATTAGTCCAGCTTC
351 TGTGCTAGTCTGTACATTCCGAACACTTTTTTCATAGAATGGCTGTAAACA
401 TGCTCCCTATTTCTGCTTGACATGTTACATCACAGTGCTCTAAAAGCTCT
451 GTCATGCATGTTATACTCTCAGCATCCTGGATAATAAAGTTCATCTCCAG
501 TTCAAATTTCTCTGCCAACCAACTGAAAGTAAACAGAAAGAAACAATAGTG
551 TTAACATGGGAGGTTACCGATAACAGTAGAATAAAATAATAACAACAATT
601 CAAAGCTACTACTCTAAAAAAGTTTCAAGGCTTTTTGGTATAAAATTATTT
651 GGACGCGTGGGTGGGCGATCCCTGGAGCGAAGGAGGGAGAAGAGCCCGCA
701 TTCACCAGTCCACCTATGGCAAGAGCCTAGCCATCATGACCGAGGCCAG
751 CTCTCACAAGCCGTCAATTGAGAACCCTGAGATGCTTCAAGTC

```

### J1124 Contig 2

```

1   CACTATAGAAGAGCTATGACGTCGCATGCACGCGTACGTAAGCTTGGATC
51  CTCTAGAGCGGCCGCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTATCATAACAATATA
101 AATAACATTTTATTATCAAACAATATAAATTTTTTCTTATCAATTTGCTATA
151 AATGTTTAATTTAGCCACCTTCTAGTGACACTTTTACTACATTATTAAT
201 AAAAAAGTACCCCCATTGAACTTANACCATACCAATACATTCCAGATGTG
251 AACAGTTAGTAGTGTGTTTGGTGGCTACTAGTTCTTCCTCAGTATAATATT
301 TAAAGTTTAATTTCTCTGTTAAAAAGCAAGACAGAGGTATTTTTCTGACA
351 TTTATTCTCTTTTCTCATATCCTTCCATCATCAAGCTCTTTTGAAGGGAA
401 ATACTAGAAATTACAAAAAGTGAAAAATTTTGTGTTATTAATATTATTAC
451 TGAGAAAAAGATAGGAGAATTAAGAAGCTTTATATAATAGCAATGTCAAA
501 ATATGAACTTCTATGGTACAATCACCTCACTGTCACTTTTACATTTTCAG
551 TGCTGATGAATTATGTACCAGTAAACGACTATGCATGTAATTTTGGCTCA
601 TTCTCTAAACTGCACTCCATAGAGTAGCAGGAAATTTACAAAAAAAAAAAA
651 AAAAAATTAAGAGCTTAAACTCAGATATAAGAATTGAAGGATCATATGAT
701 GTTCTATAAAAACGTGTACACATAAGTCTATATTAATAAATTCCTATTAAG
751 TAACTCTAGAATTTATAGAAATGCTACTATTAATATATCTGTATTAATAA
801 GATATTTTAAGAAATAGATGTCTGAATCTCATTTTTACCAAGTTAGCCA
851 TCAGTCCCCAATACAGGGGTGCTAAGTCATTATAAAAAAAGATATATGCC
901 ACCCTGAAGGTAATTAGATATGATTTTTAATATATTTTCTCAGAAAATCA
951 AATTTTTGAAAATATTTAAATTCAAAGCATTCTTTTTGCAATTTTGCATT
1001 CTTTTAACCCATTTTTCAATCCATTCTTTCTCATTTAATGTCTTGTTC
1051 TAAATTTTAAAAATAATTAATGCATAAGTCAAAATGTTTAAAGAGTATT
1101 CTCTGGTATCTGAACTACTTTGCAGGGATCAGATATAATACTGTGGGAGA
1151 GTAATATCAGAACTTTTATAATTATGAAAATGCTTTTATGTCAGAAGGAT
1201 ACTTAAGCTGGAT

```

### 3.4.3. Homologieanalyse

Zunächst wurden die beiden Basenfolgen auf repetitive Sequenzen durchsucht (Repeatmasker). Da beide Contigs keine Wiederholungssequenzen aufwiesen, konnten sie direkt in öffentlichen DNA-Datenbanken auf bekannte oder verwandte Sequenzen gescreent werden (BLASTN). Weder Contig 1 noch Contig 2 zeigten Homologien zu bereits bekannten Genen. Zu einem Cosmidklon aus der Cateye-Syndrom *critical region* (22q11.2) konnte jedoch für beide Contig-Sequenzen eine Übereinstimmung beobachtet werden. Contig 1 entspricht in 617 Basen am Stück der Sequenz des Cosmids mit einer Homologie von 95%. Contig 2 überspannt eine Sequenz von ca. 1000 Basen in einem anderen Abschnitt des Cosmids.

dbj|AP000523.1|AP000523 Homo sapiens genomic DNA, chromosome 22q11.2, Cat Eye Syndrome region, clone:c60H5;Length = 41306

*Lokalisation von Contig 1 (grün) und 2 (gelb) auf dem Cosmidklon C60H5*

```

35501 gtctagccatcagagttcttcaagaataaggaatgtaatctactccaaac
35551 ataatggctgaagatatagaaaatactctgtaggtggccaataaataatt
35601 tcaaagtagtcaaagaatttctaagtgcttgccatgaaaaaaaaagtacaca
35651 tacacacacatacacatgcatgcacacatacacactatttcaaagagtt
35701 aaaccctataactaacctttcagatttttagtggtgaagcaactatttcagg
35751 cagttttattatcatacaatataactagcattttattatcaacaagata
35801 gcttttcttatcaatttgctataaatgtttaatttagccaccttctagtg
35851 aacttttactacattattaacaaaaagtagccattgaacttaacata
35901 ctacaatacattcagatgtgaacagttagaagtggttggtggctactgg
35951 ttcttccttagtataaattttaagtttaatttctctgttaaaaagcaag
36001 acagaggtatttttctgacatttattctcttttctcatatccttccatca
36051 tcaagctcttttgaaaggaaataactagaaattacaaaaagtgaaaaattt
36101 tgtgttattaatattattactgagaaaaagataggagaatgaagaagctt
36151 tatataatggcaatgtcaaaatatgaacttctatggtacgatcaccctca
36201 ctgtcacttttacatttcagtggtgatgaattatgtactagtaaaactact
36251 atgcatgtaattttggctcattctctaaactgcactccatagagtagcag
36301 gcaatttccaaaaaaaaaaaaaaaaaattaagagcttaaaactcagatataaga
36351 attgaaggatcatatgatgttctataaaacatgtgtacacataagtctat
36401 attaataaattcctattaagtaactctagaatttatagaaatgctactat
36451 taatatactgtattaaaaaggatttttaagaaacagatgtgtgaatctc
36501 attttccaccaagtagccatcggcccccaatacaggggtgctaagtcat
36551 tataaaaaagataacttgccaccctgaaggtaattacgtatgatttttaa
36601 tatatttctcagaaaatcaaattttgggaaatatttaaatcaaagcat
36651 tctttttgcgattttgcattcttttaaccatttttccattcattctttc
36701 tcatttaatgtcttggttacataaattttaacataattaaatgctgaggt
36751 caaatgtttaagagtattctctggtatctgaactactttgcaggatcag
36801 atataatactgtggagagtaatatcagcacttttataattatgaaaatgc
36851 ttttatgtcagaagataacttaagctgaagattcatgggttacaaaaaata
36901 aacatttcaaactttaaacttattttctggaatgatacttgctctgaaat
36951 aatattcaaaacacttttccgaaatgcatctagccacacaggagaatgag
37001 catgcaaggaggttagaggggtcgggtggtgaaaaaattatagatttcaaagt

```

37051 tattgtttgaataaacccaacaagcaaaacattagtagtatttttatcttga  
37101 aattccttggatgaattttatgttctagcccataatatattagtttatttta  
37151 acacaaaagtttcttccaaaatggacatgtccaaaagatacaccatgctg  
37201 gcgacgggggtggcggcggcggcagcgagttcgggtgcgcgtagcgcacc  
37251 ggggtgggagcggagaccaggccgggagcagggcggccaccgcccagcgacat  
37301 ggggaacatggttggccgcccagctcgccgcccgcagggccggccacctccgc  
37351 cctcgccgcccgggcttcacgctgcccggcctgagaggcggcctgggcgcc  
37401 ggcaccccctaggagtgcaggttcggaacggacccccggggctgcaaccgc  
37451 cagcgccctcaggggcccggaggatggggcctgcccgtgctgcccacc  
37501 cgggcacattccaggagtgcaccggagggtgtaaggagctgtttcccatt  
37551 cagatggagggtgtcaagctcacagtcaacaaagggttgagtaaccgttt  
37601 ccagggtgaaccacacagtagccctcagcgcaatcggggagtcacactacc  
37651 acttcgggggtcacgtatgtggggacaaagcagctgagctccacagaggcg  
37701 ttccctgtactggtaggtgacatggacaacagcggcagctctccacgctca  
37751 ggtcattcaccagctgggccccggtctcagggtccaagatggccatccaga  
37801 cccagcagtcgaagtgtgtgaactggcaggtggacggggagtagtcggggc  
37851 tctgactcacagcagccgtcacccctggggaaaccagacgtcctcgtaggt  
37901 tcaagaattctcgaagcccactacctccagagcatcaggccttgccctggc  
37951 cctgggagcagagctggtctacaaccggcggcctggggagcaggggactg  
38001 tcatgtctctagctgggaaatacacattgaacaactggttggcaacgtta  
38051 acgttgagccaggcgggcatgcacgcaacatactaccacaaagccagtg  
38101 ccagttgcaggtgggtgtggattttcaggccagcacaaggatgcaggata  
38151 ccagcgtctccttcgggtaccagctggacctgcccaggccaacctcctc  
38201 ttcaaaggctctgtggatagcaactggatcgtgggtgcccagctggagaa  
38251 gaagctccagctcctgcccctgacgctggcccttggggccttcctgaatc  
38301 accgcaagaacaagttccagtggttttggactcaccatcggtgagcc  
38351 ctccctggcccccgcttccacgccccttccgattccacctccgcctccacc  
38401 tccccctgccacagaggggagacctgacccccctcccttccctccccct  
38451 caggggttgggggggacatcggaaaggagggacccccggccaccaccagcagc  
38501 tgaggaggggatctctggaaccgaatggtgcttcgggattctgagtagcag  
38551 gggcagtggtcccagtgggcatggggctccagggaggatccgggaattga  
38601 ggggcacgcaggattctgagcactaggggagaggcggccagacaacctc  
38651 agggaggagtgtcctggcgtccccatcctccaaaggcctaggcccggcc  
38701 cgagggggcagcgagaggagcttccccatccggggtcagtcaccacctgcc  
38751 ccgcccactttcccacctcctcggtataaatcaagtttataagttatgga  
38801 agaaccaggacatataacagaaaaaaaaaaaaaaaaaacaacaaaaatatacgt  
38851 gggaaaaaaaaaagatacaccatgcttatctaaggcttttagtacctcct  
38901 gtcatagttgcatatatgccagattgaggggacagaaactaggggaattt  
38951 gataaaatgctcattatacagaactgtaataacctattgtggcattttaat  
39001 tatgtaaaagcttaataaataactacataaaaagataactgtttatttttc  
39051 tgatagatttcatagcactccgtggtagtagatttttctaaaatttagaa  
39101 aacaacattagtaattatatttgttactatagtaagtataatttttctc  
39151 tttcactcttcagggttttccattaatataaaaagtaaaatttccatacat  
39201 ttccatttatttttaaatcaaagtagtgtaacaaatctacattacctata  
39251 gaatataaagagaagtagtgaaactttataaacttttaagttatacttc  
39301 cctaacaatcaaccaccatacctgctctcatgtcatctacagcactcattt  
39351 tcagcaatacttgtttaattagcccaacttctgtgctagtctgtacattc  
39401 caaacactttttcatagaatggctgtaaacatgctccctattttctgcttg  
39451 acatgttacatcacagtgctctaaaagctctgtcatgctgattatactct  
39501 cagcatcctggataatagagttcatctccagttcaaattctccaccaacc  
39551 agctgaaagtaaacagaaagaaacaatagtgtaacatgggagggttactg  
39601 ataacagtagaataaaaataaacaagagttcaaatctactactctaaaa  
39651 aagtttcaaggccttttgggtgtaaaattaacttttataaaaagtataagag  
39701 ctacagataaatgacaggcattgtaagcattgaaactagcgaacactgaa  
39751 ggcgtggcctgcccgtccacacctgtgggatatctcatcgggtgggatga  
39801 gagactgagaaaagaaataagacacagagacaaagcatagagaaacaaca  
39851 gtgggcccaggagaccagcactcagcataccaaggatctgcaccggcacc

Der Abgleich mit einer EST-Datenbank ergab für beide Contigs Homologien zu mehreren unbekanntem mRNAs bzw. cDNAs, die im folgenden tabellarisch zusammengefaßt sind (Tabelle 3.4.3.).

