Konstruktion eines Contigs aus künstlichen Hefechromosomen in der Region q31.3-q33.1 des menschlichen Chromosoms 5

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Nicole Herröder
aus Gedern

Giessen 1999

Aus dem medizinischen Zentrum für Klinische Chemie,
Klinische Immunologie und Humangenetik

Institut für Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. Müller
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Müller
Gutachter: Prof. Dr. Preissner

Tag der Disputation: 29. November 1999

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 7

1.1 Das Human Genome Project 7

1.2 Kartierung des menschlichen Genoms 9

1.3 Chromosom 5 13

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit 14

2 MATERIAL 15

2.1 Geräte und Zubehör 15

2.2 Chemikalien 16

2.3 Enzyme 17

2.4 Nukleotide und Radionukleotide 18

2.5 DNA-Größenstandards, Plasmide und Bakterienstämme 18

2.6 Kits 18

2.7 Lösungen und Nährmedien 18

2.8 YAC-Bibliothek 22

3 METHODEN 23

3.1 Kultivierung der Hefe-Kolonien 23

3.1.1 Anziehen der Hefen auf Agarplatten 23

3.1.2 Präparation von Hefe-Flüssigkulturen 23

3.1.3 Präparation von Glycerin-Stocks aus Hefe-Flüssigkulturen 23

3.2 DNA-Isolierung 24

3.2.1 Präparation von DNA aus Hefen 24

3.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA 26

3.3 Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen 27

3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten 28

3.4.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese 28

3.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 30

3.4.3 Pulsed Field-Gelelektrophorese (PFGE) 32

3.5 Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1988) 35

3.5.1 Prinzipien der PCR 35

3.5.2 Amplifikation spezifischer Sequenzen durch PCR mit unmarkierten Nukleotiden (dNTPs) - sogenannte ‘Kalt-PCR’ 37

3.5.3 PCR mit radioaktiv-markiertem Nukleotidmix (‘Heiß-PCR’) 38

3.5.4 Inverse PCR 39

3.6 Screening von YAC-Bibliotheken 40
3.7 Southern-Blot 41
3.8 Hybridisierung 42
3.8.1 Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde 43
3.8.2 Hybridisierung mit nicht-radioaktiver, ECL-markierter Sonde 45
3.9 Autoradiographie 49
3.10 Einschleusen von DNA in Bakterienzellen 49
3.10.1 Präparation kompetenter *E. coli* Zellen 49
3.10.2 Transformation von Bakterienzellen 50
3.10.3 Selektion transformierter Zellen 51
3.11 YAC-Endfragment-Isolierung 52
3.11.1 Inverse PCR 52
3.11.2 Klonierung der PCR-Produkte 56
3.12 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode 57
3.13 Oligonukleotid-Präzipitation 61

4 ERGEBNISSE 63

4.1 Screening der YAC-Banken - Identifikation von YAC-Klonen für den Bereich 5q31.3-q33.1 63
4.1.1 Etablierung von PCR-Bedingungen 63
4.1.2 Isolierung der YACs 63
4.2 Isolierung von YAC-Endfragmenten 68
4.3 Größenbestimmung von YAC-DNA mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) und Hybridisierung 71
4.3.1 Elektrophoresebedingungen 71
4.3.2 Hybridisierung und Auswertung 72
4.4 Erstellung des YAC-Contigs 75

5 DISKUSSION 81

5.1 Konstruktion eines YAC-Contigs im Bereich 5q31-q33 81
5.1.1 Screening der YAC-Banken mit Hilfe der PCR 81
5.1.2 Chimäre YAC-Klone 82
5.1.3 Isolierung von Endfragmenten 83
5.1.4 Erstellen des YAC-Contigs 84
5.1.5 Ausblick 85

5.2 Chancen und Risiken des Human Genome Project 87
5.2.1 Bedeutung des Human Genome Project für die Medizin 87
5.2.2 Ethische, soziale und rechtliche Implikationen 88
6 ZUSAMMENFASSUNG 90
7 LITERATURVERZEICHNIS 92
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 99
LEBENSLAUF 101
DANKSAGUNG 103

1 EINLEITUNG

1.1 Das Human Genome Project

Der Begriff ‘menschliches Genom’ umfaßt die gesamte genetische Information, d.h. den DNA-Gehalt einer menschlichen Zelle. Die DNA verteilt sich dabei auf den Zellkern, der mehr als 99 % der gesamten Zell-DNA enthält, sowie auf die Mitochondrien. Man schätzt, daß auf den 23 Chromosomenpaaren des Zellkerns ca. 50.000-100.000 Gene lokalisiert sind und die Gesamtzahl der Basenpaare pro haploidem Genom bei etwa 3 Milliarden liegt.

Die vollständige Charakterisierung des menschlichen Genoms mittels Kartierung und DNA-Sequenzierung ist Ziel des Human Genome Project.

Zurückführen läßt sich die Entwicklung des Genomprojektes auf eine Tagung in Alta, USA (1984) bzw. auf den der Tagung folgenden Bericht *Technologies for Detecting Heritable Mutations in Human Beings*, der die Bedeutung einer ‘Referenzsequenz’ des menschlichen Genoms zum Ausdruck brachte.
Die Idee, das gesamte Genom von Homo sapiens zu entschlüsseln, wurde v.a. anfänglich mit einiger Skepsis aufgenommen und stand im Mittelpunkt zahlreicher Diskussionen. Limitierend für die Umsetzung des Vorhabens waren zu diesem Zeitpunkt die existierenden biomedizinischen bzw. gentechnologischen Forschungsressourcen sowie die vorhandenen finanziellen Mittel.
1987 legte das *US Department of Energy (DOE)* einen Bericht über die Human Genome Initiative vor, ein Jahr später veröffentlichte das *Office of Technology Assessment* eine detaillierte Analyse der für die Genom‘erforschung’ erforderlichen wissenschaftlichen und technologischen Fortschritte.
Im selben Jahr noch (1988) bewilligte der amerikanische Kongress Gelder für die Durchführung des Human Genome Project, das, auf 15 Jahre angelegt, im Oktober 1990 formal begann.

Ziele des Human Genome Project

Das *U.S. National Center for Genome Resources (NCGR)* beschreibt das Genomprojekt als ein multidisziplinäres Vorhaben, das dazu dienen wird, die Grundlagen und Prinzipien menschlicher Genetik besser zu verstehen, das die Entwicklung einer 'molekularen Medizin' in den Bereichen Prävention, Diagnostik und Therapie ermöglichen und Fortschritte auf dem Umwelt- und Industriesektor bewirken wird.

Die spezifizierten Ziele für das Genomprojekt umfassen im wesentlichen folgende Punkte:

- Erstellung hoch aufgelöster genetischer Karten des menschlichen Genoms
- Erstellung hoch aufgelöster physikalischer Karten des menschlichen Genoms
- Bestimmung der gesamten Sequenz des menschlichen Genoms
- Lokalisierung der geschätzten 50.000-100.000 Gene
- Bestimmung der Sequenz bzw. Erstellung genetischer / physikalischer Karten des Genoms verschiedener Modellorganismen, z.B *Escherichia coli, Caenorhabditis elegans* und der Maus
- Weiterentwicklung von Datenbanken, Software und Tools, die die Arbeit mit gewonnenen Daten vereinfachen (Analyse, Speicherung, Zugang, Verbreitung etc.)
- Entwicklung neuer Technologien sowie Technologie-Transfer, u.a. durch multidisziplinäre Zusammenarbeit und Zusammenarbeit mit verschiedenen Zweigen der Industrie
- Ausbildungsförderung bzw. Training qualifizierter Wissenschaftler
- Identifikation, Definition und Analyse ethischer, sozialer und rechtlicher Fragestellungen in bezug auf das Genomprojekt. Entwicklung von Lösungsstrategien, Förderung der Diskussion dieser Inhalte in der Öffentlichkeit u.a.

Entsprechend dem Vorbild der USA wurden auch in anderen Ländern Projekte zur Erforschung des menschlichen Genoms initiiert. So beteiligen sich heute u.a. Frankreich, Großbritannien, Deutschland, Italien, die Niederlande, die skandinavischen Länder, Australien, China, Japan, Kanada, Korea, Mexiko, Neuseeland und Rußland am Human Genome Project.
Koordiniert werden die Aktivitäten der verschiedenen Länder von der Human Genome Organisation (HUGO), die 1988 gegründet wurde.

HUGO koordiniert nicht nur die internationale Zusammenarbeit, sondern fördert auch den Austausch von Forschungsdaten und -materialien und unterstützt durch Trainingsprogramme die Verbreitung neuer Technologien. Zu den Aufgaben der Human Genome Organisation gehört zudem die Förderung der öffentlichen Diskussion und die Bereitstellung von Information über die möglichen ethischen, sozialen, rechtlichen, kommerziellen und natürlich wissenschaftlichen Folgen des Human Genome Project.

1.2 Kartierung des menschlichen Genoms

Wie bereits aufgeführt, ist die Erstellung hoch aufgelöster genetischer und physikalischer Karten eines der primären Ziele des Human Genome Project.

Genetische Karten

Eine genetische Karte besteht aus polymorphen DNA-Markern, die sich in definierten Abständen über den kartierten Genom-Bereich erstrecken. Der Nutzen einer solchen genetischen Karte besteht vor allem in der vereinfachten Lokalisierung von Krankheitsgenen im Rahmen von Kopplungsanalysen (Hoffman, 1994).

Kopplungsanalysen untersuchen, ob zwei Loci, beispielsweise ein defektes Gen und ein DNA-Marker, gemeinsam, also gekoppelt, vererbt werden. Sie sind die meist verbreitete Lokalisierungsmethode von Genen bei Erbkrankheiten.
Die Untersuchung von Kopplungsverhältnissen basiert auf dem Prinzip, daß Gene bzw. Marker dann gekoppelt vererbt werden, wenn sie auf einem Chromosom in enger Nachbarschaft zueinander liegen (White et al., 1988). Anders formuliert: Je weiter zwei Marker auf einem Chromosom voneinander entfernt liegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß sie während der Meiose durch Crossing-over-Vorgänge getrennt werden (unter Crossing-over versteht man den Austausch von DNA-Abschnitten zwischen zusammengelagerten homologen Chromosomen). Die Häufigkeit der Rekombination bzw. des Austausches dieser Marker stellt daher ein Maß für den Abstand der Marker auf dem Chromosom dar.

Sind zwei Loci vollständig gekoppelt, beträgt die Rekombinationshäufigkeit (θ) Null. Sind sie nicht gekoppelt, kann θ maximal den Wert 0,5 = 50 % annehmen. Die Loci werden in diesem Fall mit der gleichen Wahrscheinlichkeit entweder gemeinsam oder getrennt vererbt.
Die Abstände der Marker werden in Centimorgan (cM) gemessen: Werden zwei Gene mit einer Frequenz von 1% rekombiniert, beträgt ihr Abstand auf der genetischen Karte definitionsgemäß ein Centimorgan (1 cM). Im menschlichen Genom entspricht 1 cM im Durchschnitt etwa der Länge einer Megabase.
Die Kartenabstände der Marker sind jedoch als relativ einzuschätzen, da die Rekombinationshäufigkeiten von zahlreichen Faktoren beeinflußt werden. So können Rekombinationsereignisse beispielsweise durch sog. *Hot Spots*, Sequenzen, die außergewöhnlich häufig rekombinieren, begünstigt werden. Weiterhin treten im Telomerbereich im allgemeinen mehr Rekombinationen auf als in Centromernähe.