Datenbank-Adresse	Ergebnisse des Sequenzabgleichs	Identität
<i>J1124 Contig 1</i>		
gb AW382905.1 AW382905	Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	83/87 (95%)
IMAGE:2049066	3' similar to TR:Q19317 Q19317 HYPOTHETICAL PROTEIN F10F2.1; mRNA sequence [Homo sapiens]	517/519 (99%)
gb AA406301 AA406301	zv24b12.s1 Soares NhHMPu S1 Homo sapiens cDNA clone 754559 3' similar to TR:G1066935 G1066935 F10F2.1	488/488 (100%)
gb N45104 N45104	yz12d12.s1 Homo sapiens cDNA clone 282839 3'	429/440 (97%)
gb AI276139 AI276139	ql70c08.x1 Soares_NhHMPu_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1877678 3' similar to TR:Q19317 Q19317 HYPOTHETICAL PROTEIN F10F2.1; mRNA sequence [Homo sapiens]	366/366 (100%)
gb AI871567.1 AI871567	we02g12.x1 NCI_CGAP_Lu24 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2339974 3' similar to WP:F10F2.1 CE00946 WD DOMAIN, G-BETA REPEAT; mRNA sequence	363/363 (100%)
gb AI739520.1 AI739520	wi23a08.x1 NCI_CGAP_Co16 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2391062 3' similar to WP:F10F2.1 CE00946 WD DOMAIN, G-BETA REPEAT; mRNA sequence	362/363 (99%)
<i>J1124 Contig 2</i>		
gb AI744280.1 AI744280	tr08f08.x1 NCI_CGAP_Ov23 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2217735 3' mRNA sequence	126/127 (99%)
gb AW028009.1 AW028009	wv61b06.x1 NCI_CGAP_Gas4 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2534003 3' mRNA sequence	140/140 (100%)

**Tabelle 3.4.3.:** Sequenzhomologien von J1124 Contig 1 und Contig 2.

#### *Proteinabgleich und ORFs*

Abgleiche mit der Proteindatenbank SwissProt ergaben keine Homologien. Mithilfe eines ORF-Finders wurden die Sequenzen von Contig 1 und 2 nach offenen Leserahmen untersucht. In der Sequenz von Contig 1 wurden 3 ORFs, in Contig 2 vier ORFs abhängig vom Leserahmen gefunden.

*Contig 1:*

Rahmen -2; Länge 177 bp

557 atgttaacactattgtttctttctgtttactttcagttggttggc  
M L T L L F L S V Y F Q L V G  
512 agagaatttgaactggagatgaactttattatccaggatgctgag  
R E F E L E M N F I I Q D A E  
467 agtataacatgcatgacagagcttttagagcactgtgatgtaaca  
S I T C M T E L L E H C D V T  
422 tgtcaagcagaaaataggagcatgtttacagccattctaTga 381  
C Q A E I G S M F T A I L \*

Rahmen +1; Länge 123 bp

298 atgtcatctacagcactcattttcagcaataactgttcaattagt  
M S S T A L I F S N T C S I S  
343 ccagcttctgtgctagtctgtacattccgaacactttttcataga  
P A S V L V C T F R T L F H R  
388 atggctgtaaacatgctccctattttctgctTga 420  
M A V N M L P I S A \*

Rahmen +1; Länge 144 bp

649 ttggacgcgtgggtggcgatccctggagcgaaggaggagaaga  
L D A W V G D P W S E G G R R  
694 gcocgattcaccagtcaccctatggcaagagcctagccatcatg  
A R I H Q S T Y G K S L A I M  
739 accgagccagctctcacaagcctcattgagaaccctgagatg  
T E A Q L S Q A V I E N P E M  
784 cttcaagtc 792

*Contig 2:*

Rahmen +3; Länge 150 bp

825 atgatttttaatatattttctcagaaaaataatttttggaaata  
M I F N I F S Q K I K F L E I  
870 tttaaattcaaagcattctttttgcaattttgcattcttttaacc  
F K F K A F F L Q F C I L L T  
915 catttttcattccattctttctcatttaatgtcttggttccgcata  
H F S F H S F S F N V L F R I  
960 agtcaaaaatggtTaa 974  
S Q N V \*

Rahmen +1; Länge 135 bp

427 atgtcaaaaatgaacttctatggtacaatcacctcactgtcac  
M S K Y E L L W Y N H P H C H  
472 ttttacatttcagtgtgatgaattatgtaccagtaaacgactat  
F Y I S V L M N Y V P V N D Y  
517 gcatgtaattttggctcattctctaaactgcaactccatagagTaa 561  
A C N F G S F S K L H S I E \*

Rahmen -3; Länge 132 bp

535 atgagccaaaattacatgcatagtcgtttactggtacataattca  
M S Q N Y M H S R L L V H N S  
490 tcagcactgaaatgtaaaagtgacagtgagggtgattgtaccata  
S A L K C K S D S E G D C T I  
445 gaagttcatattttgacattgctattatataaagcttctTaa 404  
E V H I L T L L L Y K A S \*

Rahmen -3; Länge 114 bp

958 atgcggaacaagacattaaatgagaaagaatggaatgaaaaatgg  
M R N K T L N E K E W N E K W  
913 gttaaaagaatgcaaaattgcaaaaagaatgctttgaatttaa  
V K R M Q N C K K N A L N L N  
868 atttccaaaaatttgattttcTga 845  
I S K N L I F \*

gelb: Starcodons; lila: Stopcodons

### 3.5. Sondenherstellung für FISH

Präzise lokalisierte Marker sind nicht nur hinsichtlich der Kartierung eines Chromosoms von großer Bedeutung, sondern können gerade wegen ihrer genauen Charakterisierung als Sonden für klinisch-diagnostische Fragestellungen verwendet werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurden deshalb für bestimmte Regionen von Chromosom 22 BAC-Rekombinanten zusammengestellt, die den entsprechenden Bereich genau und in hoher Dichte repräsentieren. Dazu gehörten unter anderem auch solche Klone, die im ersten Teil der Arbeit lokalisiert und analysiert wurden.

#### 3.5.1. Region 22cen-q12

Für die Region 22cen-q12 wurde basierend auf der Karte von Kim et al. (1996) ein Set aus 15 BAC-Markern zusammengestellt, die Biotin-markiert durch Hybridisierung auf Normalmetaphasen auf ihre Lokalisation überprüft wurden. Alle BAC-Sonden bis auf zwei konnten im proximalen Bereich des q-Arms bzw. im Centromer von Chromosom 22 detektiert werden. Der BAC 256 C1, der den Marker D22S111 in 22q11 repräsentieren sollte, zeigte keine Signale auf Chromosom 22, sondern auf Chromosom 2 (Daten nicht gezeigt). BAC 223B4 (STMY3) stellte sich ebenfalls als nicht 22-spezifisch heraus, sondern wurde auf Chromosom 1 lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Beide Klone wurden aussortiert. Das ausgewählte und überprüfte Set ist in Tabelle 3.5.1. aufgelistet.

BAC	Marker
120A1	22cen
199F2	22cen
626B6	22cen
770H11	D22S111
639G4	D22S543
678G6	D22S181
201C11	<i>TUPLE 1</i>
108B3	F1D11
219G6	<i>HCF2</i>
135H6	<i>HCF2</i>
230A1	<i>CRKL</i>
217D6	<i>BCR</i>
966B6	D22S301

**Tabelle 3.5.1.:** Liste von BAC-Rekombinanten und ihren entsprechenden Markern auf 22cen-q12. *TUPLE1*: *HIR*-(histone cell cycle regulation defective, *S. cerevisiae*) Homolog A; *STYM3*: Matrix Metalloproteinase 11; *CRKL*: v-crk avian sarkoma virus CT10 onkogene homolog-like; *BCR*: breakpoint cluster region

Im Rahmen einer Kooperation mit der klinischen Genetik der TU Dresden wurden geeignete BAC-Sonden dieses Sets für die Detektion verschiedener Mikrodeletionen in DiGeorge-Patienten erfolgreich eingesetzt (Wagner *et.al.*, 1999).

### 3.5.2. Region 22q12-qter

Für die Region 22q12-qter wurde anhand der physikalischen Karten von Schmitt *et al.* (1996) und Kim *et al.* (1996) ein Set aus 22 BAC-Rekombinanten zusammengestellt (Tabelle 3.5.2.), die in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen der klinischen Fälle verwendet wurden (s. 3.6.). Die DNA der Rekombinanten wurde isoliert und anschließend mit DOP-PCR Biotin-markiert. Die Sonden wurden alle auf Normalmetaphasen *in situ* hybridisiert und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop auf ihre korrekte Lokalisation hin überprüft. Alle 22 BACs zeigten eindeutige Signale im distalen Bereich des langen Arms von Chromosom 22.

BAC	Marker
363A12	D22S29
916H10	D22S424
191F10	D22S277
212A2	D22S98
256C5	D22S102
424D11	D22S91
571A7	D22S87
448G12	<i>CYP2D6</i>
521D12	<i>CYP2D6</i>
888F8	D22S95
475G12	D22S64
140G2	D22S40
397C4	D22S40
226C8	D22S97
285F3	KI-830
899G1	D22S94
426B6	D22S22
299D3	D22S45
115C9	D22S23
276D9	D22S55
384D8	<i>ARSA</i>
799F10	D22S163

**Tabelle 3.5.2.:** Liste von BAC-Rekombinanten und ihren entsprechenden Markern auf 22q12-qter.

### 3.6. Klinische Fälle

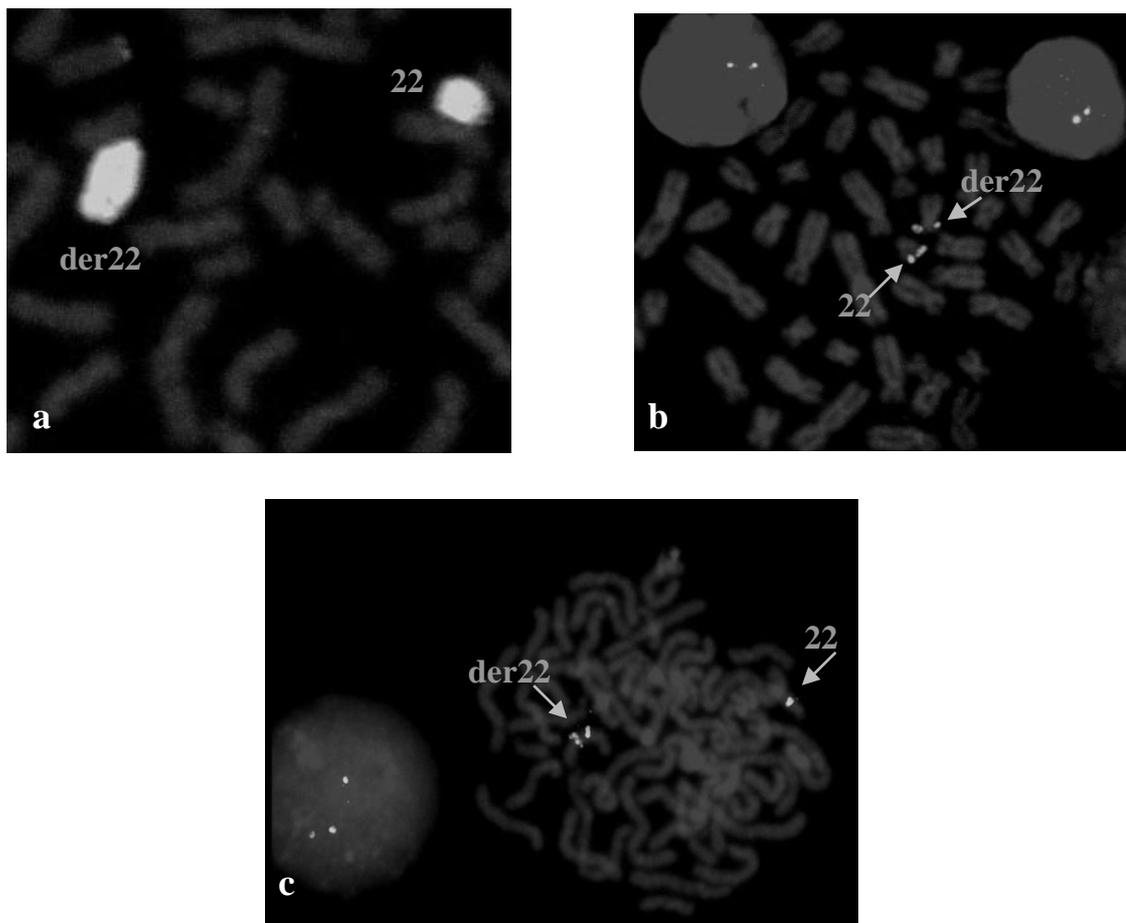
Mithilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurden in den fünf hier vorgestellten Fällen die unterschiedlichen Abberationen auf Chromosom 22 auf molekularer Ebene bestimmt, indem ausgewählte, präzise lokalisierte BAC-Rekombinanten als Sonden eingesetzt wurden (s. 3.5.)

#### 3.6.1. Deriviertes Chromosom 22

##### *Patientin A.L.*

Der Fall wurde uns zur molekulargenetischen Bestimmung geschickt, da die Patientin ein verlängertes und zweifach eingeschnürtes Chromosom 22 in ihrem Karyotyp zeigte. Um zu überprüfen, ob das Material des derivierten Chromosoms ausschließlich von Chromosom 22 stammt, wurde zunächst FISH mit einer Paint22-Sonde durchgeführt. Die Auswertung ergab, daß sich das verlängerte Chromosom durchgehend mit der Sonde für das gesamte Chromosom 22 hybridisieren ließ. Eine Translokation konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden (Abb.3.6.1.1.a). Desweiteren wurden die Sonden 115C9 (D22S23), 276D9 (D22S55) und 217D6 (*BCR*) in *in situ*-Experimenten eingesetzt. 115C9 und 276D9 konnten auf dem normalen Chromosom 22 distal auf 22q13 detektiert werden. Das derivierte Chromosom zeigte ebenfalls je ein Signal am Ende eines Arms (Abb.3.6.1.1.b). Der BAC 217D6 wies Doppelsignale im mittleren Bereich des verlängerten Chromosoms 22 auf und zeigte die erwarteten Signale auf dem normalen 22 (Abb.3.6.1.1.c).

Mangels weiterer Metaphasepräparate der Patientin konnten keine weiteren Experimente durchgeführt werden. Die hier gezeigten Ergebnisse lieferten jedoch ausreichend Information, um ein erstes Modell zur Entstehung des derivierten Chromosoms erstellen zu können (s.Diskussion, Abb. 4.2.1.).



**Abb. 3.6.1.1.:** Ergebnisse der FISH-Experimente für Patientin A.L.

a) Paint22-Sonde: der22 besteht nur aus Material von Chromosom 22.

b) BAC 115C9 (D22S23) zeigt je ein Signalpaar auf dem normalen Chromosom und an einem Ende des derivierten Chromosoms 22.

c) BAC 217D6 (*BCR*) zeigt die erwarteten Signale auf dem normalen Chromosom 22 und Doppelsignale in der mittleren Region von der22.

### 3.6.2. Partielle Monosomie 22q13

Für die Deletionsfälle C.B. und P.P. wurden ebenfalls BACs aus der Markersammlung für die Region 22q13 gewählt.

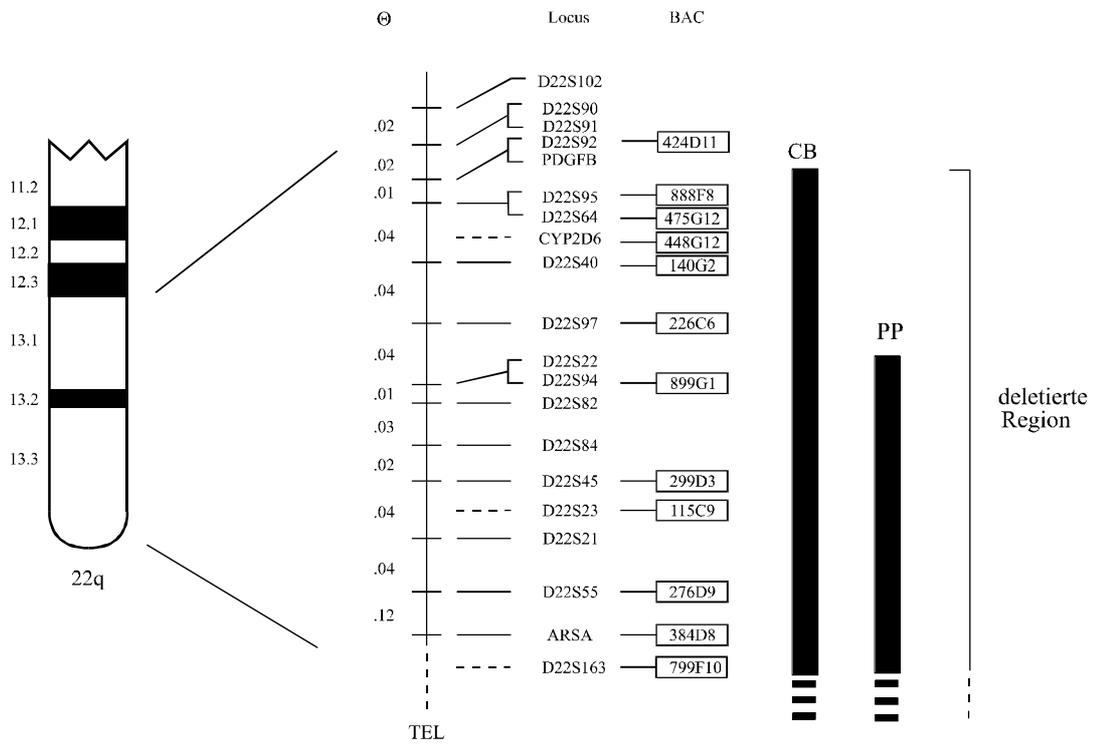
Patient C.B. zeigte für alle getesteten Marker proximal von D22S92 Signale auf beiden Chromosomen 22. Der BAC 888F9 (D22S95) hingegen ergab nur ein Signal auf dem normalen Chromosom 22, nicht auf dem deletierten. Die Sonden distal zu D22S95 waren ebenfalls nur auf dem normalen 22 zu detektieren. Der Bruchpunkt dieser Deletion konnte demnach in eine Region von 1cM zwischen die Marker D22S92 und D22S95 lokalisiert werden. Das Ausmaß des deletierten Bereichs beträgt ungefähr 38

cM. Durch eine weitere Hybridisierung mit der Telomersonde (TTAGGG)<sub>n</sub> wurde bewiesen, daß die Telomere am Ende des deletierten Chromosoms jedoch vorhanden waren (Tabelle 3.6.2., Abb.3.6.2.).

Der Deletionsbruchpunkt wurde in Patient P.P. durch Hybridisierungen mit dem gleichen Set von BAC-Markern bestimmt. Dabei wurden für BAC 226C8 (D22S97) und alle proximal gelegenen Marker FISH-Signale auf beiden Chromosomen 22 detektiert. 899G1 (D22S94) und die verwendeten distaleren Marker dagegen waren nur auf dem normalen Chromosom 22 zu sehen, auf dem derivierten jedoch deletiert. Der Bruchpunkt konnte in diesem Patienten so auf eine Region von 4 cM zwischen die genetischen Marker D22S97 und D22S94 eingegrenzt werden. Die Deletion umfaßt hier in etwa 26 cM. Durch die Hybridisierung der Telomersonde konnte auch in diesem Patient das Vorhandensein von Telomeren nachgewiesen werden (Tabelle 3.6.2., Abb.3.6.2.).

<b>Marker</b>	<b>BAC</b>	<b>C.B.</b>	<b>P.P.</b>
D22S92	424D11	+	+
D22S95	888F8	-	+
D22S64	475G12	-	+
<i>CYP2D6</i>	448G12	-	+
D22S40	140G2	-	+
D22S97	226C6	-	+
D22S94	899G1	-	-
D22S45	299D3	-	-
D22S23	115C9	-	-
D22S55	276D9	-	-
<i>ARSA</i>	384D8	-	-
D22S163	799F10	-	-
telomeres Repeat	(TTAGGG) <sub>n</sub>	+	+

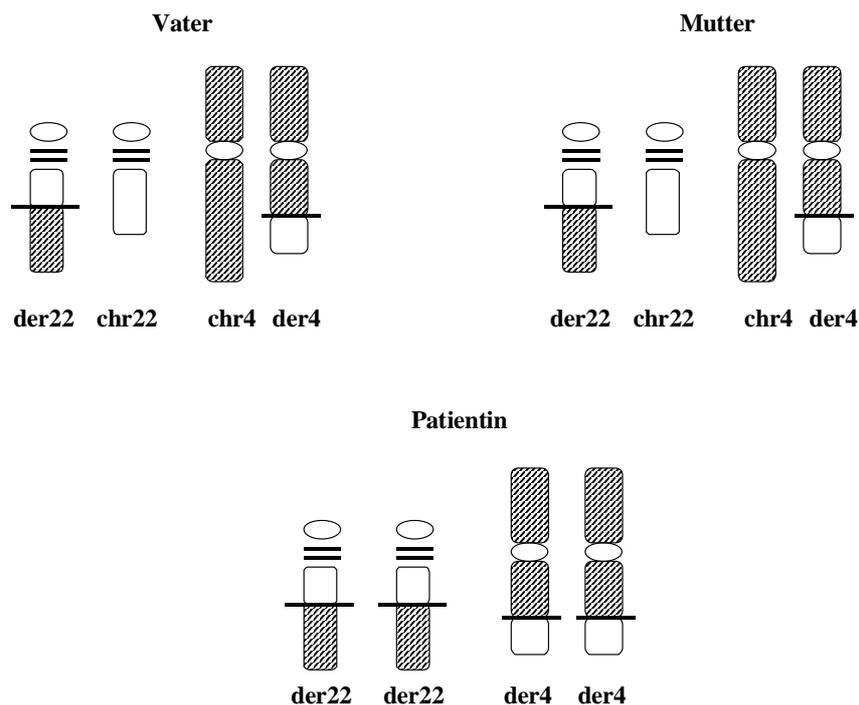
**Tabelle 3.6.2.:** Liste der in FISH-Experimenten eingesetzten BACs und ihre An- (+) und Abwesenheit (-) auf den deletierten Chromosomen 22 der beiden Patienten.



**Abb.3.6.2.:** Schematische Darstellung des Ausmaßes der Deletion 22q13 für beide Patienten (Schröder *et al.*, 1998).

### 3.6.3. Translokation t(4/22)

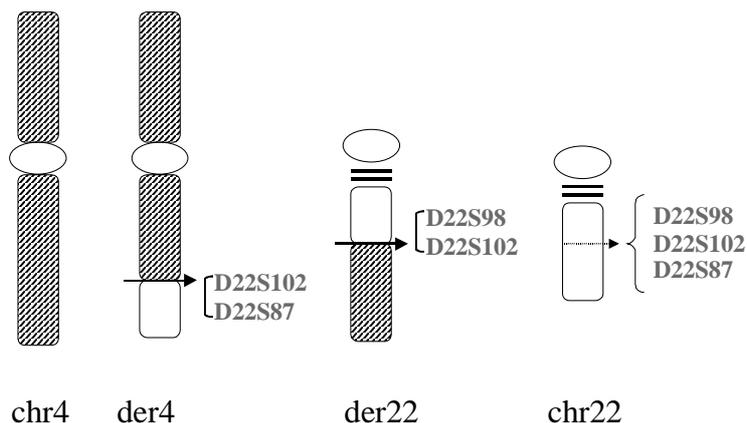
Für die Bearbeitung des Falles 97C101 wurden Metaphasepräparate der Patientin und ihren Eltern in FISH-Experimenten untersucht. Die Eltern des Kindes weisen beide eine balancierte Translokation t(4;22)(q22;q12-13.1) auf. Das Mädchen hat alle 4 Translokations-Chromosomen ihrer Eltern geerbt (Abb.3.6.3.1.).



**Abb. 3.6.3.1.:** Schematische Darstellung der Vererbung der balancierten Translokation t(4;22)(q22;q12-13) von den Eltern an die Patientin. der22: Translokations-Chromosom 22; chr22: normales Chromosom 22; der4: Translokations-Chromosom 4; chr4: normales Chromosom 4.