Dienten früher vor allem Protein-Polymorphismen wie z.B. die HLA-Antigene als Marker in Kopplungsanalysen, stehen heute mit den DNA-Polymorphismen Marker zur Verfügung, mit denen sich Kopplungen im gesamten menschlichen Genom nachweisen lassen (Botstein et al., 1980; White et al., 1988). Als DNA-Marker verwendet werden u.a. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs), Minisatelliten-Marker (*variable numbers of tandem repeats*, VNTRs) sowie Mikrosatelliten-Marker (*short tandem repeat polymorphisms*, STRPs). STRPs setzen sich zusammen aus hochpolymorphen Di-, Tri- oder Tetranukleotiden, die mit Locus-spezifischen Primern in der PCR amplifiziert werden.

Physikalische Karten

Im Gegensatz zu den genetischen Karten werden auf physikalischen Karten die Abstände der verschiedenen Loci voneinander in Basenpaaren gemessen. Physikalische Karten können auf verschiedene Arten erstellt werden:
Verfahren, wie z.B. die chromosomale Zuordnung von DNA-Sequenzen mittels somatischer Hybridzellen oder die Durchflußcytometrie ermöglichen eine Genom-Kartierung im Bereich von einigen Megabasen Länge. Um eine höhere Auflösung der physikalischen Karte zu erreichen, bedient man sich u.a der Kartierung mittels Strahlungshybriden und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), sowie der Kartierung durch Anordnung von Schnittstellen verschiedener

Restriktionsendonucleasen und STS-Markern, die eine Auflösung unter einer Megabase erlauben. Am Ende steht die DNA-Sequenzierung, mit deren Hilfe man die lineare Folge der einzelnen Nukleotide bestimmen und damit die endgültige physikalische Karte erstellen kann.

Ein Zwischenziel auf dem Weg zur endgültigen physikalischen Karte umfaßt die Erstellung von Contig-Karten für jedes Chromosom. Unter einem Contig (*contiguous region*) versteht man eine Anordnung von einander überlappenden DNA-Klonen, die einen bestimmten Bereich eines Chromosoms lückenlos abdecken.
Besonders geeignet für die Konstruktion von Contigs sind die Klone künstlicher Hefechromosomen (*Yeast Artificial Chromosomes*, YACs), die DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 2 Mb aufnehmen können (s.u.).

Um Überlappungen zwischen DNA-Klonen feststellen zu können, bedient man sich häufig sogenannter sequenzmarkierter Stellen (*sequence-tagged sites*, STSs). Dabei handelt es sich um nur einmal im Genom vorkommende DNA-Sequenzen, die sich durch einen spezifischen PCR-Test nachweisen lassen. Zwei DNA-Klone, die in einer PCR-Analyse positiv für eine sequenzmarkierte Stelle getestet werden, überlappen in diesem Bereich mit fast 100 %iger Wahrscheinlichkeit.
Die STS-Sequenzen, zu denen auch die bereits erwähnten Mikrosatelliten-Marker (STRPs) zählen, stellen eine Art ‘Bindeglied’ dar zwischen genetischen und physikalischen Karten, da sich jeder bereits kartierte Marker in die ‘gemeinsame’ Sprache der STS-Marker übersetzen läßt (Olson et al., 1989).

Beim ‘*chromosome walking’* (Chromosomenwanderung) bewegt man sich von einem bekannten Punkt aus schrittweise am Chromsom entlang: Mit Randsequenzen bzw. randnahen Sequenzen bereits isolierter und auf dem Chromosom angeordneter DNA-Klone durchsucht man genomische Banken nach überlappenden Klonen. Von den gefundenen Klonen isoliert man dann von demjenigen Klon, der in der gewünschten Richtung über den bekannten Bereich hinausragt, eine entsprechende DNA-Sequenz, z.B. ein Endfragment oder einen randnahen STS-Marker und mustert die genomische Bank erneut nach überlappenden Klonen durch. Die kontinuierliche Wiederholung dieser Schritte ermöglicht die Identifizierung bzw. Abdeckung von DNA-Sequenzabschnitten bis in den Megabasenbereich.

Durch die Konstruktion eines Contigs erhält man die chromosomale Region, die das Contig umfaßt, als lückenlose Aneinanderreihung klonierter DNA-Fragmente. Dies vereinfacht die spätere Suche nach codierenden Sequenzen und somit die Identifikation gesuchter Gene und stellt die Voraussetzung zur Sequenzierung dieser Bereiche dar.

Yeast Artificial Chromosomes (YACs)

Künstliche Hefechromosomen (*Yeast Artificial Chromosomes*, YACs) stellen Klonierungsvektoren dar, die durch ihre Fähigkeit, sehr große DNA-Fragmente aufzunehmen, eine zentrale Rolle bei der Kartierung und Analyse des menschlichen Genoms einnehmen (Schlessinger, 1990).
So lassen sich in herkömmlichen Vektorsystemen DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 10 kb (Plasmide), 20 kb (Phagen), 30-44 kb (Cosmide), 70-100 kb (Bakteriophagen), 130-150 kb (künstliche P1-Chromosomen - PACs) bis hin zu 300 kb (künstliche Bakterienchromosomen - BACs) klonieren. Im Gegensatz dazu kann ein YAC DNA von bis zu 2 Mb Größe aufnehmen.

Ein YAC-Vektor enthält folgende Elemente (Murray et al., 1988):

- Ein Centromer (CEN), an dem sich während Mitose und Meiose die Spindelfasern anheften.
- Zwei Telomere (TEL). Unter Telomeren versteht man an den Enden des Chromosoms liegende repetitive DNA-Sequenzen, die die vollständige Replikation des Chromosoms sichern und die terminale DNA vor Abbau schützen sollen.
- Autonom replizierende Sequenzen (ARS), die zur autonomen Replikation von (Fremd-) DNA benötigt werden.
- Selektierbare Marker, z.B. TRP1 und URA3, die der Wirtszelle die Fähigkeit verleihen, auch in Abwesenheit dieser Nährstoffe wachsen zu können. Dadurch lassen sich diejenigen Zellen identifizieren, die ein YAC enthalten.
- Eine Klonierungsstelle, an der die Fremd-DNA mit den beiden Vektorarmen ligiert wird.

Abb. 1: Schematischer Aufbau eines *Yeast artificial chromosome*

Die Länge der Vektorarme ist in obiger Abbildung nicht maßstabsgetreu dargestellt, da die Arme insgesamt ca. 10 kb lang sind und das DNA-Insert bis zu 2 Mb groß sein kann.

Die YACs verhalten sich wie normale Hefechromosomen. Sie werden bei jeder Mitose der Hefezelle repliziert und besitzen zudem die Fähigkeit zur autonomen Replikation (s.o.).

1.3 Chromosom 5

Im Rahmen der Kartierung des menschlichen Genoms sowie durch Untersuchungen genetisch bedingter Erkrankungen, konnten dem Chromosom 5 mittlerweile zahlreiche Krankheitsgene sowie Gene für biologisch essentielle Regulationsprozesse zugeordnet werden (z.B. Coussens et al., 1986; Swallow et al., 1988; Swaroop et al., 1993). Das Interesse richtet sich vor allem auf den langen Arm des Chromosoms, wo beispielsweise im Bereich 5q21 das Gen für die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder im Bereich 5q34-q35 das Homöoboxgen MSX2, verantwortlich für die Craniosynosotose des Boston Typs, gemappt werden konnten (Jabs et al., 1993; Müller et al., 1993).

In der Region 5q31-q33 konnten die Gene TCOF1 und DTDST lokalisiert werden, deren Mutation zur Ausbildung des Treacher Collins Syndroms führt (The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group, 1996; Loftus et al., 1996) sowie das für die diastrophische Dysplasie (DTD) verantwortliche Gen (Hästbacka et al., 1994). 5q31-q33 gilt zudem als kritischer Bereich des Verlustes von Genen durch Deletion und Translokationsbruchpunkte bezogen auf das 5q-Syndrom, einer myelodysplastischen Erkrankung (Boultwood et al., 1994 a, b).

Weiterhin konnten dieser Region zahlreiche Gene für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Hormonrezeptoren und Neurotransmitterrezeptoren zugeordnet werden (Warrington et al., 1992; Kostrzewa et al., 1996 und 1998).

Das gehäufte Vorkommen dieser Wachstumsfaktor- und Rezeptorgene läßt vermuten, daß dieser distale Bereich des Chromosoms noch andere, bisher unentdeckte Gene dieser Gruppe enthalten könnte, die im Laufe der Evolution durch Konversion, Duplikation und Divergenz entstanden sind.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein YAC-Contig der Region 5q31-q33 erstellt werden.

Um YAC-Klone mit DNA-Inserts der fraglichen chromosomalen Region zu isolieren, sollten im ersten Schritt genomische YAC-Bibliotheken durch PCR mit DNA-Markern bzw. Genen, die dem Bereich 5q31-q33 bereits zugeordnet waren, gescreent, d.h. durchmustert werden. Die Anordnung der YACs sollte durch STS-Gehalt-Kartierung erfolgen (Klone, die für denselben Marker positiv sind, müssen überlappende Sequenzen besitzen) sowie durch Integration bereits veröffentlichter physikalischer Karten. Um bestehende Lücken innerhalb des Contigs zu schließen, sollten mit Hilfe der inversen PCR YAC-Endfragmente isoliert und in STS-Marker konvertiert werden. Diese sollten dann für ein erneutes Screening der YAC-Bibliotheken eingesetzt werden.

2 MATERIAL

2.1 Geräte und Zubehör

Agarose-Gelelektrophorese	
• Horizontal Gel Elektrophoresis System	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
• Spannungsquelle	Biometra, Göttingen
Biometra UNO Thermoblock	Biometra, Göttingen
Bioprint-System	Mitsubishi, Japan
Brutschränke	
• BK 5060 E	Heraeus, Hanau
• Vacutherm	Heraeus, Hanau
Cronex medical X-Ray Film	Du Pont, Dreieich
Cronex Röntgenkassetten	Du Pont, Dreieich
Cronex MD-Developer	Du Pont, Bad Homburg
Cronex MF-E-Fixer	Du Pont, Bad Homburg
DNA-Meßgerät: GeneQuantII	Pharmacia Biotech, Freiburg
Geiger-Müller-Zählrohr: Mini Monitor Series 900	American Bioanalytical, Natrick, USA
Heizrührer MEA 11	INDL
Hybridisierungsofen 5	Bachofer, Reutlingen
Inkubationsschüttler	Infors, Bottmingen, Schweiz
ORBIT Shaker 3520	LABLINE Instruments, USA
PFGE-Apparatur: CHEF DR III System	BioRad, Richmond, USA
ph-Meter 761 Calimetic	Knick, Berlin
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
• Gibco S2-Sequenzgelkammer	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
• Spannungsquelle	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Slab Gel Dryer	Hoefer Scientific Inst., San Francisco, USA
Sterilbank	Köttermann, Flörsheim

Techne Dri-Block DB 3	Keutz, Reiskirchen
Thermocycler	
• Biometra UNO Thermoblock	Biometra, Göttingen
• DNA Thermocycler	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
UV-Transluminator 2011 Macrovue	LKB, St. Gabriel, USA
Vortexer RS 11	INDL
Waage PM 400	Mettler, New Jersey, USA
Wasserbad	Köttermann, Uetze-Hänigssen
Wippe ADAMS Nutator	Becton Dickinson, Parsippany, USA
Zentrifugen	
• Biofuge 13 R	Heraeus, Hanau
• Biofuge A	Heraeus, Hanau
• Cryofuge 5000	Heraeus, Hanau

2.2 Chemikalien

Acrylease	Stratagene, La Jolla, USA
Acrylamidgel-40-Stammlösung	Roth, Karlsruhe
Agar Agar	Serva, Heidelberg
Agarose (LMP, Ultra pure)	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Agarose NA	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Agarose NuSieve GTG	Biozym, Oldendorf
Ammoniumacetat	Sigma, Dreisenhofen
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin (Binotal®)	Bayer, Leverkusen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Riedel-de haen, Seelze
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Chemie, Dreisenhofen
DTT	Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Flucha-Chemie, Buchs, Schweiz
Glucose (D+)	Merck, Darmstadt
Glycerin (87%)	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hybond-N+-Nylonmembran	Amersham, UK

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Sigma-Chemie, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Chemie, Taufkirchen
MOPS	Sigma, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma, St. Louis, USA
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Dreisenhofen
Rubidiumchlorid	Sigma-Chemie, Taufkirchen
Saccharose (D+)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sarcosyl	Sigma, St. Louis, USA
SDS	Serva, Heidelberg
Sigmacote	Sigma, Dreisenhofen
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris Base	Sigma, St. Louis, USA
Tris HCl	USB, Braunschweig
Trypton (Bacto-)	Difco, Detroit, USA
Whatman 3MM-Papier	Schleicher u. Schuell, Dassel
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Yeast Extract (Bacto-)	Difco, Detroit, USA

2.3 Enzyme

Klenow-Fragment	Boehringer, Mannheim
Novozym	Sigma, St. Louis, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
RNAse A	Serva, Heidelberg
T4-Ligase	Boehringer, Mannheim
T4-Polynukleotid-Kinase	USB, Braunschweig
Taq-Polymerase	selbstpräparierte rekombinante Taq-Polymerase sowie Amersham, Braunschweig

2.4 Nukleotide und Radionukleotide

Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Promega, Heidelberg
Oligonukleotide (Primer)	MWG Biotech, Ebersberg, Institut für Virologie, Gießen Imperial Cancer Research Fund, Oxford, England
Radionukleotide α-^{32}P-dCTP, α-^{35}S-dATP	Amersham, Braunschweig

2.5 DNA-Größenstandards, Plasmide und Bakterienstämme

Lambda-DNA	Biolabs, Schwalbach
pUC18	Pharmacia, Freiburg
pBluescript SK+	Stratagene, La Jolla, USA
E. coli JM83	Stratagene, La Jolla, USA

2.6 Kits

ECL	Amersham, Braunschweig
Random Primers DNA Labeling System	Gibco BRL, Berlin
T7-Sequenzing-Kit	Pharmacia, Freiburg

2.7 Lösungen und Nährmedien

Ampicillin-Stammlösung (500 x)	50 mg/ml ddH_2O, Lagerung bei -20 ºC
Denaturierungslösung	100 g NaOH 146,1 g NaCl A. bidest. ad 5 l
DNA-Auftragspuffer (10x) (TAE-Gele)	200 µl 50x TAE 500 µl Glycerin (87%) 300 µl ddH_2O + 1 Spatelspitze Bromphenolblau/ Xylencyanol

DNA-Auftragspuffer (10x) (TBE-Gele)	50 % Saccharose 10x TBE 1 M Harnstoff 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol
DNA-Extraktionspuffer	40 ml 1 M Tris, pH 8,0 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 20 ml 5 M NaCl A. bidest. ad 1000 ml, steril filtrieren und bei 4 ºC lagern
dYT - Medium	16 g Trypton 10 g Yeast Extract 10 g NaCl A. bidest. ad 1000 ml
dYT - Agar - Platten	500 ml dYT- Medium 7,5 g Agar • Ansatz autoklavieren, auf ca. 50 ºC abkühlen lassen, • Zugabe von 2 ml Ampicillin-Stammlsg. 1 ml X-Gal-Stammlsg.
Ethidiumbromidstammlösung	5 mg/ml in A. bidest.
Ethidiumbromidfärbelösung	1 l Laufpuffer (TAE oder TBE) 400 µl Ethidiumbromidstammlsg.
Hybridisierungslösung (Boehringer)	5x SSC 0,1 % Sarcosyl 0,02 % SDS 1 % Blocking Reagent, bei -20 ºC lagern
Hybridisierungslösung (ECL)	500 ml Hybridisierungslsg. (Amersham) 14,61 g NaCl (= 0,5 M) 25 g Blocking Reagent, 1 h rühren, danach bei 42 ºC lösen, bei -20 ºC lagern
MP-Lösung I	50 mM Glucose 25 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA Dinatriumsalz
MP-Lösung II	0,4 M NaOH 2 % SDS, im Verhältnis 1:1 frisch ansetzen

MP-Lösung III	60 ml 5 M KAc 11,5 ml Eisessig 28,5 ml dd H_2O, mit Eisessig auf pH 4,8 einstellen, bei 4 ºC lagern
Neutralisierungslösung	175 g NaCl 50,45 g Tris-Base 328,35 g Tris-HCl A. bidest. ad 5 l, mit Salzsäure auf pH 7,0 einstellen
RNAse A	10 mg/ml Ribonuklease A in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 15 mM NaCl, abkühlen lassen, aliquotieren und bei -20 °C lagern
1 x SCE	182,2 g Sorbitol (1 M) 100 ml 1 M NaCitrat, pH 5,8 (0,1 M) 20 ml 0,5 M EDTA, pH 7,6 (0,01 M) A. bidest. ad 1000 ml, autoklavieren
20 x SSC	3,0 M NaCl 0,3 M NaCitrat, mit Salzsäure auf pH 7,0 einstellen
Stoppuffer für Hot-PCR	80 % Formamid 10 mM NaOH 1 mM EDTA 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol
50 x TAE	242,0 g Tris 18,6 g EDTA Dinatriumsalz A. bidest. ad 1000 ml, autoklavieren
10 x TBE	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 0,025 M EDTA pH 8,2-8,5
1 x TE	10 mM Tris/HCl, pH 7,6 1 mM EDTA Dinatriumsalz, autoklavieren

1x TE + RNAse A	100 ml 1x TE + 250 µl RNAse A [10 mg/ml], bei 4 ºC lagern
TFB I - Puffer	100 mM $RbCl_2$ 50 mM $MnCl_2$ 30 mM KAc 10 mM $CaCl_2$, mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen, autoklavieren, bei 4 ºC lagern
TFB II - Puffer	10 mM $RbCl_2$ 10 mM MOPS 75 mM $CaCl_2$ 15 % Glycerin, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren, bei 4 ºC lagern
X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml in Dimethylformamid
10x (-) Ura, (-) Trp - Stammlösung	jede Aminosäure-Lösung separat mit ddH_2O ansetzen, autoklavieren und bei 4 ºC lagern

Aminosäure	Konzentration [mg/ml]	benötigtes Volumen für 100 ml Stammlösung [ml]
L-Tyrosin	0,5	60
Adenin	7,5	3
L-Arginin	7,5	3
L-Histidin	7,5	3
L-Methionin	7,5	3
L-Lysin	7,5	4
L-Phenylalanin	7,5	7
L-Leucin	7,5	8
L-Valin	20	8
L-Isoleucin	7,5	4

Tab. 1: Benötigtes Volumen der einzelnen Aminosäure-Lösungen für 100 ml 10x (-) Ura, (-) Trp - Stammlösung

Yeast Nitrogen Base - Stammlösung	6,7 % Yeast Nitrogen Base in ddH_2O lösen, sterilfiltrieren
(-) Ura, (-) Trp Yeast Medium	2 g Glucose in 80 ml ddH_2O lösen, autoklavieren, 10 ml 10x (-) Ura, (-) Trp - Stammlösung 10 ml Yeast Nitrogen Base - Stammlösung zugeben
(-) Ura, (-) Trp Agar Platten	2 g Glucose 2 g Agarose 80 ml ddH_2O Ansatz autoklavieren, auf ca. 50 ºC abkühlen lassen, 10 ml 10x (-) Ura, (-) Trp - Stammlösung 10 ml Yeast Nitrogen Base - Stammlösung zugeben

2.8 YAC-Bibliotheken

Die YAC-Banken bzw. bereits isolierte YACs, die im Rahmen dieser Arbeit gescreent wurden, wurden zur Verfügung gestellt von:

- Dr. Anthony Monaco, Imperial Cancer Research Fund (ICRF), Oxford, England
- Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH), Paris, Frankreich
- Imperial Chemical Industries (ICI), England

3 METHODEN

3.1 Kultivierung der Hefe-Kolonien

3.1.1 Anziehen der Hefen auf Agarplatten

Mit Hilfe einer sterilen Impföse wurden Zellen aus der YAC-Kolonie entnommen und auf (-)Ura, (-)Trp-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden danach zwei bis drei Tage lang bei 30 °C inkubiert und konnten anschließend bei 4 °C gelagert werden.

3.1.2 Präparation von Hefe-Flüssigkulturen

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine einzelne YAC-Kolonie von einer Agarplatte gepickt und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben, das 20 ml (-) Ura, (-) Trp Hefe-Medium enthielt. Die Hefekultur wurde dann etwa drei Tage lang bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler angezogen.

3.1.3 Präparation von Glycerin-Stocks aus Hefe-Flüssigkulturen

500 µl YAC-Flüssigkultur wurden zu 500 µl (-) Ura, (-) Trp Hefe-Medium, das 30 % Glycerin enthielt, gegeben. Der Ansatz wurde mind. 1 h gemischt, dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Durch die Zugabe von Glycerin zu den Hefe-Flüssigkulturen wird die Bildung von Kristallen vermieden, die zu einer Zerstörung der Zellen führen könnte.