Zunächst wurden die Metaphasepräparate der Eltern mit Biotin-markierten Sonden hybridisiert, die die Marker D22S98 und D22S102 repräsentieren. Der BAC 191D12 (D22S98) ergab sowohl beim Vater als auch bei der Mutter Signale auf dem normalen Chromosom 22 als auch auf dem Translokations-Chromosom der22. Dieser BAC liegt also proximal des Bruchpunktes auf 22. Der BAC 256C5 (D22S102) dagegen konnte bei den Eltern sowohl auf dem normalen 22 als auch auf beiden Translokations-Chromosomen der22 und der4 detektiert werden. Dieser BAC umspannt demnach den

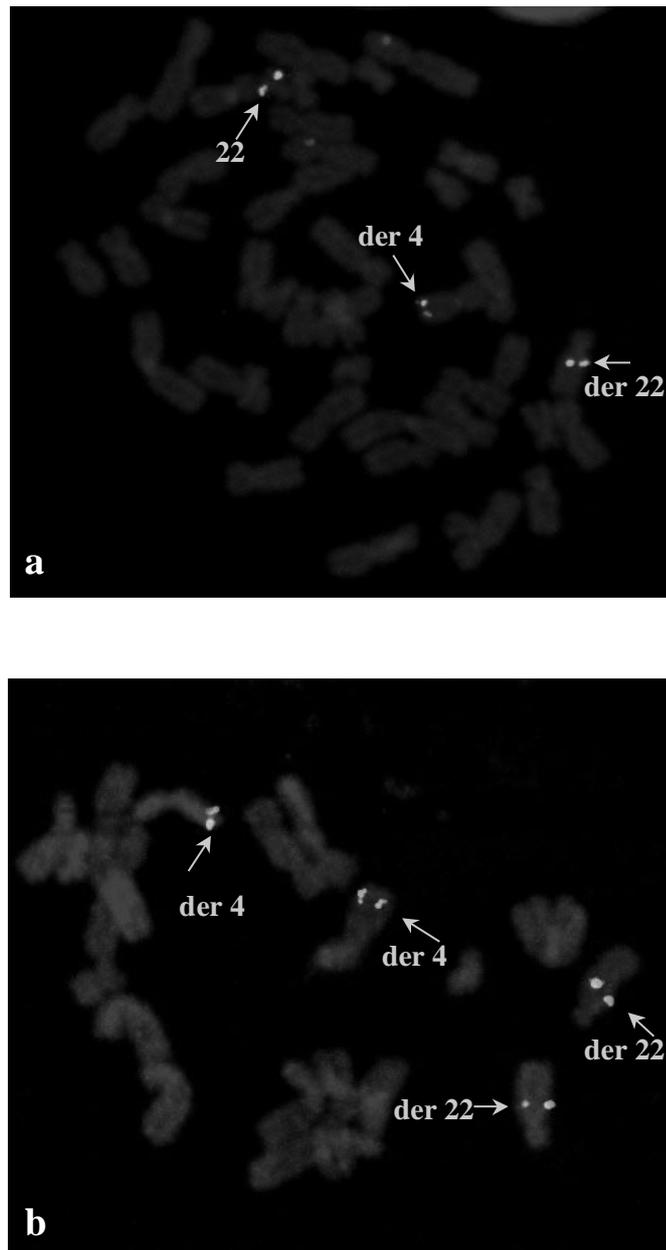
Bruchpunkt der Translokation (Abb. 3.6.3.2.; Abb.3.6.3.3.a). Zur Kontrolle wurde ein weiterer BAC eingesetzt, der distal zum Marker D22S102 lokalisiert ist. 571A10 (D22S87) ergab Signale auf dem normalen Chromosom 22 und der4, welcher somit distal zum Translokationsbruchpunkt liegt (Abb.3.6.3.2.).



**Abb.3.6.3.2.:** Reihenfolge der 22-spezifischen Marker auf dem normalen Chromosom 22 (chr22) und Verteilung der Marker auf den Tranlokations-Chromosomen der4 und der22.

Die Hybridisierungen auf die Patienten-Metaphasen ergab ein analoges Ergebnis. 191D12 detektierte die zwei Translokationschromosomen der22 und der BAC 571A10 die beiden der4. Der BAC für D22S102 ergab, wie erwartet Signale auf allen 4 Translokationschromosomen des Kindes (Abb.3.6.3.3.b).

Auf diese Weise wurde eine BAC-Rekombinante bestimmt, die den Translokationsbruchpunkt überspannt und ihn auf eine DNA-Region von 200 kb Größe eingrenzt, was eine enorme Präzisierung des cytogenetischen Befundes bedeutet. Auf dieser Grundlage wird eine effektive Suche nach Kandidatengen in der Bruchpunktregion möglich sein.



**Abb. 3.6.3.3.:** FISH mit BAC-Sonde 256C5 (D22S102).

a) Metaphase der Mutter mit Signalen auf dem normalen Chromosom 22, auf der22 und der4 (grüne Pfeile).

b) Methaphase der Patientin mit Signalen auf beiden der22 und beiden der4 (grüne Pfeile).

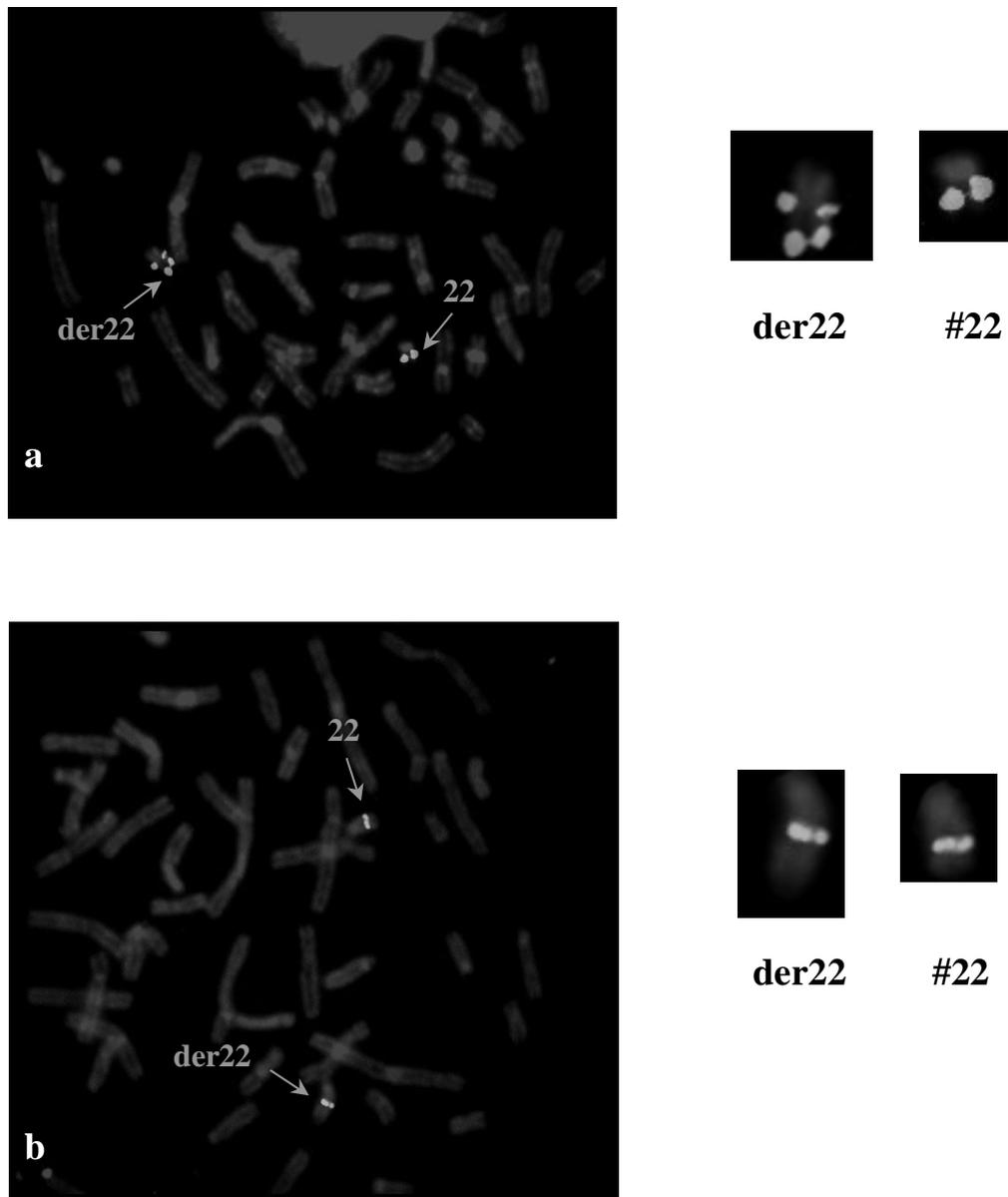
### 3.6.4. Partielle Trisomie 22q

#### Patient K.M.

Zunächst wurden BACs, die die Marker D22S95, D22S64, D22S97, D22S94, D22S45, D22S23, D22S55 und ARSA repräsentieren, Biotin markiert und in FISH-Experimenten eingesetzt. Deutlich duplizierte Signale konnten auf dem aberranten Chromosom 22 für alle eingesetzten Sonden nachgewiesen werden. Um eine klare Aussage zur Ausdehnung der Duplikation machen zu können, wurden zusätzlich die BACs 191D12 (D22S98), 363A12 (D22S29) und 256C5 (D22S102) auf die Metaphasen des Patienten hybridisiert. Nach Auswertung von mindestens 20 Metaphasen pro Objektträger, wurden für den Marker D22S102 ebenfalls zwei Signale auf der22 beobachtet, wohingegen die Sonden für D22S98 und D22S29 nur je ein Signal auf dem aberranten Chromosom 22 zeigten (Tabelle 3.6.4.; Abb.3.6.4.).

Loci	BAC-Sonde	normales #22	der22
D22S29	363A12	+	+
D22S98	191D12	+	+
D22S102	256C5	+	++
D22S95	888F8	+	++
D22S64	475G12	+	++
D22S40	140G2	+	++
D22S97	226C8	+	++
D22S94	899G1	+	++
D22S45	299D3	+	++
D22S23	115C9	+	++
D22S55	276D9	+	++
ARSA	384D8	+	++

**Tabelle 3.6.4.:** Liste der eingesetzten BAC-Sonden und der dazugehörigen Loci.



**Abb.3.6.4.:** FISH mit 22q-spezifischen biotinylierten BAC-Sonden auf Metaphasechromosomen des Patienten.

a) 256C5 (D22S102) ergab duplizierte Signale auf dem aberranten Chromosom 22 und ein Signalpaar auf dem normalen.

b) 191D12 (D22S98) ergab ein Signalpaar sowohl auf dem aberranten als auch auf dem normalen Chromosom 22.

Der Bruchpunkt der Duplikation ließ sich demnach auf einen Bereich von 1,5 cM zwischen den beiden Marker D22S98 und D22S102 lokalisieren.

Um zu überprüfen, ob eine Inversion der verdoppelten Region vorlag, wurde eine Zweifach-Hybridisierung mit den BACs D22S102 (FITC detektiert) und D22S23 (Cy3 detektiert) vorgenommen. Leider konnten die Signale nicht überzeugend ausgewertet werden. Für weitere Versuche standen keine Objektträger mehr zur Verfügung.

Das Ausmaß der Duplikation konnte somit erfolgreich bestimmt werden. Ob der Bereich tandem oder invertiert hintereinander liegt, muß in späteren Versuchen noch gezeigt werden.

## **4. Diskussion**

Im Rahmen des Humanen Genom Projektes wurden in den letzten Jahren hochauflösende integrierte physikalische Karten erstellt, auf deren Basis die Sequenzierung des kompletten menschlichen Genoms läuft. Dieses Bio-Großprojekt soll bis zum Jahre 2003 abgeschlossen sein und viele seiner Ziele sind bereits erreicht (s. 1.1.). Dennoch gibt es auch eine Reihe von Problemen, die eine lückenlose Aufschlüsselung des menschlichen Genoms komplizieren. Schwer zugänglich für Sequenzierungen sind vor allem repetitive Bereiche, wie sie an Centromeren und Telomeren von menschlichen Chromosomen vorkommen. In diesen Regionen liegen bisher die größten Lücken und sie verdienen daher besondere Aufmerksamkeit. Hetero-Euchromatin-Übergangsbereiche zählen zu diesen genomischen Abschnitten, da sie einige Wiederholungssequenzen enthalten, aber über ihren Aufbau ansonsten noch nicht viel bekannt ist. Es wird vermutet, daß die Grenze zwischen repetitiver, transkriptionell nicht aktiver DNA und dem Euchromatin nicht scharf gezogen ist, sondern daß die Repeats nach und nach auslaufen und schon von Transkriptionseinheiten durchsetzt sind. Deshalb ist gerade die Frage, ob in solchen Regionen wirklich Gene lokalisiert sind, von besonderem Interesse.

### **4.1. Neue exprimierte Sequenzen auf Chromosom 22**

Die Suche nach neuen Genen ist neben dem Verständnis der Funktion und Regulation des menschlichen Organismus auch in klinischer Hinsicht sehr wichtig. Viele neoplastische aber auch syndromale Erkrankungen sind mit Chromosom 22 assoziiert. Das Auffinden neuer Gene vor allem in Bereichen, die in strukturelle Rearrangements dieses Chromosoms involviert sind, kann Beiträge zur Aufklärung genetischer Erkrankungen liefern.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vor allem zwei Bereiche auf Chromosom 22 nach transkribierten Sequenzen durchsucht: 22q13 und 22cen-q11.