3.2 DNA-Isolierung

3.2.1 Präparation von DNA aus Hefen

3.2.1.1 Flüssig-DNA

Die Hefe-Flüssigkulturen (s. 3.1.2) wurden bei 2500 rpm 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Pellet in 20 ml 1x TE resuspendiert und die Lösung erneut zentrifugiert (2500 rpm, 10 min). Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet in 475 µl DNA-Extraktionspuffer und 25 µl 20 %igem SDS gelöst. Der Ansatz wurde anschließend für 3 h bei 60 °C im Wasserbad inkubiert (Lyse der Hefezellen).

Um die Proteine aus dem Zellextrakt zu entfernen, erfolgte nun die Phenol-Chloroform-Extraktion: Dem Zellextrakt wurde ein Volumenanteil Phenol (ca. 500 µl) zugegeben und die Lösung 20 min auf der 'Wippe' gemischt. Die Phasen wurden dann durch Zentrifugation getrennt (2500 rpm, 10 min), wobei die Proteine sich als weißliche Interphase absetzten. Die DNA und RNA enthaltende obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein Eppendorf-Cup überführt, mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (ca. 500 µl) auf der 'Wippe' 15 min lang gemischt und anschließend abzentrifugiert (13000 rpm, 10 min). Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cup gegeben, mit 1,5 Volumen Chloroform (ca. 750 µl) 10 min lang gemischt und erneut abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min). Die obere Phase wurde wieder in ein neues Eppendorf-Cup gegeben, mit 3 M Natriumactetat (1/10 Volumen) und 2 Volumen 100 %igem Ethanol gemischt und die DNA bei -20 °C gefällt (ca. 20-30 min) → DNA fällt aus Lösungen aus, in denen der Ethanolgehalt mindestens 70 % beträgt und die Salzkonzentration genügend hoch ist, da die Salze der DNA die Hydrathülle entziehen. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 10 min) und Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (13000 rpm, 5 min), unter der Clean Bench getrocknet und nach Zugabe von 500 µl 1x TE/RNAse A im Wasserbad (50 °C) mindestens 15 min gelöst.
Um Qualität und Quantität der DNA-Präparation zu prüfen, wurde 1 µl der DNA auf ein 0,8-1 %iges Agarosegel aufgetragen.

3.2.1.2 'Schnell-Präparation' von Hefe-DNA

Mit einer sterilen Pipettenspitze bzw. einem sterilen Zahnstocher wurde eine kleine Menge einer Hefe-Kolonie gepickt und in ein Eppendorf-Cup gegeben, in das man zuvor 150 µl ddH_2O pipettiert hatte. Der Ansatz wurde in kochendem Wasser 10 min lang inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und bei 13000 rpm 5 min zentrifugiert. 2 µl des Überstandes dienten als PCR-Template.

3.2.1.3 Präparation von Agarose-Blöckchen für PFGE

Zu Beginn wurde die über 3 Tage angezogene YAC-Flüssigkultur (30-40 ml, Protokoll s. 3.1.2) bei 2000 rpm 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 ml 1x TE resuspendiert. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (2000 rpm, 10 min), der Überstand dekantiert und das Pellet in 20 ml 1x SCE gelöst. Ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte (2000 rpm, 10 min). Parallel dazu wurde 1,5 %ige LMP-Agarose in 1x SCE angesetzt und nach dem Aufkochen im Wasserbad bei 52-54 °C flüssig gehalten. Nach Ende der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe abgenommen und das Pellet in 800 µl 1x SCE + Novozym (8 mg/ml) resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurde 1 Volumen der flüssigen LMP-Agarose gegeben. Man mischte beides und pipettierte dann dieses Gemisch zügig in 'Blöckchenformer'
(ca. 80 µl pro Slot bzw. Blöckchen). Die Formen stellte man dann auf Eis und ließ die Blöckchen erstarren.

Die erstarrten Blöckchen wurden in 5 ml einer SCE/DTT-Lösung gegeben (1x SCE + 10 mM DTT) und 1 h im 37 °C Wasserbad inkubiert. Die SCE/DTT-Lösung wurde abgegossen und die Blöckchen in ca. 5 ml Proteinase-K-Lösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 24-48 h im 50 °C Wasserbad.

Proteinase-K-Lösung (100 ml): 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
1 g Sarcosyl
100 mg Proteinase K

Die Proteinase-K-Lösung wurde abgegossen und die Blöckchen zweimal 15 min mit 5 ml 1x TE bei RT gewaschen. Danach inkubierte man die Agaroseblöckchen 30 min lang bei 50 °C in 5 ml einer TE/PMSF-Lösung und wiederholte den Vorgang im Anschluß.

TE/PMSF-Lösung (100 ml): 4 mg PMSF in 200 µl 100 %igem Ethanol lösen, in 100 ml 1x TE geben

Zum Abschluß wurden die Blöckchen in 5 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 gewaschen.
Die Lagerung der Blöckchen erfolgte bei 4 °C ebenfalls in 0,5 M EDTA.

3.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979, modifiziert).
Je 1 Eppendorf-Cup wurde mit 1,7 ml einer Bakterien-Übernachtkultur beschickt, die dann 1 min lang bei 8000 rpm abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das Pellet durch Vortexen in 100 µl Lösung I resuspendiert und bei RT 5 min lang inkubiert. 200 µl Lösung II wurden zugegeben, und nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 5 min auf Eis gestellt (→ vollständiger Zellaufschluß durch Lyse mit SDS und Denaturierung der DNA durch NaOH). Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wurde der Ansatz gemischt und nochmals 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die präzipitierten Bestandteile (chromosomale DNA und Protein-K-SDS-Komplex) durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) pelletiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup, in dem bereits 1 Volumen Phenol/Chloroform vorgelegt war (ca. 500 µl), pipettiert und gründlich gemischt. Nach erneutem Zentrifugieren (13000 rpm, 5 min) wurde die obere wäßrige Phase in ein neues Eppendorf-Cup gegeben. Die DNA wurde in 1 ml absolutem Ethanol gefällt und anschließend durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in 150 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (13000 rpm, 5 min), unter der Clean Bench getrocknet und in 100 µl 1x TE/RNAse A 30 min lang bei 37 °C im Wasserbad gelöst. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend durch Restriktionsverdau überprüft.

3.3 Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Als Restriktionsendonukleasen bezeichnet man bakterielle Enzyme, die die DNA in der Regel an sämtlichen Stellen schneiden, die eine für sie spezifische Nucleotidsequenz aufweisen.
Diese Erkennungssequenzen, in der Regel vier bis acht Basenpaare lang, sind normalerweise Palindrome, d.h., die Basenfolge in 5' → 3' Richtung ist auf beiden Strängen die gleiche. Liegt die Schnittstelle exakt auf der Symmetrieachse, entstehen Restriktionsfragmente mit glatten Enden; stimmen Schnittstelle und Symmetrieachse nicht überein, besitzen die entstandenen Fragmente überhängende Enden. Diese überhängenden Enden werden auch als 'klebrig' oder 'kohäsiv' bezeichnet, da sie wegen ihrer komplementären Basensequenz dazu tendieren, sich zusammenzulagern oder sich mit anderen komplementären Enden zu verbinden, was man sich z.B. bei Klonierungen zunutze macht.

Typischer Ansatz eines Restriktionsverdaus zur Überprüfung einer Plasmid-Minipräparation:

2,0 µl Plasmid-DNA
1,0 µl 10x Restriktionspuffer entsprechender Ionenstärke
6,8 µl A. bidest.
0,2 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)

→ 10,0 µl Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und dann auf einem 0,8 - 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und überprüft.

3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird.

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates negativ geladen und wandern daher im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Dabei wirkt die Gelmatrix aufgrund ihrer Porenstruktur wie ein Molekularsieb: größere Moleküle bewegen sich langsamer durch die Gelporen hindurch als kleine Moleküle, ihre Wanderung kann sogar vollständig blockiert sein.
Die Porengröße wird in Agarosegelen durch die Agarose-Konzentration bestimmt, wobei die Größe der Poren mit steigender Konzentration des Gels abnimmt. Bei Polyacrylamidgelen wird die Porengröße entsprechend von der Konzentration des Acrylamids sowie vom Vernetzungsgrad des Gels bestimmt.
Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird im wesentlichen bestimmt von Molekülgröße und Gelkonzentration sowie von der Konformation der DNA (linear, zirkulär, supercoil), der angelegten Spannung und dem verwendeten Laufpuffer.

3.4.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Neutrale Gele aus Agarose erlauben die Trennung von DNA-Fragmenten in einem Bereich von ca. 70 bp bis zu etwa 50 kb. Größere Moleküle werden nicht mehr aufgelöst, da sie nicht weit genug ins Gel eindringen können. Sie wandern zusammen in der sogenannten ‘Kompressionszone’.

Um die aufgetrennten Fragmente im Gel direkt sichtbar zu machen, fügt man dem Gel 0,5-1 µg/ml Ethidiumbromid hinzu (Ethidiumbromid ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff). Nach Anregung mit UV-Licht von 254 oder 302 nm Wellenlänge fluoresziert der Ethidiumbromid-DNA-Komplex im sichtbaren Licht (590 nm) als rot-orangefarbige Bande. Da die Intensität des emittierten Lichtes proportional zur Menge der in der DNA interkalierten Ethidiumbromidmoleküle ist, kann die Konzentration einer DNA-Bande durch Vergleich mit Banden bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

Die Größe der DNA-Fragmente wird mit Hilfe von Längenstandards bestimmt, die zusammen mit den DNA-Proben auf das Gel aufgetragen werden.

Fragmentgrößen des Längenstandards Lambda/HindIII (bp):
23130 - 9416 - 6557 - 4361 - 2322 - 2027 - 564 - 125

3.4.1.1 Überprüfung von PCR-Produkten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung von PCR-Produkten erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der Proben auf einem Agarosegel. Die Konzentration der Agarose wurde entsprechend der zu erwartenden Größe des PCR-Produktes gewählt, sie lag in der Regel zwischen 1 und 2 %.

Durchführung:
Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Dem etwas abgekühlten, noch flüssigen Gel wurde Ethidiumbromid beigemischt (ca. 3 µl / 25ml) und die Lösung wurde dann langsam unter Vermeidung von Luftblasen in die vorbereitete Gelform gegossen. Anschließend wurde der Kamm gesteckt.
Nach Erstarren des Gels wurde dieser Kamm wieder vorsichtig gezogen und der Gelschlitten mit dem Gel in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.
Den zu testenden PCR-Ansätzen wurde 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer zugefügt. 10-20 µl dieses Gesamtansatzes wurden auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard diente mit HindIII verdaute Lambda-DNA (450 ng/µl).
Der Elektrophoreselauf erfolgte bei ca. 60 - 80 Volt. Zu Dokumentationszwecken wurden die Gele anschließend mit einem Bioprint-System auf einem UV-Transilluminator photographiert.

3.4.1.2 Überprüfung von Restriktionsverdaus

Die Restriktionsverdaus wurden in der Regel auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt, wobei die Vorgehensweise der oben beschriebenen Gel-Elektrophorese von PCR-Proben entspricht.

3.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamidgele zeichnen sich gegenüber Agarosegelen durch ein größeres Auftrennungsvermögen aus. Sie eignen sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von ca. 10 bp bis 2000 bp.
Polyacrylamid entsteht durch Polymerisation von Acrylamid-Polymeren. Die entsprechenden Gele werden durch Quervernetzung mit bifunktionalen Verbindungen wie z.B N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) erhalten. Bis vernetzt die Ketten des Acrylamids untereinander und stellt so die dreidimensionale Struktur des Netzwerks des Gels her. Gestartet wird diese Polymerisation durch Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED): TEMED katalysiert die Bildung freier Radikale aus dem Persulfat, die die Polymerisierung initiieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden 6 %ige denaturierende Polyacrylamidgele für die elektrophoretische Auftrennung von radioaktiven PCR-Produkten sowie für die Analyse von DNA-Sequenzierungen verwendet.
Diese Gele enthalten Harnstoff in einer Konzentration von 7,5 M. Durch seine Eigenschaft Wasserstoffbrücken zu brechen, verhindert Harnstoff die Bildung von Sekundärstrukturen der DNA. Die Auftrennung der DNA im Gel wird daher nur durch die Molekülgröße bestimmt.

Durchführung:

(1) Gießen des Gels

Die zum Gießen des Gels verwendeten Glasplatten wurden mit Waschdetergenz, A.bidest., 70 %igem und 100 %igem Ethanol zuerst gründlich gereinigt und dann silikonisiert. Die längere Platte wurde hierzu mit Sigmacote (Fa. Sigma) behandelt, die kürzere mit Acrylease (Fa. Stratagene). Da Acrylease stärker wasserabweisend wirkt als Sigmacote, bleibt das Gel beim Trennen der Glasplatten nach dem Gellauf an der längeren Platte haften.
Auf die längere der beiden Glasplatten wurden nun Spacer (Abstandshalter) gelegt, die durch ihre Dicke von 0,4 mm die Dicke des Gels bestimmten. Die Spacer wurden an den beiden Seitenrändern sowie am unteren Rand der Glasplatte angebracht und ihre Stoßkanten mit Vaseline abgedichtet. Die kurze Platte wurde auf die längere aufgelegt und mit Klammern fixiert.

Die Gellösung wurde mit APS und TEMED versetzt, gemischt und zügig mit einer 25 ml-Glaspipette zwischen die Glasplatten gegossen. Man steckte die Kämme am oberen Rand und ließ das Gel dann bei RT ca. 1 h auspolymerisieren.

(2) Vorlauf

Die Klammern und der untere Spacer wurden entfernt, die Kämme gezogen und mit den Zähnen nach unten wieder gesteckt. Das Gel wurde in die Gelapparatur eingespannt und Laufpuffer wurde eingefüllt. Um eventuell vorhandene Gel- oder Harnstoffreste zu entfernen, wurden die Geltaschen noch mit Puffer ausgespült.

Man startete einen Vorlauf von 15-30 min bei ca. 60 Watt, durch den sich das Gel und die Glasplatten gleichmäßig erwärmten.

(3) Elektrophorese

Die Geltaschen wurden erneut mit Puffer gespült, die Proben aufgetragen (ca. 4 µl pro Probe) und der Lauf gestartet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Leistung von ca. 55 Watt. Die Laufzeit betrug 1,5-2 h bei PCR-Produkten und 1,5 h (kurze Läufe) bzw. 5 h (lange Läufe) bei Sequenzierungen.

(4) Nachbehandlung

Nach beendetem Lauf wurden die Glasplatten getrennt: die kürzere Platte wurde vorsichtig abgehoben, sodaß das Gel auf der unteren längeren Platte haften blieb. Das Gel wurde 10 min in 10 %iger Essigsäure fixiert, danach auf Whatman-Papier übertragen, mit Klarsichtfolie überzogen und auf einem Vakuumtrockner getrocknet (ca. 45 min bei 80 ºC).

Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mittels Autoradiographie.

Benötigte Lösungen:

6 %ige Gelstammlösung:	375 ml 10 M Harnstoff
	75 ml Acrylamid-Stammlösung (38 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid)
	50 ml 10x TBE
Gelansatz pro Gel:	60 ml Gelstammlösung
	30 µl TEMED
	500 µl APS

Acetatpuffer:	50 ml 10x TBE 100 ml 3 M NaAc ddH_2O ad 600 ml
Puffer (Gelapparatur):	obere Kammer: 0,5x TBE untere Kammer: 0,5x TBE (Sequenzierung) bzw. Acetatpuffer (PCR-Produkte)

3.4.3 Pulsed Field-Gelelektrophorese (PFGE)

Der Siebeffekt, auf dem die Trennung der DNA bei konventionellen Gelelektrophoresen im wesentlichen beruht, nimmt bei DNA-Fragmenten ab einer Größe von ca. 20 kb immer mehr ab: Die Moleküle können die Poren der Gelmatrix immer schlechter passieren. Hochmolekulare DNA ab einer Größe von 30 kb wird praktisch nicht mehr aufgetrennt.
Die elektrophoretische Auftrennung auch hochmolekularer DNA, unter Umständen Fragmente, die mehrere Megabasen umfassen, wird jedoch durch den Einsatz der Pulsfeld-Gelelektrophorese möglich (Schwartz und Cantor, 1984).

Für die PFGE benötigt man eine spezielle Elektrophorese-Apparatur, da in der Elektrophoresekammer zwei elektrische Felder in einem bestimmten Winkel zueinander angelegt und im Wechsel (in 'Pulsen') angeschaltet werden. Die DNA-Moleküle werden dadurch gezwungen, sich in definierten Zeitintervallen, den Pulsen, im elektrischen Feld neu zu orientieren, bevor sie ihre 'Wanderung' durch das Gel in Richtung des neuen Feldes fortsetzen können. Da sich kleine Moleküle schneller orientieren können als große, bleibt ihnen während eines Pulses mehr Zeit, um sich fortzubewegen: Kleine Moleküle wandern schneller und damit weiter im Gel als große.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA hängt in erster Linie von der Pulsdauer sowie von der angelegten Spannung ab und kann daher durch Änderung dieser Parameter wesentlich beeinflußt werden. Variation von Laufzeit, Puffertyp, Gel- und Pufferkonzentration ermöglichen eine Optimierung der Auftrennung.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die von Chu und Mitarbeitern 1986 entwickelte CHEF-Apparatur (‘*contour clamped homogenous electrical field’*) verwendet, bei der die Elektroden hexagonal angeordnet sind. Sie täuschen das Verhalten von zwei unendlich langen Elektrodenpaaren vor, die sich im Winkel von 60º kreuzen und für ein homogenes elektrisches Feld sorgen.

Die CHEF-Apparatur ermöglicht es zudem, die Pulsdauer (Switch-Zeit) während der Elektrophorese kontinuierlich zu verändern, d.h., die ‘*Switch*-Zeiten’ werden mit zunehmender Elektrophoresedauer länger. Das Resultat ist ein vergrößerter Auftrennungsbereich.

3.4.3.1 Größenbestimmung der YACs mittels PFGE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pulsed-Field-Gel-Elektrophorese eingesetzt, um die Größe der in der Contig-Karte angeordneten YACs zu bestimmen.

Hierzu wurde ein Agarosegel mit Agarose-Blöckchen beladen (1/2 Blöckchen pro Tasche), die die fragliche YAC-DNA enthielten (s. 3.2.1.3, Präparation von YAC-DNA in Form von Agarose-Blöckchen). Die hochmolekulare DNA wurde dann durch PFGE aufgetrennt. Die Laufbedingungen der PFGE wurden während dieser Arbeit optimiert und sind im Ergebnisteil näher erläutert.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, indem man es für ca. 30 min in eine Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml in 0,5x TBE) legte und anschließend 10 min in A. bidest. entfärbte. Zum Schluß wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

Im folgenden wurde die aufgetrennte DNA aus dem Gel auf eine Membran transferiert (s. Southern-Blotting, 3.7), gegen gesamtmenschliche DNA hybridisiert (vgl. 3.8) und mit Hilfe der Autoradiographie nachgewiesen.

Die YAC-Größe wurde nun berechnet, indem man die Entfernung zwischen Geltasche und Signal auf dem Röntgenfilm mit der auf dem Photo dokumentierten Entfernung verglich. Die natürlichen Hefechromosomen mit ihrer definierten Größe sowie ein Lineal, das man dem Elektrophorese-Gel seitlich angelegt und mit-photographiert hatte, dienten hierbei als Interpretationshilfe.

PFGE-Agarosegel: 1 % Agarose in 0,5x TBE
kein Ethidiumbromid-Zusatz

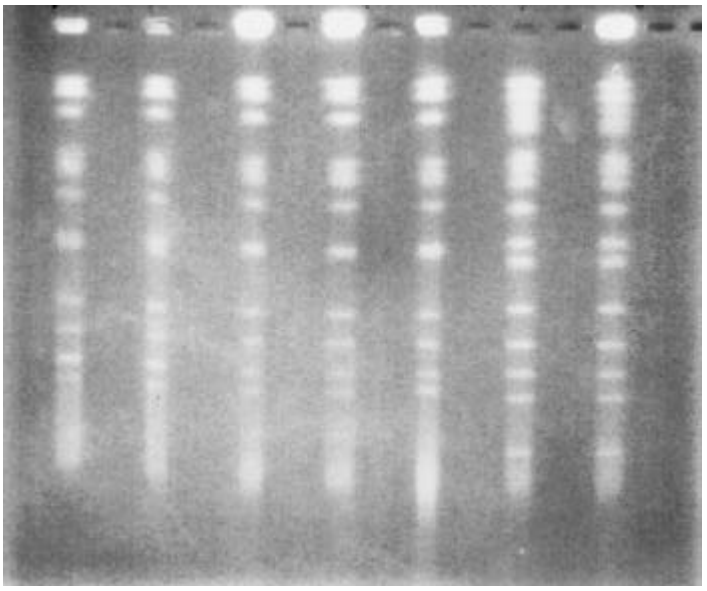


Abb. 2: Unter UV-Licht photographiertes Pulsed-Field-Gel. Die Banden entsprechen den aufgetrennten Fragmenten der Hefechromosomen.

3.5 Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1988)

3.5.1 Prinzipien der PCR

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist ein in vitro-Verfahren zur gezielten Vervielfältigung definierter Ziel-DNA-Sequenzen. Voraussetzung ist jedoch, daß die Sequenzen an den Enden des ausgewählten Bereiches bekannt sind, da Oligonukleotide (ca. 20mer) synthetisiert werden müssen, die als sog. 'Primer' die Zielregion einrahmen. Die beiden Primer werden so gewählt, daß sie antiparallel zueinander jeweils an einen der beiden DNA-Stränge hybridisieren. Die DNA-Polymerase verlängert dann in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang des DNA-Stranges und synthetisiert so neue komplementäre DNA-Stränge. Diese neu synthetisierten Stränge dienen in den folgenden PCR-Zyklen selbst als Matrizen für die weitere DNA-Synthese.