#### **4.1.1. Exon-Kandidaten aus der Region 22q13**

Da in der distalen Region auf dem langen Arm zu Beginn der Arbeit eine wesentlich geringere Anzahl an Genen bekannt waren als in den genauer charakterisierten Regionen 22q11 und q12, wurden 10 22q13-spezifische BAC-Rekombinanten in Exon-

Trapping-Experimenten eingesetzt. Es konnten insgesamt 7 interessante Kandidatenklone isoliert werden. Zwei dieser Klone zeigten 100%ige Übereinstimmung mit bereits bekannten Genen. 384-42 zeigte sich mit einem Abschnitt des ARSA-Gens homolog und 585-78 stellte sich als ein Exon der RNA-Polymerase II heraus. Diese Ergebnisse unterstreichen die Effizienz des Exon-Trapping Systems bei der Suche nach transkribierten Sequenzen. Die Wahrscheinlichkeit ist daher sehr groß, daß die Klone, welche keine relevanten Homologien zu bekannten Genen zeigen, Exons von neuen, nicht charakterisierten Genen sein könnten.

Der lange Arm von Chromosom 22 wurde mittlerweile bis auf wenige Lücken durchsequenziert (Dunham *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurden die 22-spezifischen Exon-Kandidaten nach dieser Veröffentlichung erneut in einer DNA-Datenbank abgeglichen. Drei Exon-Klone, die für den BAC 426B6 aus der Region 22q13 "gefangen" wurden, zeigten jetzt Ähnlichkeiten zu einem Hefe-Gen als Teile eines neuen humanen Gens, das dort als putativer GTPase-Aktivator bezeichnet wird. Die Sequenzen von 104-5 und 299-39 waren hingegen nur zu genomischen Klonen homolog und erwiesen sich deshalb als interessante Kandidaten, die bei genauerer Analyse Hinweise auf neue Gene liefern könnten. Wie bei bereits komplett sequenzierten anderen Genomen festgestellt wurde, kann man auch beim Menschen davon ausgehen, daß man bei der Suche nach Genen in der Regel zu einem Drittel auf bereits identifizierte Gene stößt und das zweite Drittel sich bekannten Genfamilien zuordnen läßt. Ein Drittel aller gefundenen Gene ist jedoch vollkommen neu. Die Charakterisierung dieser zwei Klone sollte daher auf jeden Fall weiter verfolgt werden.

#### **4.1.2. Exon-Kandidaten aus der pericentrischen Region**

Die Sequenz des langen Arms von Chromosom 22 weist gerade in heteroeuchromatischen Übergangsbereichen Lücken auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein BAC-Contig der pericentrischen Region auf Chromosom 22 erstellt und auf transkribierte Sequenzen untersucht. Für die BACs 199F2 und 608C4 aus diesem Contig wurde je ein Exon-Kandidat isoliert. Nach Rückbestätigung der Exon-Klone 199-30 und 608-61 auf den Contig gibt es hier also Hinweise auf transkribierte Sequenzen und damit auf potentielle Gene in einer Region, in der bisher keine codierenden Sequenzen vermutet wurden. Durch die Lokalisation der Exons in diesen pericentri-

schen Rekombinanten, handelt es sich um die bisher proximalsten ESTs, die sich als Teile von neuen Genen erweisen könnten.

Homologie-Abgleiche ergaben keine signifikanten Übereinstimmungen mit bereits bekannten Genen, was die Chance, auf neue Gene gestoßen zu sein, deutlich erhöht. Die Ergebnisse der Zoo-PCR an genomischer DNA verschiedener Spezies lassen darauf schließen, daß es sich sowohl bei 199-30 als auch bei 608-61 um relativ konservierte DNA-Motive handelt. Amplifikationsprodukte konnten nicht nur im Menschen und Schimpansen, sondern auch in verschiedenen Nagern und im Lamm nachgewiesen werden (Dissertation S. Salemi). RT-PCR-Experimente bewiesen, daß beide Exon-Sequenzen in menschlichen Geweben exprimiert werden, was bedeutet, daß es sich tatsächlich um Bestandteile von Genen handelt. Da für beide Klone ubiquitäre Expression in den untersuchten menschlichen Geweben nachgewiesen werden konnte (Dissertation S. Salemi), liegt der Schluß nahe, daß es sich um Teile von Haushaltsgenen oder konservierten Strukturprotein-Genen handeln könnte. Nach Übersetzung der Sequenzen in ihre Aminosäurefolge wurden in Datenbanken bisher jedoch keine Hinweise auf bekannte Motive gefunden.

Die Region, aus der diese Exons stammen, gehört zu einer Gruppe von bisher nicht ausreichend charakterisierten genomischen Abschnitten. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, bei Sequenzabgleichen auf Homologien zu treffen, nicht sehr hoch. Ihre Lokalisation im pericentrischen Bereich von Chromosom 22 läßt Raum für Spekulationen, ob diese Sequenzen auf irgendeine Weise in die Funktion des Centromers involviert sind oder als Struktur oder Sequenzelemente zum Aufbau des Centromers beitragen.

Für das Exon 199-30 konnte im Rahmen dieser Arbeit eine cDNA gefunden werden, die das neue Gen repräsentieren sollte. Die Sequenzierung dieses cDNA-Klons (J1124) gestaltete sich jedoch ausgesprochen schwierig. Um den zeitlichen Aufwand der Sequenzierung des 8,5 kb großen Inserts, der mit der Methode des Primerwalking zu erwarten gewesen wäre, zu verringern, wurde auf das Genome Priming System der Firma NEB (New England Biolabs) zurückgegriffen. Hierbei wurden Transprimer in den cDNA-Klon eingesetzt, von denen aus mit speziellen Primern in die Insertsequenz hineingelesen werden konnte. Die Insertion der Transprimer sollte hierbei an unterschiedlichen Stellen erfolgen, um möglichst viele, z.T. überlappende Teilsequenzen der cDNA zu erhalten. Die Sequenzierung von 34 so erhaltenen Klonen ergab allerdings sehr große Überlappungen zwischen den Einzelsequenzen. Daraus läßt sich schließen, daß die

Transposonelemente bevorzugt an ähnliche Stellen eingebaut wurden. Die Schwierigkeiten bei den anschließenden Sequenzierungen am hauseigenen ABI, sowie bei den kommerziellen durch die Firma MWG, lassen vermuten, daß hier schwer zugängliche Bereiche innerhalb des Genoms vorliegen. Die Beschaffenheit dieser schwer sequenzierbaren DNA-Abschnitte konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert werden. Mithilfe des Repeatmasker-Programms wurde allerdings ausgeschlossen, daß es sich hierbei um bekannte repetitive Motive handelt. Weitere molekulargenetische Analysen sind notwendig, um die Struktur dieser Region vollständig aufzuklären.

Von der 8,5 kb großen cDNA konnten immerhin 2005 bp identifiziert werden, die in zwei Contigs aufgeteilt wurden. Homologieabgleiche mit beiden Sequenzen ergaben Übereinstimmungen zu einigen anonymen cDNA, was darauf hindeutet, daß es sich bei dem Klon um eine transkribierte Sequenz handelt. Zusätzlich zeigten beide Contigs eine große Homologie (95-96%) zu einem Cosmidklon der Region 22q11.2. Die cDNA wurde jedoch in einer Southernhybridisierung eindeutig auf den Contig, der die Region 22cen-q11.1 repräsentiert, lokalisiert. Welche der beiden Lokalisationen die richtige ist, oder ob es sich um zwei sehr nah verwandte Sequenzen auf zwei unterschiedlichen Loci handelt, kann in weiteren Experimenten aufgeklärt werden.

Die beiden Contigs liegen an unterschiedlichen Stellen, aber jeweils am Stück auf dem Cosmid. Contig 1 überspannt hierbei einen Abschnitt von 794 bp, Contig 2 überspannt einen Bereich von ca 1213 bp. Da der Cosmidklon ein genomisches Insert trägt, wurde erwartet, daß die Übereinstimmungen von Introns unterbrochen werden. Exons mit einer Größe zwischen 800 und 1200 bp sind eher selten. Die durchschnittliche Länge eines internen Exons liegt bei ungefähr 140 bp, die eines 3'Exons bei ca. 630 bp. Da die untersuchte cDNA jedoch eine überdurchschnittliche Größe von 8,5 kb zeigt, erscheint es möglich, daß ihre Exons ebenfalls von der Norm abweichen könnten. Bewiesen werden könnte diese Hypothese allerdings nur durch Abgleich der kompletten cDNA-Sequenz auf ihr genomisches Pendant.

Die Übersetzung der erhaltenen DNA-Sequenzen in ein putatives Protein und anschließender Sequenzabgleich konnten keine Homologien zu bekannten Proteinen oder Proteinmotiven aufdecken. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, über potentielle Funktionen dieses neuen Gens zu spekulieren. Die Centromernähe könnte ein Hinweis darauf sein, daß es in den Aufbau oder die Funktion des Centromers involviert sein könnte. Allerdings läßt die Lokalisation eines Gens in den meisten Fällen keine Rückschlüsse auf dessen Funktion zu.

## 4.2. Diagnostischer Einsatz von Chromosom 22-spezifischen BAC-Sets

Chromosom 22 ist schon seit langem Gegenstand medizinisch-wissenschaftlicher Forschungen und vor allem in klinischer Hinsicht wurden in den letzten Jahren sehr viele Erkenntnisse hinzu gewonnen. Dieses Autosom ist in eine Vielzahl von neoplastischen und kongenitalen Erkrankungen involviert. Daher ist es sehr wichtig, über geeignete Sammlungen von 22-spezifischen Markern zur molekulargenetischen Untersuchung pathologischer Fälle zu verfügen. Mithilfe der integrierten physikalischen BAC-Karten (Schmitt et al., 1996; Kim et al., 1996) und unserer 22-spezifischen Rekombinanten-Sammlung konnten die Kartierungsinformationen in der Praxis für klinische Applikationen umgesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, für klinisch relevante Bereiche auf Chromosom 22 BAC-Sets zusammenzustellen, die für diagnostische Fragestellungen einsetzbar sind.

Dabei wurde auf die Reihenfolge und Zuordnung der Marker in den veröffentlichten Karten (Schmitt et al., 1996; Kim et al., 1996) zurückgegriffen. Bei der Überprüfung der Sonden in FISH-Experimenten auf Normalmetaphasen erwiesen sich zwei der BACs (265C1 und 223B4) als nicht 22-spezifisch. 265C1, der eigentlich den Marker D22S111 in 22q11 repräsentieren sollte, zeigte eindeutige Signale nur auf Chromosom 2, nicht jedoch auf Chromosom 22. Ähnliches gilt für 223B4, der BAC für STYM3, der auf Chromosom 1 anstatt auf Chromosom 22 nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse zeigten, daß auch in noch so sorgfältig erstellten Karten falsch-positiv zugeordnete Klone auftauchen können, die aufgrund von Homologien zu Chromosom 22, die in der FISH nicht nachweisbar sind, entstanden sein könnten. Daher ist es unerlässlich, Überprüfungen der Sonden gerade in Hinsicht auf klinische Anwendungen vorzunehmen. Sie müssen eindeutig und ohne Kolo-kalisationen auf Chromosom 22 nachzuweisen sein, um diagnostische Fehler zu verhindern. Nicht alle BAC-Rekombinanten eignen sich daher als Markersonden. Enthalten die Klone genomische Sequenzen, die entweder zu viele, nicht suppressible Repeats beinhalten oder zu anderen Abschnitten im Genom homolog sind, können sie nicht zur Detektion von pathologisch relevanten Loci auf Chromosom 22 herangezogen werden. Deshalb wurden alle ausgewählten BACs in mehreren FISH-Experimenten getestet und nur solche ausgewählt, die ohne Zweifel ausschließlich auf Chromosom 22 nachzuweisen waren. Die in dieser Arbeit vorgestellten BAC-Sets der Regionen 22q11-q12 und 22q12-qter stellen somit eine verlässliche Sammlung von FISH-Sonden dar, die ohne weiteres diagnostisch eingesetzt werden

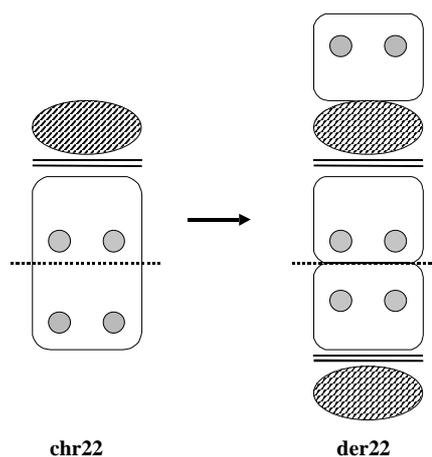
können.

Anhand einiger Fallbeispiele wurde die Effizienz der Anwendung dieser Marker-Sets in klinischen Applikationen gezeigt.

#### 4.2.1. Deriviertes Chromosom 22

Aufgrund struktureller Auffälligkeiten eines der beiden Chromosomen 22, wurden uns Metaphasepräparate eines kranken Kindes zugeschickt, um die Aberration auf molekulargenetischer Ebene zu untersuchen. Da mir leider nur sehr wenige Objektträger zur Verfügung standen, konnte ich nicht mehr als 4 FISH-Experimente durchführen.

Diese ersten Ergebnisse lieferten dennoch Hinweise auf die Zusammensetzung und Entstehung des derivierten Chromosoms, was im nachfolgenden Modell demonstriert werden soll.



**Abb.4.2.1.:** Modell zur Entstehung des derivierten Chromosoms 22 in Patientin A.L. grüne Punkte: Sonde für D22S55; gelbe Punkte: Sonde für *BCR*

Die Ergebnisse der Hybridisierung mit der Paint22-Sonde, bewiesen, daß das derivierte Chromosom ausschließlich aus Material von Chromosom 22 besteht. Da es zwei Einschnürungen enthält, kann man annehmen, daß es sich um ein dicentrisches Chromosom handelt, was aber durch FISH mit der centromeren Sonde D22Z2 noch geklärt werden muß. Die Ergebnisse der übrigen Hybridisierungen lassen darauf schließen, daß das Chromosom in der Region 22q13 abgebrochen und dann an das Centromer fusioniert ist. Der Bereich 22p-22q11.2 hat sich verdoppelt und vermutlich invertiert hintereinander gelegt. Weitere Experimente mit BAC-Sonden der betroffenen Regionen

werden eine genauere Aufklärung der Situation auf dem derivierten Chromosom bringen, falls neue Metaphasepräparate der Patientin präpariert werden können.

#### **4.2.2. 22q13 Deletions-Patienten**

Mithilfe des BAC-Sets für die Region 22q13 konnten die Bruchpunkte für zwei Patienten mit Deletionen im distalen Bereich von Chromosom 22 bestimmt werden. Für Patientin C.B. wurde der Bruchpunkt auf einen Bereich von 1 cM zwischen die genetischen Markern D22S92 und S22S95 lokalisiert. Der Bruchpunkt der Deletion in Patient P.P lag in einer Region von 4 cM. Die genau lokalisierten Sonden konnten in diesen Fällen den Umfang der Deletion bestimmen und die Bruchpunkte im Vergleich zur herkömmlichen Karyogrammen-Techniken präzisiert werden. Zusammen mit einem dritten Deletionsfall wurden diese Patienten bereits veröffentlicht und ausführlich diskutiert (Schröder *et al.*, 1998).

#### **4.2.3. Translokation t(4/22)**

Im Fall der Patientin A.L. wurde eine Translokation t(4/22) von beiden Elternteilen (als Cousin und Cousine eng verwandt) an das Kind in Form aller 4 Translokations-Chromosomen weitervererbt.

Translokationen zwischen den Chromosomen 4 und 22 sind äußerst selten, daher kann hier die klinische Seite nicht diskutiert werden. Außerdem lagen mir nur wenige Informationen über den Phänotyp des Kindes vor. Allerdings wurde in diesem Fall ein BAC gefunden wurde, der den Bruchpunkt der Translokation auf Chromosom 22 überspannt, was ihn auf ein genomisches Fragment von 200 kb eingrenzt. Nach Veröffentlichung der Sequenz des q-Arms, wurde über das Internet nach Informationen und Sequenzen dieses BACs, bzw. seines entsprechenden Markers D22S102 gesucht. Ausführliche Recherchen nach Genabschnitten in diesem BAC oder mittlerweile sequenzierten Anteilen blieben ohne Erfolg. Eine ausführliche molekulargenetische Analyse des BACs mit dem Ziel, den Bruchpunkt zu klonieren, wird eine neue interessante Aufgabe sein, die aus dieser Arbeit entstanden ist.

#### **4.2.4. Duplikation 22q13**

Im Fall des Patienten K.M. konnte das Ausmaß der Duplikation mithilfe des Marker-Sets für 22q12-qter bestimmt werden. Der Bruchpunkt liegt in einer Region von ca. 1,5

cM zwischen den beiden Markern D22S98 und D22S102. Das Ausmaß der Duplikation beträgt in etwa 45 cM (s. Karte Schmitt et al., 1996). Die schwerwiegende Erkrankung des Kindes mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Symptomen korreliert mit dem großen Umfang der Deletion. Es handelt sich bei diesem Fall allerdings um einen Einzelfall. In der Literatur wurden bisher keine Patienten mit Duplikationen im distalen Bereich von Chromosom 22 beschrieben. Durch eine Veröffentlichung des Falles werden vielleicht Arbeitsgruppen, Kliniken oder betroffene Familien aufmerksam und Zusammenarbeiten können sich ergeben, wie es nach der Veröffentlichung der Deletionsfälle der Fall war. Wir wurden zum einen von klinisch genetischen Instituten, z.B. aus Spanien angeschrieben, die um Hilfe bei der Analyse ähnlicher Fälle baten. Zum anderen haben sich auch von Eltern betroffener Kinder, die unsere Adresse übers Internet erhalten haben, direkt an uns gewandt mit der Bitte um Informationen über die Erkrankung und Vermittlung der Adressen anderer Familien. „... vielen Dank für ihre schnelle und positive Antwort. Sie können sich gar nicht vorstellen, was das für uns bedeutet, nach all den Jahren, nun endlich jemanden gefunden zu haben, der sich mit diesem Chromosomendefekt beschäftigt. ... sie dürfen unsere Adresse gerne an andere Eltern weitergeben, auch an das amerikanische Paar...“ (e-mail vom 1.11.1999) „... bestimmt hätten wir noch tausend Fragen, aber im Moment ist unser Interesse mehr darauf konzentriert, Kontakt mit anderen Eltern zu bekommen, um Erfahrungen auszutauschen...“ (e-mail vom 18.11.1999). Auf diesem Wege wird wahrscheinlich eine Elterninitiative für 22q13-Deletionspatienten gegründet werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in der Arbeit überprüften Marker-Sets in den dargestellten Fällen erfolgreich angewendet wurden, um präzisere Aussagen über cyto-genetisch aufgedeckte Aberrationen auf Chromosom 22 machen zu können. Die Ergebnisse zeigen, daß die sorgfältig erstellten Karten von Chromosom 22 nicht nur reine Kartierungsinformationen liefern, sondern auch praktische Anwendung in klinischen Fragestellungen haben können. Natürlich reicht die Diagnostik allein nicht aus, aber sie ist ein erster Weg um Krankheiten aufzuklären zu können. Im Fall der Translokation zum Beispiel wird es bei genauer Analyse des den Bruchpunkt überspannen BACs möglich sein, Genen auf die Spur zu kommen, die in diesen Phänotyp involviert sein könnten.

### 4.3. Ausblick

Hohe Erwartungen werden an den wissenschaftlichen und medizinischen Nutzen des Humanen Genom Projektes gestellt. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms wird bald abgeschlossen sein, doch damit wird die eigentliche Arbeit erst beginnen. Mit dem Wissen über die komplette Sequenz des menschlichen Genoms öffnen sich der Humangenetik neue Wege, den Organismus „Mensch“ wirklich zu verstehen.

Es wird jetzt vorrangig um die Frage gehen, was sich hinter der Basenfolge verbirgt. Welche Funktionen haben die 97 % nicht codierende DNA, die über die gesamte Evolution des Menschen mitgetragen wurden? Wieviele unbekannte Gene gibt es noch, welches sind ihre Aufgaben? Die Sequenz soll den Schlüssel zum Verständnis biologischer Vorgänge im Menschen bringen und die Frage nach der Funktion der Genprodukte wird dabei immer mehr in den Vordergrund rücken. Anhand der Sequenz der Gene allein kann noch nicht viel über die Funktion des entstehenden Proteins ausgesagt werden. Doch die Tatsache, daß inzwischen viele Gene bekannt sind, die sich in Proteinfamilien zusammenfassen lassen, wird eine Hilfe dabei sein, neue Gene einzuordnen. Umfangreiche Datenbanken, in denen Sequenzinformationen und Proteinmotive gesammelt werden, erweisen sich hierbei als nützliches Hilfsmittel. Der Schwerpunkt in der Genetik wird sich immer mehr von der DNA-Sequenz in Richtung der Genprodukte und ihrer Funktionen verlagern.

Das Auffinden aller Gene im Genom und deren regulatorischer Einheiten sollen besonders in der medizinischen Forschung für das Verstehen von Entstehung und Verlauf von Krankheiten sorgen. Hier entsteht Raum für eine umfassende präsymptomatische und pränatale Diagnostik. Darüberhinaus können Gentherapie und andere Therapieformen vermehrt entwickelt und zum Wohle der Menschheit eingesetzt werden.

Dabei wird es zunehmend wichtiger, interdisziplinär zu arbeiten. Interaktionen zwischen den Bereichen Klinik, Forschung und Wirtschaft müssen gefördert werden, um Spezialwissen miteinander vernetzen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Obwohl das Ziel des Humanen Genom Projektes, die Aufschlüsselung der gesamten Sequenz des menschlichen Genoms, mittlerweile in greifbare Nähe gerückt ist, gibt es nachwievor Bereiche, die noch nicht ausreichend charakterisiert sind. Dazu gehören unter anderem die Übergangsbereiche zwischen hetero- und euchromatischer DNA, wie sie an Centromeren und Telomeren vorkommen. Im ersten Teil der Arbeit habe ich einen Contig aus 9 BAC-Rekombinanten erstellt, der den Hetero-Euchromatin-Übergang am Centromer von Chromosom 22 mit einer Größe von 500 kb überspannt. Diese Rekombinanten stellten die Ausgangsbasis für die nachfolgende Suche nach exprimierten Sequenzen in dieser Region dar. Mithilfe des Exon-Trappings konnten zwei Exon-Kandidaten, 199-30 und 608-61, isoliert werden. Es handelt sich hierbei um evolutiv konservierte Sequenzen, die ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die gefundenen Sequenzen Teile von Haushaltsgenen oder konservierten Strukturgenen darstellen. Als nächster Schritt mußten cDNAs für diese Klone gefunden werden. Aus diesem Grund habe ich die beiden Exon-Kandidaten an das Ressourcenzentrum nach Heidelberg geschickt, da dort umfangreiche cDNA-Bibliotheken für das Screening zur Verfügung standen. Die Anfrage für das Exon 608-61 war leider nicht erfolgreich. Für 199-30 hingegen wurde ein cDNA-Klon mit einer beachtlichen Insertgröße von 8,5 kb isoliert und mir zugeschickt. Die Sequenzierung des Klons gestaltete sich schwierig, dennoch konnten 2005 bp des Inserts gelesen werden. Ausführliche Abgleiche der Sequenzen ergaben keinerlei Homologie zu bekannten Genen, Proteinen oder Proteinmotiven. Die hohe Übereinstimmung mit einem in der Region 22q11 lokalisierten Cosmid bestätigte allerdings die korrekte Lokalisation des cDNA-Klons und damit die Tatsache, daß es sich hierbei um die proximalste exprimierte Sequenz handelt, die bisher gefunden wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden umfangreiche Sets von geeigneten BAC-Rekombinanten aus klinisch relevanten Regionen von Chromosom 22 zusammengestellt und auf ihre Anwendbarkeit in FISH-Experimenten sorgfältig überprüft. Auf diese Weise standen präzise lokalisierte BAC-Rekombinanten der Regionen 22q11, q12 und q13 als Sonden zur Verfügung, um sie in klinisch-diagnostischen Fragestellungen einzusetzen. Die effiziente Anwendung dieser Sets wurde anhand von 5 unterschiedlichen

Fällen pathologischer Aberrationen des Chromosoms 22 bewiesen. Bruchpunkte konnten eingegrenzt und Ausmaße der Rearrangements bestimmt werden. Dieser Teil der Arbeit stellt eine wichtige Grundlage für klinische Fragestellungen bezüglich Chromosom 22 dar, weil sie das Handwerkzeug für eine präzise Diagnostik liefert.

## 6. Literatur

- Aurias, A., Rimbaut, C., Buffe, D., Zucker, J. M., and Mazabraud, A. (1984). Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **12**:21-25.
- Bailly, R. A., Bosselut, R., Zucman, J., Cormier, F., Delattre, O., Roussel, M., Thomas, G., and Ghysdael, J. (1994). DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol* **14**:3230-3241.
- Bell, C. J., Budarf, M. L., Nieuwenhuijsen, B. W., Barnoski, B. L., Buetow, K. H., Campbell, K., Colbert, A. M., Collins, J., Daly, M., Desjardins, P. R., and et, a. (1995). Integration of physical, breakpoint and genetic maps of chromosome 22. Localization of 587 yeast artificial chromosomes with 238 mapped markers. *Hum Mol Genet* **4**:59-69.
- Berger, R., Bernheim, A., Weh, H. J., Flandrin, G., Daniel, M. T., Brouet, J. C., and Colbert, N. (1979). A new translocation in Burkitt's tumor cells. *Hum Genet* **53**:111-112.