Die heute am häufigsten eingesetzte DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus (Taq*-Polymerase). Dieses Enzym besitzt ein Temperaturoptimum von über 70 ºC und ist für kurze Zeit bei Temperaturen von bis zu 95 ºC stabil. Sie muß daher bei Beginn eines neues Amplifikationszyklus dem Reaktionsgemisch nicht neu zugegeben werden, sondern bleibt während einer kompletten Serie von Zyklen aktiv:

1. Schritt: Denaturierung
Das Reaktionsgemisch wird auf 94 ºC erhitzt $\rightarrow$ die DNA-Stränge trennen sich vollständig voneinander und bilden die Matrize für Primer und DNA-Polymerase.

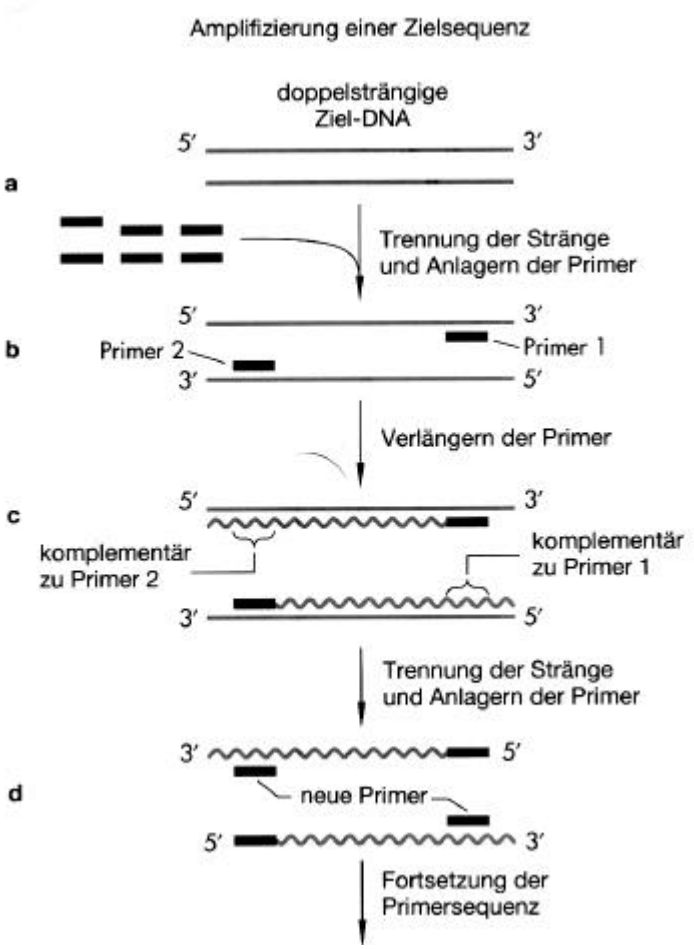
2.Schritt: Annealing
Die Temperatur wird für 30-60 sec auf ca. 40-65 °C gesenkt, damit die Primer sich an die komplementären DNA-Sequenzen binden können. Diese 'Annealing-Temperatur' hat entscheidenden Einfluß auf die Spezifität der PCR: Je höher die Temperatur ist, desto spezifischer lagern sich die Primer an.

3. Schritt: Extention

Erhöhung der Temperatur auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase von 72 °C für 1-5 min → die Polymerase synthetisiert neue zur Matrize komplementäre DNA-Stränge.

Am Ende dieses Synthese-Schrittes erhöht man die Temperatur wieder auf 94 °C - im Gegensatz zur 'Anfangsdenaturierung', die 5 min beträgt, allerdings nur für ca. 30 sec. Ursprünglicher und neu-synthetisierter Strang trennen sich voneinander und dienen im nächsten Zyklus (erneut) als Matrize.

Nach Ende des letzten Zyklus erfolgt noch die sogenannte 'final extention': bei 72 °C (5-10 min) werden alle bis dahin nur unvollständig verlängerten DNA-Stränge vervollständigt. Der gesamte Zyklus - Denaturierung, Annealing, Extension - wird in der Regel 25-35 mal wiederholt und führt zu einer exponentiellen, ca. 10^6 bis 10^7-fachen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragmentes (s. Abb.3).



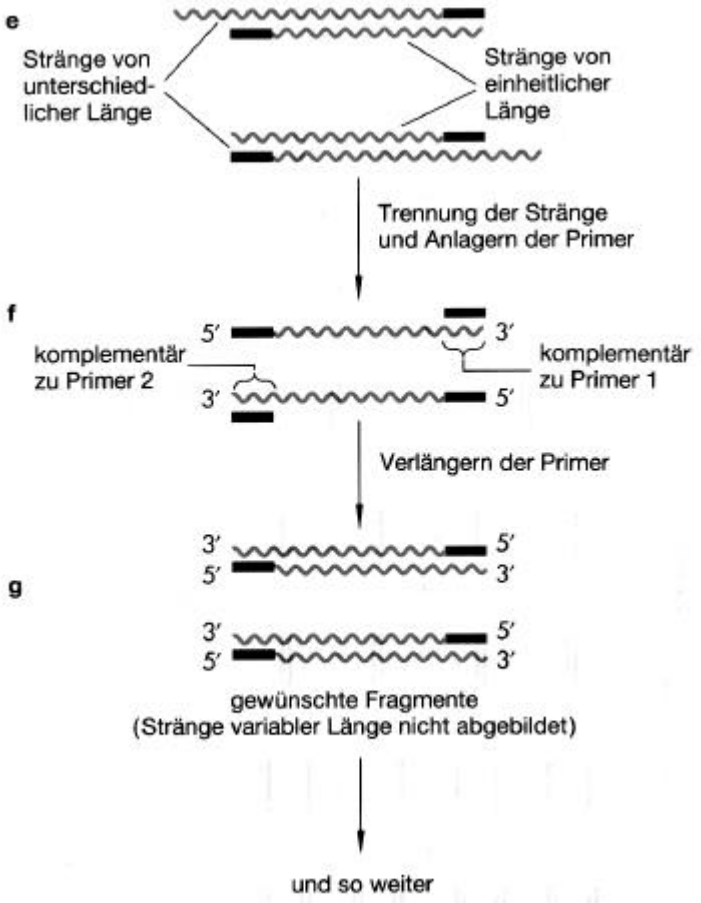


Abb. 3: Prinzip der PCR

(aus Watson et al., Rekombinierte DNA, 2. Auflage 1993, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

3.5.2 Amplifikation spezifischer Sequenzen durch PCR mit unmarkierten Nukleotiden (dNTPs) - sogenannte 'Kalt-PCR'

Der Ansatz erfolgte in Mikrotiterplatten: 0,5-1µl DNA-Template (YAC-DNA bzw. XY-Kontroll-DNA) wurden jeweils vorgelegt. Ein Gesamtreaktionsgemisch, der sog. 'Pre-Mix', wurde entsprechend der Probenanzahl angesetzt und anschließend auf die Proben verteilt. Das Volumen pro Ansatz betrug 20 µl.

Pre-Mix:	4,0 µl	Nukleotid-Mix*
	2,0 µl	10x Taq-Puffer
	1,0 µl	Primer A (15 pmol/µl)
	1,0 µl	Primer B (15 pmol/µl)
	0,5 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
	ad 20 µl	ddH_2O
	(je nach Primer-Bedingungen + 0,8-1,6 µl 25 mM $MgCl_2$)	

Die PCR-Bedingungen der verschiedenen Primer, auch der bereits veröffentlichten, wurden durch PCR mit gesamtmenschlicher DNA als Template ausgetestet und sind im Ergebnisteil näher aufgeführt (s. 4.1.1).

Nukleotid-Mix:	dATP 10 mM	50 µl
	dGTP 10 mM	50 µl
	dCTP 10 mM	50 µl
	dTTP 10 mM	50 µl
	A. bidest.	ad 400 µl

Um Verdunstung zu verhindern, wurden die Reaktionsansätze mit je einem Tropfen Mineralöl überschichtet und unter folgenden Bedingungen im Thermocycler amplifiziert:

Programm des Heizblocks:

$T_{0:}$	94 ºC	3 min	
$T_{1:}$	94 ºC	30 sec	
T_2:	50-63ºC	1 min	(Primer-spezifisch)
$T_{3:}$	72 ºC	30 sec	(Phase T1-T3: idR 30 Zyklen)
$T_{4:}$	72 ºC	5 min	
T_5	16 ºC	∞	

Nachgewiesen und charakterisiert wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese.

3.5.3 PCR mit radioaktiv-markiertem Nukleotidmix (‘Heiß-PCR’)

Die sog. ‘Heiß-PCR’ unterscheidet sich von der oben beschriebenen PCR dadurch, daß der verwendete Nukleotidmix radioaktiv-markiertes dCTP (α-^{32}P dCTP) enthält. Das Prinzip

entspricht dem der nicht-radioaktiven PCR, wobei der Einsatz von Radioaktivität die Charakterisierung der PCR-Produkte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie ermöglicht.

Pro Ansatz wurde 1 µl Template-DNA in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und 19 µl Pre-Mix wurden zugegeben. Der Gesamtansatz (20 µl) wurde mit Mineralöl überschichtet und entsprechend den Bedingungen der 'Kalt-PCR' amplifiziert.

Nach erfolgter Amplifikation wurden dem Reaktionsansatz 3 µl Stoppuffer zugegeben. Die Proben wurden dann 3 min lang bei 94° C denaturiert, auf Eis abgekühlt und bis zur Elektrophorese bei -20° C gelagert.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Leistung von 50-55 Watt und einer Laufzeit von ca. 1,5-2 h.
Autoradiographie: über Nacht bei -80° C, ggf. mit Verstärkerfolie.

Pre-Mix:	'Heiß'-Nukleotidmix	4 µl
	10x Taq-Puffer	2 µl
	Primer A (15 pmol/µl)	1 µl
	Primer B (15 pmol/µl)	1 µl
	α-^{32}P dCTP (10 µCi/µl)	0,1 µl
	Taq-Polymerase (5U/µl)	0.5 µl
	A. bidest.	ad 20 ml
	(je nach Primer-Bedingungen Zugabe von 0,8-1,6 µl 25 mM $MgCl_2$)	

'Heiß'-Nukleotidmix:	dATP	10 mM	50 µl
	dGTP	10 mM	50 µl
	dTTP	10 mM	50 µl
	dCTP	10 mM	4 µl
	A. bidest.		ad 400 ml

3.5.4 Inverse PCR

Ausführliche Beschreibung in Kapitel 3.11.1.

3.6 Screening von YAC-Bibliotheken

ICRF-Bank

Die im Rahmen dieser Arbeit zu screenende ICRF-YAC-Bank umfaßt ca. 16.000 einzelne YAC-Klone. Diese einzelnen Klone sind auf 164 Mikrotiterplatten verteilt. Um das Durchsuchen der Bank zu erleichtern, sind die 96 Klone einer Mikrotiterplatte in einem Sekundärpool vereinigt. Vier dieser Sekundärpools sind wiederum zu einem Primärpool zusammengefaßt.

Das Durchsuchen der ICRF-YAC-Bank nach positiven Klonen für die verschiedenen DNA-Marker erfolgte mittels 'Heiß'-PCR in drei Schritten: Man screente zunächst die insgesamt 41 Primärpools. Ergab ein Primärpool ein positives Signal, screente man im nächsten Schritt die entsprechenden vier Sekundärpools. Da ein Sekundärpool wie oben beschrieben die 96 YAC-Klone einer Mikrotiterplatte vereinigt, führte die Durchmusterung der korrespondierenden Platte zur Identifikation des positiven Klons.

'Rows and Columns PCR'

Um das Screening der Mikrotiterplatte zu vereinfachen, gab man eine kleine Menge der Hefekolonien jeweils einer Reihe ('row') in ein gemeinsames Eppendorf-Cup. Entsprechend ging man bei den Spalten ('columns') vor. Man isolierte dann die DNA in den insgesamt 20 Eppendorf-Cups mittels 'Schnell-Präparation' (s. 3.2.1.2) und setzte 2 µl davon als Template für die PCR ein. Die Koordinate von positiver Reihe und positiver Spalte definierte den positiven YAC-Klon.

CEPH-Bank

Der erste Schritt bestand ebenfalls im Durchmustern der Primärpools (insgesamt 32) mit Hilfe der PCR. Die positiven Pools wurden CEPH übermittelt, die dann ihrerseits das Screening fortsetzten. Unter den von CEPH als potentiell positiv eingestuften YACs identifizierte man den positiven Klon bzw. die positiven Klone wiederum durch PCR.

3.7 Southern-Blot

Als Southern-Blot bezeichnet man ein nach E.M. Southern (1975) benanntes Verfahren, bei dem DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, denaturiert und auf eine immobilisierende Nitrocellulose- oder Nylonmembran übertragen werden. Das im Gel erhaltene Trennmuster der DNA-Fragmente bleibt dabei erhalten (s. Abb. 6).
Im Rahmen dieser Arbeit diente das Southern-Blotting zur Größenbestimmung der YACs.

Durchführung:

(1) Nach Auftrennung der YAC-DNA durch Pulsed Field-Gelelektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht mit angelegtem Lineal fotografiert. Letzteres ermöglichte später, nach erfolgter Hybridisierung, die DNA-Banden auf dem Agarose-Gel den entsprechenden Signalen auf dem Autoradiogramm zuordnen zu können.
Um die DNA zu denaturieren, wurde das Gel für jeweils 1 h in Denaturierungslösung und danach in Neutralisierungslösung geschwenkt. Im Anschluß wurde das Gel nach folgendem Schema geblottet:

(2) Aufbauen der Blotting-Apparatur:

- Eine mit 20x SSC (Transferpuffer) gefüllte Kunststoffwanne ‘überbrückte’ man mit einer Glasplatte, auf die man dann ein mit 20x SSC angefeuchtetes Whatman-Papier so legte, daß beide Enden in das Pufferreservoir eintauchten.
- Unter Vermeidung von Luftblasen wurde nun das Gel mit den Geltaschen nach unten auf das Whatman-Papier gelegt.
- Die Gelränder dichtete man mit Parafilm oder Aluminiumfolie ab, um den direkten Kontakt (‘Kurzschluß’) zwischen den ober- und unterhalb des Gels liegenden Filterpapieren bzw. Papierhandtüchern zu vermeiden.
- Anschließend legte man eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran (Hybond N+) luftblasenfrei auf das Gel.
- Auf diese Membran gab man dann zwei weitere der Gelgröße entsprechende und mit 20x SSC getränkte Whatman Papiere

- Zum Schluß legte man einen Stapel trockener, saugfähiger Papiertücher obenauf und beschwerte den Aufbau mit einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 1 kg.
- Den zusammengebauten Blot ließ man in der Regel über Nacht stehen.

(3) Abbauen des Blots und Fixieren der Membran:

Vorsichtig wurden die Papiertücher, die jetzt durchnäßt sein mußten, und die Whatman-Filterpapiere entfernt. Man markierte nun die Positionen der Geltaschen auf der Membran (nicht auf der DNA-Seite) und beschriftete die erste rechte Tasche mit einer spiegelverkehrten '1'.
Anschließend wurde die Membran vorsichtig vom Gel abgezogen und die DNA fixiert, indem
a) die Nylonmembran mit der DNA-Seite nach oben auf Whatman-Papier getrocknet und dann 2 h lang bei 80 °C 'gebacken' wurde (Lagerung der Membran im Anschluß bei RT) oder
b) die Membran mit der DNA-Seite nach oben für ca. 20 min auf Whatman-Papier gelegt wurde, das mit 0,4 M NaOH getränkt war (alkalische Fixierung). Anschließend spülte man die Membran kurz (ca.1 min) mit 2x SSC, trocknete sie in Folie ein und lagerte sie bis zur Hybridisierung bei RT.

3.8 Hybridisierung

Die molekulare Hybridisierung ermöglicht es, mit einer markierten DNA-Sonde Nukleinsäuremoleküle in einer Ziel-DNA nachzuweisen, deren Sequenzen komplementär zur Basenfolge der Sonde sind.
Die Methode beruht darauf, daß sich die denaturierte Sonde an die komplementäre Region der Ziel-DNA bindet (hybridisiert) und man diese markierte Heteroduplex abhängig von der Markierungsmethode durch Autoradiographie oder Chemolumineszenz nachweisen kann (s. Abb. 6).
Im Rahmen dieser Arbeit diente die Hybridisierung der Identifikation und Größenbestimmung von YACs auf Pulsed Field-Gelen.

3.8.1 Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde

3.8.1.1 Random Primed DNA-Labeling

Diese Art der radioaktiven DNA-Markierung (Feinberg und Vogelstein, 1983) basiert auf der zufälligen Hybridisierung von Hexanukleotiden unterschiedlichster Sequenzen an die zu markierende DNA: Die einzelnen Hexanukleotide (= Primer) binden sich an komplementäre Sequenzen der denaturierten Ausgangs-DNA. Durch Primerextension mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I setzt dann in Gegenwart aller vier dNTPs, von denen mindestens eines radioaktiv markiert ist, die Synthese neuer komplementärer Stränge ein. Dies führt zu einer einheitlichen und kompletten DNA-Markierung.
Eingesetzt wurde das ‘Random Primers DNA Labeling System’ der Fa. Gibco BRL.

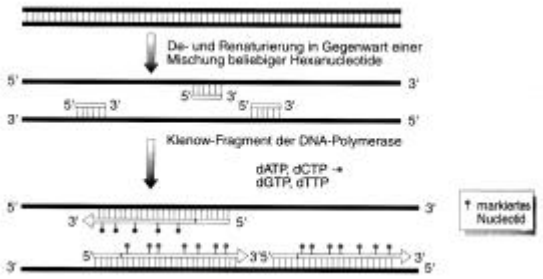


Abb. 4: Prinzip der Random Primed DNA-Markierung

(aus Strachan, T., Read, A.P. (1996), Molekulare Humangenetik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

Durchführung:

(nach Protokoll des Herstellers, modifiziert)

Zur Markierung wurden ca. 50 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Die DNA wurde mit sterilem A. bidest verdünnt und bei 95 °C 5 min denaturiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung kurz zentrifugiert und, um eine Renaturierung zu vermeiden, auf Eis gestellt.

Markierungs-Ansatz:	denaturierte DNA	25 µl
	Random Primers Buffer Mix	15 µl
	dATP (0,5 mM)	2 µl
	dGTP (0,5 mM)	2 µl
	dTTP (0,5 mM)	2 µl
	α-32P-dCTP (10 µCi/µl)	3 µl
	Klenow-Enzym (3 U/µl)	1 µl

Der Ansatz wurde für ca. 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde danach durch Zugabe von 5 µl Stoppuffer beendet.

Um die nicht eingebauten Nukleotide, die zu einer unerwünschten Erhöhung des Hintergrundes führen würden, zu entfernen, wurde der Ansatz im Anschluß an die Markierungsreaktion mit 27,5 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 165 µl 100 %igem Ethanol gefällt und die DNA durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm pelletiert.

Man gab dann den Überstand in ein neues Eppendorf-Cup und verglich die Radioaktivität beider Reaktionsgefäße mit dem Geiger-Müller-Zählrohr. Bei gutem Einbau wies das Pellet mit der markierten DNA mehr Radioaktivität auf als der Überstand, der die nicht eingebauten Nukleotide enthielt.

Anschließend wurde das Pellet mit 150 µl 70 %igem EtOH zweimal gewaschen, getrocknet und in 100 µl 1x TE 15 min lang bei 37 °C gelöst. Die Sonde wurde noch denaturiert (10 min, 95 °C) und auf Eis abgekühlt und konnte dann zur Hybridisierungslösung gegeben werden.

3.8.1.2 Durchführung der Hybridisierung

(1) Vorhybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung inkubiert man die Membran mit der fixierten DNA für einige Stunden mit einer Prähybridisierungslösung ohne Zugabe einer Sonde. Man sättigt dadurch unspezifische Bindungsstellen der DNA ab und vermindert so unspezifische Bindungen der Sonde an den Filter:

Die Membran wurde für mindestens 2 h mit ca. 20 ml Hybridisierungslösung (Boehringer) -hier als Prähybridisierungslösung verwendet- pro 100 cm^2 Filtergröße bei 66-67 °C inkubiert.

Der Filter wurde dafür zusammen mit der Hybridisierungslösung in einen in seinen Abmessungen an die Filtergröße angepaßten Folienschlauch eingeschweißt und im Schüttelwasserbad inkubiert.

(2) Hybridisierung

Die zur Vorhybridisierung benutzte Lösung wurde verworfen und durch neue Hybridisierungslösung ersetzt (ca. 2,5 ml / 100 cm^2 Filter). Man gab dann die radioaktiv markierte Sonde dazu und inkubierte den Filter üN bei 65-68 °C im Schüttelwasserbad.

(3) Waschen des Filters

Das Waschen nach der Hybridisierung dient dazu, überschüssige Sonde und unspezifische Bindungen zu entfernen. Man kann die Stringenz der Waschbedingungen erhöhen und so die Trennung fehlgepaarter Heteroduplices verstärken, indem man die Salzkonzentration der Waschlösung senkt und die Temperatur erhöht.
Gewaschen wurde der Filter idR 2x 5 min bei RT mit 2x SSC / 0,1 % SDS und danach 2x 15 min bei 68 °C mit 0,2x SSC / 0,4 % SDS.
Nachdem die Waschungen beendet waren (die Radioaktivität des Filters wurde nach jedem Waschvorgang gemessen), wurde der noch feuchte Filter in Klarsichtfolie eingepackt. Anschließend wurde der Filter auf einem Röntgenfilm exponiert (idR üN bei -80 °C mit Verstärkerfolie) und später mit Hilfe der Autoradiographie ausgewertet.