- Biegel, J. A., Allen, C. S., Kawasaki, K., Shimizu, N., Budarf, M. L., and Bell, C. J. (1996). Narrowing the critical region for a rhabdoid tumor locus in 22q11. *Genes Chromosomes Cancer* **16**:94-105.
- Biegel, J. A., Burk, C. D., Parmiter, A. H., and Emanuel, B. S. (1992). Molecular analysis of a partial deletion of 22q in a central nervous system rhabdoid tumor. *Genes Chromosomes Cancer* **5**:104-108.
- Biegel, J. A., Rorke, L. B., Packer, R. J., and Emanuel, B. S. (1990). Monosomy 22 in rhabdoid or atypical tumors of the brain. *J Neurosurg* **73**:710-714.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. H., and Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms (RFLPs). *Am J Hum Genet* **32**:314-331.
- Bruns, G., Mintz, B. J., Leary, A. C., Regina, V. M., and Gerald, E. (1978). Expression of human arylsulfatase-A in man-hamster somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* **22**:182-185.
- Buckler, A. J., Chang, D. D., Graw, S. L., Brook, J. D., Haber, D. A., Sharp, P. A., and Housman, D. E. (1991). Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:4005-4009.
- Buetow, K. H., Duggan, D., Yang, B., Ludwigsen, S., Puck, J., Porter, J., Budarf, M., Spielman, R., and Emanuel, B. S. (1993). A microsatellite-based multipoint index map of human chromosome 22. *Genomics* **18**:329-339.
- Buetow, K. H., Weber, J. L., Ludwigsen, S., Scherpbier, H. T., Duyk, G. M., Sheffield, V. C., Wang, Z., and Murray, J. C. (1994). Integrated human genome-wide maps constructed using the CEPH reference panel. *Nat Genet* **6**:391-393.

- Church, D. M., Stotler, C. J., Rutter, J. L., Murrell, J. R., Trofatter, J. A., and Buckler, A. J. (1994). Isolation of genes from complex sources of mammalian genomic DNA using exon amplification. *Nat Genet* **6**:98-105.
- Collins, F. and Galas, D. (1993). A new five-year plan for the U.S. Human Genome Project [see comments]. *Science* **262**:43-46.
- Collins, J. E., Cole, C. G., Smink, L. J., Garrett, C. L., Levensha, M. A., Soderlund, C. A., Maslen, G. L., Everett, L. A., Rice, K. M., Coffey, A. J., and et, a. (1995). A high-density YAC contig map of human chromosome 22. *Nature* **377**:367-379.
- Cox, D. R., Burmeister, M., Price, E. R., Kim, S., and Myers, R. M. (1990). Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* **250**:245-250.
- de Groot, P. G., Westerveld, A., Meera, K. P., and Tager, J. M. (1978). Localization of a gene for human alpha-galactosidase B (= n-acetyl-alpha-d-galactosaminidase) on chromosome 22. *Hum Genet* **44**:305-312.
- de la Chapelle, A., Herva, R., Koivisto, M., and Aula, P. (1981). A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet* **57**:253-256.
- Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de Jong, P., Rouleau, G., and et, a. (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **359**:162-165.
- Deloukas, P., Schuler, G. D., Gyapay, G., Beasley, E. M., Soderlund, C., Rodriguez, T. P., Hui, L., Matisse, T. C., McKusick, K. B., Beckmann, J. S., Bentolila, S., Bihoreau, M., Birren, B. B., Browne, J., Butler, A., Castle, A. B., Chiannilkulchai, N., Clee, C., Day, P. J., Dehejia, A., Dibling, T., Drouot, N., Duprat, S., Fizames, C., Bentley, D. R., and et, a. (1998). A physical map of 30,000 human genes. *Science* **282**:744-746.
- Doheny, K. F., McDermid, H. E., Harum, K., Thomas, G. H., and Raymond, G. V. (1997). Cryptic terminal rearrangement of chromosome 22q13.32 detected by FISH in two unrelated patients. *J Med Genet* **34**:640-644.
- Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Keith, T. P., Bowden, D. W., Smith, D. R., Lander, E. S., and et al. (1987). A genetic linkage map of the human genome. *Cell* **51**:319-337.
- Driscoll, D. A., Budarf, M. L., and Emanuel, B. S. (1992a). A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet* **50**:924-933.
- Driscoll, D. A., Spinner, N. B., Budarf, M. L., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E. H., Goldberg, R. B., Shprintzen, R. J., Saal, H. M., Zonana, J., Jones, M. C., and et, a. (1992b). Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* **44**:261-268.

- Dumanski, J. P., Carlbom, E., Collins, V. P., and Nordenskjold, M. (1987). Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:9275-9279.
- Dumanski, J. P., Carlbom, E., Collins, V. P., Nordenskjold, M., Emanuel, B. S., Budarf, M. L., McDermid, H. E., Wolff, R., O'Connell, P., White, R., and et, a. (1991). A map of 22 loci on human chromosome 22. *Genomics* **11**:709-719.
- Dumanski, J. P., Rouleau, G. A., Nordenskjold, M., and Collins, V. P. (1990). Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* **50**:5863-5867.
- Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B. A., Chisoe, S., Dunham, I., Hunt, A. R., Collins, J. E., Bruskiwich, R., Beare, D. M., Clamp, M., Slink, L. J., Ainscough, R., Almeida, J. P., Babbage, A., et al. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* **402**:489-495.
- Emanuel, B. S., Buetow, K., Nussbaum, R., Scambler, P., Lipinski, M., and Overton, G. C. (1993). Report of the third international workshop on human chromosome 22 mapping. *Cytogenet Cell Genet* **63**:206-211.
- Emanuel, B. S. and Seizinger, B. R. (1990). Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 22. *Cytogenet Cell Genet* **55**:245-253.
- Fisher, R. A., Povey, S., Bobrow, M., Solomon, E., Boyd, Y., and Carrit, B. (1977). Assignment of the DIA1 locus to chromosome 22. *Ann Hum Genet* **41**:150-155.
- Gong, W., Emanuel, B. S., Collins, J., Kim, D. H., Wang, Z., Chen, F., Zhang, G., Roe, B., and Budarf, M. L. (1996). A transcription map of the DiGeorge and velo-cardio-facial syndrome minimal critical region on 22q11. *Hum Mol Genet* **5**:789-800.
- Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., and Weissenbach, J. (1994). The 1993-94 Genethon human genetic linkage map [see comments]. *Nat Genet* **7**:246-339.
- Haaf, T. and Ward, D. C. (1994). Structural analysis of  $\alpha$ -satellite DNA and centromere proteins using extended chromatin and chromosomes. *Hum Mol Genet* **3**:697-709.
- Heiskanen, M., Hellsten, E., Kallioniemi, O.-P., Mäkelä, T. P., Alitalo, K., Peltonen, L., and Palotie, A. (1995). Visual mapping by fiber-FISH. *Genomics* **30**:31-36.
- Heiskanen, M., Karhu, R., Hellsten, E., Peltonen, L., Kallioniemi, O.-P., and Palotie, A. (1994). High resolution mapping using fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibers prepared from agarose-embedded cells. *Biotechniques* **17**:928-934.
- Heng, H. H., Squire, J., and Tsui, L. C. (1992). High-resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:9509-9513.
- Herman, G. E., Greenberg, F., and Ledbetter, D. H. (1988). Multiple congenital anomaly/mental retardation (MCA/MR) syndrome with Goldenhar complex due to a terminal del(22q). *Am J Med Genet* **29**:909-915.

- Hough, C. A., White, B. N., and Holden, J. J. (1995). Absence of lambda immunoglobulin sequences on the supernumerary chromosome of the "cat eye" syndrome. *Am J Med Genet* **58**:277-281.
- Jeffreys, A. J., Wilson, D., and Thein, S. L. (1985). Hypervariable ' minisatellite' regions in human DNA. *Nature* **314**:67-73.
- Junien, C., Vibert, M., Weil, D., Van-Cong, N., and Kaplan, J. C. (1978). Assignment of NADH-cytochrome b5 reductase (DIA1 locus) to human chromosome 22. *Hum Genet* **42**:233-239.
- Kaplan, J. C., Aurias, A., Julier, C., Prieur, M., and Szajnert, M. F. (1987). Human chromosome 22. *J Med Genet* **24**:65-78.
- Kim, U. J., Shizuya, H., Kang, H. L., Choi, S. S., Garrett, C. L., Slink, L. J., Birren, B. W., Korenberg, J. R., Dunham, I., and Simon, M. I. (1996). A bacterial artificial chromosome-based framework contig map of human chromosome 22q. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6297-6301.
- Kirshenbaum, G., Chmura, M., and Rhone, D. P. (1988). Long arm deletion of chromosome 22. *J Med Genet* **25**:780.
- Krizman, D. B. and Berget, S. M. (1993). Efficient selection of 3'-terminal exons from vertebrate DNA. *Nucleic Acids Res* **21**:5198-5202.
- Landegent, J. E., Jansen-in, d. W., Dirks, R. W., Baao, F., and van der, P. M. (1987). Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet* **77**:366-370.
- Lawrence, B. J., Schwabe, W., Kioschis, P., Coy, J. F., Poustka, A., Brennan, M. B., and Hochgeschwender, U. (1994). Rapid identification of gene sequences for transcriptional map assembly by direct cDNA screening of genomic reference libraries. *Hum Mol Genet* **3**:2019-2023.
- Lichter, P., Tang, C. J., Call, K., Hermanson, G., Evans, G. A., Housman, D., and Ward, D. C. (1990). High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* **247**:64-69.
- Lindsay, E. A., Rizzu, P., Antonacci, R., Jurecic, V., Delmas, M. J., Lee, C. C., Kim, U. J., Scambler, P. J., and Baldini, A. (1996). A transcription map in the CATCH22 critical region: identification, mapping, and ordering of four novel transcripts expressed in heart. *Genomics* **32**:104-112.
- McDermid, H. E., Duncan, A. M., Brasch, K. R., Holden, J. J., Magenis, E., Sheehy, R., Burn, J., Kardon, N., Noel, B., Schinzel, A., and et, a. (1986b). Characterization of the supernumerary chromosome in cat eye syndrome. *Science* **232**:646-648.
- McDermid, H. E., Duncan, A. M., Higgins, M. J., Hamerton, J. L., Rector, E., Brasch, K. R., and White, B. N. (1986a). Isolation and characterization of an alpha-satellite repeated sequence from human chromosome 22. *Chromosoma* **94**:228-234.

- Meera-Khan, P., Wijnen, L., and Pearson, P. L. (1978). Assignment of the mitochondrial aconitase gene (ACONm) to human chromosome 22. Human gene mapping 6. *Cytogenet Cell Genet* **22**:121A.
- Metzdorf, R., Gottert, E., and Blin, N. (1988). A novel centromeric repetitive DNA from human chromosome 22. *Chromosoma* **97**:154-158.
- Morton, N. E. (1991). Parameters of the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:7474-7476.
- Mullenbach, R., Pusch, C., Holzmann, K., Suijkerbuijk, R., and Blin, N. (1996). Distribution and linkage of repetitive clusters from the heterochromatic region of human chromosome 22. *Chromosome Res* **4**:282-287.
- Narahara, K., Takahashi, Y., Murakami, M., Tsuji, K., Yokoyama, Y., Murakami, R., Ninomiya, S., and Seino, Y. (1992). Terminal 22q deletion associated with a partial deficiency of arylsulphatase A. *J Med Genet* **29**:432-433.
- Nederlof, P. M., van der, F. S., Wiegant, J., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ploem, J. S., and van der, P. M. (1990). Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* **11**:126-131.
- Nesslinger, N. J., Gorski, J. L., Kurczynski, T. W., Shapira, S. K., Siegel, B. J., Dumanski, J. P., Cullen-RF, J., French, B. N., and McDermid, H. E. (1994). Clinical, cytogenetic, and molecular characterization of seven patients with deletions of chromosome 22q13.3. *Am J Hum Genet* **54**:464-472.
- Neumann, J. R., Mornency, C., and Russian, K. O. (1987). A novel rapid assay for chloramphenicol acetyltransferase gene expression. *Biotechniques* **5**:444.
- NIH/CEPH Collaborative Mapping Group (1992). A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science* **258**:67-86.
- Nowell, P. and Hungerford, D. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocyte leukemia. *Science* **132**:1497-1498.
- Obata, K., Hiraga, H., Nojima, T., Yoshida, M. C., and Abe, S. (1999). Molecular characterization of the genomic breakpoint junction in a t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* **25**:6-15.
- Olson, M., Hood, L., Cantor, C., and Botstein, D. (1989). A common language for physical mapping of the human genome [see comments]. *Science* **245**:1434-1435.
- Parra, I. and Windle, B. (1993). High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nat Genet* **5**:17-21.
- Phelan, M. C., Thomas, G. R., Saul, R. A., Rogers, R. C., Taylor, H. A., Wenger, D. A., and McDermid, H. E. (1992). Cytogenetic, biochemical, and molecular analyses of a 22q13 deletion. *Am J Med Genet* **43**:872-876.

- Pinkel, D., Gray, J. W., Trask, B., van den, E. G., Fuscoe, J., and van Dekken, H. (1986). Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**:151-157.
- Romain, D. R., Goldsmith, J., Cairney, H., Columbano-Green, L. M., Smythe, R. H., and Parfitt, R. G. (1990). Partial monosomy for chromosome 22 in a patient with del(22)(pter----q13.1::q13.33----qter). *J Med Genet* **27**:588-589.
- Rouleau, G. A., Haines, J. L., Bazanowski, A., Colella, C. A., Trofatter, J. A., Wexler, N. S., Conneally, P. M., and Gusella, J. F. (1989). A genetic linkage map of the long arm of human chromosome 22. *Genomics* **4**:1-6.
- Rouleau, G. A., Merel, P., Lutchman, M., Sanson, M., Zucman, J., Marineau, C., Hoang-Xuan, K., Demczuk, S., Desmaze, C., Plougastel, B., Pulst, S. M., Lenoir, G. M., Bijlsma, E. K., Fashold, R., Dumanski, J. P., de Jong, P., Parry, D., Eldridge, R., Aurias, A., Delattre, O., and Thomas, G. (1993). Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* **363**:515-521.
- Rowley, J. D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**:290-293.
- Saccone, S., De Sario, A., della Valle, G., and Bernardi, G. (1992). The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:4913-4917.
- Schmitt, H., Blin, N., Zankl, H., and Scherthan, H. (1994). Telomere length variation in normal and malignant human tissues. *Genes Chromosomes Cancer* **11**:171-177.
- Schröder, K., Schuffenhauer, S., Seidel, H., Bartsch, O., Blin, N., Hinkel, G. K., and Schmitt, H. (1998). Deletion mapping by FISH with BACs in patients with partial monosomy 22q13. *Hum Genet* **102**:557-561.
- Simon, M. P., Pedeutour, F., Sirvent, N., Grosgeorge, J., Minoletti, F., Coindre, J. M., Terrier-Lacombe, M. J., Mandahl, N., Craver, R. D., Blin, N., Sozzi, G., Turc, C. C., O'Brien, K. P., Kedra, D., Fransson, I., Guilbaud, C., and Dumanski, J. P. (1997). Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma. *Nat Genet* **15**:95-98.
- Slaughter, C. A., Povey, S., Carrit, B., Solomon, E., and Bobrow, M. (1978). Assignment of the locus ACONm to chromosome 22. *Cytogenet Cell Genet* **22**:223-225.
- Tommerup, N., Warburg, M., Gieselmann, V., Hansen, B., Koch, J., and Petersen, G. (1992). Ring chromosome 22 and neurofibromatosis. *Clin Genet* **42**:171-177.
- Trask, B., Pinkel, D., and van den Engh, G. (1989). The proximity of DNA sequences in interphase cell nuclei correlated to genomic distance and permits ordering cosmids spanning 250 kilobase pairs. *Genomics* **5**:710-717.

- Trofatter, J. A., MacCollin, M., Rutter, J. L., Murrell, J. R., Duyao, M., Parry, D., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A., Pulaski, K., Haase, C., Ambrose, C., Munroe, D. J., Bove, C., Haines, J. L., Martuza, R., MacDonald, M., Seizinger, B. R., Short, M., Buckler, A., and Gusella, J. F. (1993). A novel moesin-, ecrin-, radixin-like gene is a candidate for the NF2 tumor suppressor. *Cell* **72**:791-800.
- Turc, C. C., Philip, I., Berger, M. P., Philip, T., and Lenoir, G. M. (1984). Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* **12**:1-19.
- van den Engh, G., Sachs, R., and Trask, B. J. (1992). Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by a random walk model. *Science* **257**:1410-1412.
- Walter, M. A., Spillet, D. J., Thomas, P., Weissenbach, J., and Goodfellow, P. N. (1994). A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes. *Nat Genet* **7**:22-28.
- Watt, J. L., Olson, I. A., Johnston, A. W., Ross, H. S., Couzin, D. A., and Stephen, G. S. (1985). A familial pericentric inversion of chromosome 22 with a recombinant subject illustrating a 'pure' partial monosomy syndrome. *J Med Genet* **22**:283-287.
- Waye, J. S. and Willard, H. F. (1989). Human beta satellite DNA: genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6250-6254.
- Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G., and Lathrop, M. (1992). A second generation linkage map of the human genome. *Nature* **359** :794-801.
- Willard, H. F. (1985). Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA. *Am J Hum Genet* **37** :524-532.
- Wilson, D. I., Burn, J., Scambler, P., and Goodship, J. (1993). DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet* **30**:852-856.
- Zang, K. D. (1982). Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* **6** :249-274.
- Zimmermann, U. (1982). Electric field mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochem Biophys Acta* **694**:227.

## Anhang

### A. Geräte

Brutschrank	Bachhofer
Elektroporationsapparatur (Gene Pulser Transfection Apparatus Version 2-89)	BioRad
Elektrophoreseapparatur: Horizon 58 Gibco BRL	
Stromgeber	Consort
Fluoreszenzmikroskop DMRB 46	Leitz
Heizplatte	Bachhofer
Kamera	Leica
Photometer	Pharmacia
Schüttelinkubator	Bachhofer
Sequenzierer ABI377	ABI
sterile Werkbank	BDK, Luft-und Reinraumtechnik
GmbH	
Umkehrmikroskop	Hund, Wetzlar
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Wasserbäder	B. Braun
<i>Zentrifugen</i>	
Sorvall-Zentifuge RC-5C	DuPont
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Biofuge 15 R	Heraeus
Minizentrifuge	Roth

### B. Materialien

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit	ABI
Agarose	Biozym
Ampicillin	Boehringer
Antifade(Vectashield mounting medium for fluorescence)	Vector Lab.
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphatchromogenes Substrat, 50 mg/ml)	Boehringer
Biotin-14-dATP	Boehringer
Biotinylated-anti-Avidin D-Antikörper (hergestellt in Ziege)	Vector Lab.
BSA (96-99% Rinderserumalbumin)	Sigma
CIP (calf intestine alkaline phosphatase)	Boehringer
Colzemid (10µg/ml)	Gibco BRL
Cot 1 DNA (1µg/µl)	Gibco BRL
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma
Deckgläser (20x20 mm; 24x60 mm)	IDL
Dextransulfat-Natriumsalz	Sigma
DMEM-Medium	Gibco BRL
DNA-Isolierungs-Kit	Quiagen
DNaseI	Boehringer
EDTA (MW: 372,2)	Merck

Eppendorfgefäße (1.5ml,0.5ml)	Eppendorf
Essigsäure	Merck
Ethanol, absolut	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Exon-Trapping-Systeme	Gibco BRL
ExtrAvidin-FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	Sigma
Fixogum	Marabu
Formaldehyd (min.35%, säurefrei)	Merck
Genome Priming System (GPS <sup>TM</sup> -1)	New England Biolabs
Glasküvetten	Roth
Glaswolle, silanisiert	Serva
Glucose	Merck
HCl (1N)	Merck
Hexanukleotide	Boehringer
Heringsperma-DNA	Boehringer
Isopropanol	Merck
JetStar MidiPrep Kit	Genomed
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Klenow-Enzym	Boehringer
Metallbox	Roth
MgCL <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Merck
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck
Mixed Bed Resin (AG 501-X8(D) resin; 20-50 mesh)	BioRad
M-Mlv-Reverse Transkriptase	PeqLab
Natriumacetat	Merck
NaCl	Merck
Na <sub>3</sub> Citrat	Sigma
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck
NaOH	Merck
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz; Farbverstärker, 75 mg/ml)	Boehringer
Nylonmembran	Boehringer
Objektträger (76x26 mm)	Assistent
Parafilm	AMerican National Can,Greenwich,
USA	
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Pepsin A	Sigma
Pinzette	Roth
Propidiumiodid (95-98%)	Sigma
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
Ribonuklease-Inhibitor	MBI Fermentas
RNApure	PeqLab
RNase A (aus Rinderpankreas)	Boehringer
SDS	Sigma
Sephadex G-50-Pulver	Pharmacia
Spitzbogen- Streptavidin-AP-Konjugat (1 mg/ml)	BRL
SuperScript II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	Gibco BRL

Taq-Polymerase	Pharmacia, AGS
Tris-HCl (MW: 121,1)	Sigma
TRIzol	Gibco BRL
T4-Ligase	Boehringer
tRNA (aus E.coli MRE 600, Lyophilisat)	Boehringer
Trockenblock	Schleicher und
Schüll	
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Sigma
Uracil-DNA-Glykosylase	Gibco BRL
6-Well-Makroplatten	Greiner
Zentrifugenröhrchen (50ml)	Falcon

## C. Puffer und Lösungen

(soweit nicht im Text angegeben)

### *DNA-Isolierung*

#### LB-Medium:

10g	Bacto-Trypton
5g	Hefe-Extrakt
5g	NaCl (Merck)
1g	Glucose

auf 1l mit H<sub>2</sub>O auffüllen, mischen, autoklavieren, bei 4°C aufbewahren

#### Puffer 1:

50mM	Glucose
25mM	Tris-HCl, pH 8,0
10mM	EDTA, pH 8,0

#### Puffer 2:

1%	SDS
0,2 N	NaOH

#### Puffer 3:

3M KAc in 2M HAc

#### RNase-Stammlösung:

10mg/ml in 10mM Tris-HCl, pH 7.5

15mM NaCl

15 min. bei 100°C kochen, auf RT abkühlen lassen, aliquotieren, bei -20°C aufbewahren

#### TE-Puffer:

10mM	Tris-HCl
1mM	EDTA, pH 8.0

10x TAE-Puffer:

100mM Tris-HCl  
50mM Na-Acetat  
0,1mM EDTA  
pH 8,0 mit Essigsäure einstellen.

Ladepuffer:

3,5ml Glycerin  
0,5ml 10x TAE  
0,05% kristallines Bromphenolblau  
0,05% kristallines Xylencyanol  
40mM EDTA

Längenstandard: 1kb DNA-Ladder (1µg/µl; Gibco, BRL)

10µl Bromphenolblau  
10µl KB-Marker  
80µl H<sub>2</sub>O  
Endkonzentration: 100ng/µl

Färbelösung:

2µg EtBr/ml TAE

***FISH***20x SSC

3M NaCl  
300mM Na-Citrat

Phosphatpuffer

500mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
mit 500mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf den pH 7,2 einstellen, autoklavieren.

Formamid deionisiert:

50 ml Formamid mit ca. 5g Ionenaustauscher (AG 501-X8(D), 20-50 mesh, Bio-Rad) mischen und 1 h bei RT rühren lassen. Durch einen Whatman-Filter filtrieren und in Aliquots abfüllen. Aufbewahrung bei -20 °C.

**D. häufig verwendete Internetseiten**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards-bin/listdiseasecards?search=22&type=chrom>

<http://www.sanger.ac.uk/HGP>

<http://www.caltech.edu/>

<http://www-shgc.stanford.edu/>

<http://www.tigr.org/>

<http://www-genome.wi.mit.edu/>

<http://www.dhgp.de/>

<http://www.rzpd.de/>

<http://www.dkfz-heidelberg.de/>

<http://ftp.genome.washington.edu/>

<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>

<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>

<http://gdbwww.gdb.org/>

## Lebenslauf

### persönliche Daten

Name: Kristina Schröder  
 geboren: 30.06.1970 in Borghorst (NRW)  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: ledig  
 Anschrift: Keplerstrasse 12, 72074 Tübingen Tel: 07071-22532

### Schulbildung

1976-1980 Wulfert-Grundschule, Hemer, NRW  
 1980-1985 Friedrich-Leopold-Woeste-Gymnasium, Hemer, NRW  
 1985-1987 Gertrud-von-le-Fort-Gymnasium, Oberstdorf, Bayern  
 1987-1989 Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth, Bayern

### Studium

11/1989-4/1992 Studium der Biologie bis einschließlich Vordiplom an der Universität Bayreuth  
 4/1992-3/1996 Wechsel an die Eberhard - Karls -Universität Tübingen und Fortsetzung des Studiums der Biologie; Abschluß: Diplom  
 7/1996-dato Promotion am Institut für Anthropologie und Humangenetik, Abt. Molekulare Genetik an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. N. Blin

### Forschungsaufenthalte

2/1995-4/1995 Aufenthalt am California Institute of Technology, Dep. of Biology, Pasadena, Ca.,USA in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Simon  
 9/1996 + 8/1997 Aufenthalt am Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
 4/1998-5/1998 Aufenthalt am IPATIMUP Porto, Portugal

**Betreuer der Dissertation** Prof. Dr. N. Blin