3.8.2 Hybridisierung mit nicht-radioaktiver, ECL-markierter Sonde

Eine Alternative zur radioaktiven Markierung einer Sonde ist die Markierung mit Meerrettichperoxidase. Man bedient sich hier der Fähigkeit des Enzyms, die chemische Substanz Luminol so umzusetzten, daß dabei Chemoluminiszenz entsteht. Das ausgesandte Licht schwärzt dann, analog zur Autoradiographie, den Röntgenfilm. Das Prinzip dieser Methode ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

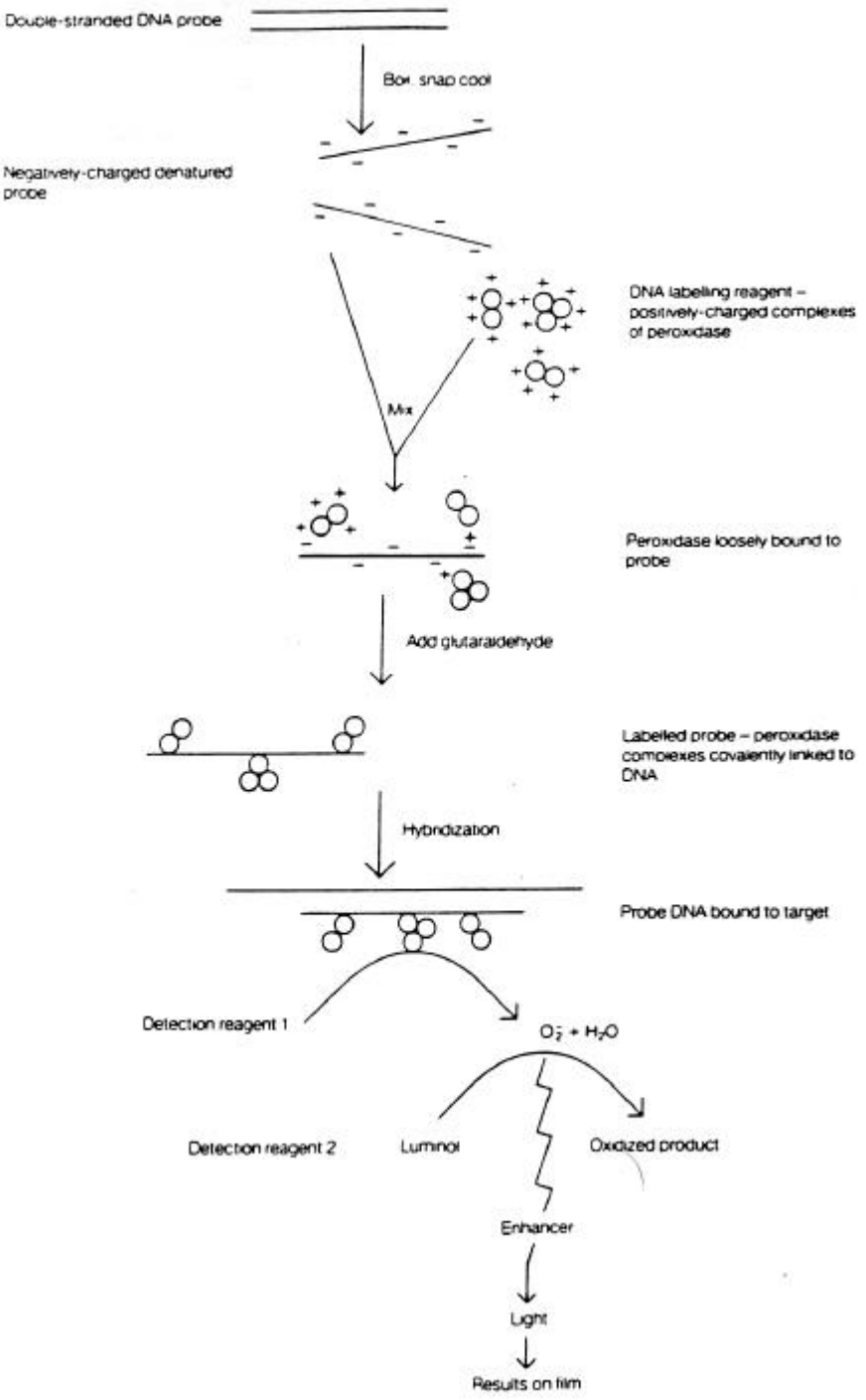


Abb. 5: Prinzip der ECL-Markierung

Verwendet wurde der ECL-Kit (*enhanced chemiluminescens*) der Fa. Amersham, die Durchführung folgte dem Hersteller-Protokoll:

Durchführung:

(1) Markieren der Sonde

- ca. 100 ng DNA in 10 µl A. bidest lösen
- DNA 5 min bei 95-100 °C denaturieren und danach sofort auf Eis stellen (für etwa 5 min), kurz abzentrifugieren
- 10 µl Markierungsreagenz zugeben und gut mischen
- 10 µl Glutaraldehyd zugeben, mischen und kurz abzentrifugieren
- Ansatz 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren
- Zugabe der Sonde zur Hybridisierungslösung (die Sonde kann ggf. bis zu 15 min auf Eis aufbewahrt werden)

(2) Hybridisierung

- Membran mit fixierter DNA in Folienschlauch einschweißen, Schlauch dabei nach oben hin nicht verschließen
- ECL-Lösung zugeben: ca. 0,125 ml pro cm^2 Filter
- Schlauch zuschweißen und Filter ca. 1 h bei 42 °C vorhybridisieren
- danach markierte DNA-Sonde zugeben und mischen - Sonde möglichst nicht direkt auf die Membran geben
- Hybridisierung üN bei 42 °C im Schüttelwasserbad

(3) Waschen

- 2x 20 min bei 40 °C mit 0,1x SSC / 0,5 % SDS, anschließend
- 2x 5 min bei RT mit 2x SSC

(4) Detektion

- Detektionslösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 ansetzen,
  benötigtes Endvolumen: 0,125 ml / cm^2 Filter

- Membran aus der Waschlösung nehmen und kurz (ca. 1 min) auf Whatman-Papier trocknen
- die Membran dann mit der DNA-Seite nach unten für 1 min in die Detektionslösung legen
- Filter in Klarsichtfolie wickeln und auf einem Röntgenfilm exponieren

Der Filter wurde kurz (ca. 1 min) exponiert und der Röntgenfilm entwickelt. Je nach Stärke der Signale exponierte man den Filter dann nochmals für durchschnittlich 20-30 min (RT).

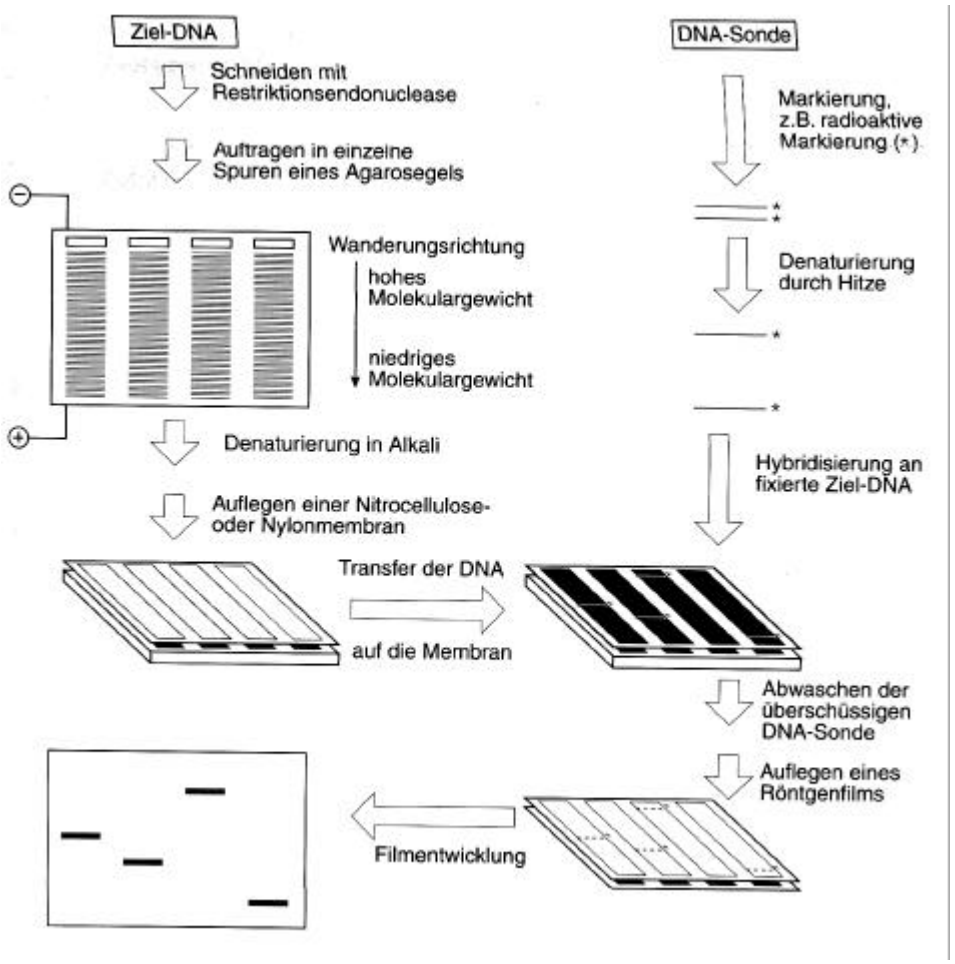


Abb. 6: Allgemeines Prinzip der Southern-Blot-Hybridisierung. Das zu Anfang dargestellte Schneiden der Ziel-DNA mittels Restriktionsenzymen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

(aus Strachan, T., Read, A.P. (1996), Molekulare Humangenetik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

3.9 Autoradiographie

Die Autoradiographie ist ein Abbildungsverfahren, durch das man in einer festen Probe radioaktiv markierte Substanzen lokalisieren und nachweisen kann. Die Autoradiographie basiert auf dem gleichen Prinzip wie die Photographie, nur daß die Energie für die Reduktion der Silberionen (Ag^+) zu atomarem Silber aus der ionisierenden Strahlung stammt, die im zu untersuchenden Objekt (Gel, Filter etc.) entsteht.
Die entstandenen Silberatome stellen sich als Schwärzung des Röntgenfilms dar, durch die in der Probe vorhandene radioaktiv markierte Verbindungen nachgewiesen werden können. Dabei ist die Filmschwärzung direkt proportional zur Radioaktivitätsmenge. Die auf diese Weise erhaltenen Röntgenbilder nennt man Autoradiogramme.

Durchführung:

Die radioaktiven Gele bzw. Filter wurden in direktem Kontakt mit einem Röntgenfilm in einer lichtdichten Expositionsmappe aufgelegt und je nach Intensität der radioaktiven Strahlung 1-3 Tage bei RT oder -80 °C exponiert.
Sollte die Detektion ^{32}P-markierter Verbindungen verbessert werden, wurden zusätzlich sogenannte Verstärkerfolien (*intensifying screens*) aufgelegt.
Um die Röntgenfilme zu entwickeln, wurden sie für etwa 1 min in Entwicklerlösung gelegt, kurz mit Wasser gespült und dann fixiert.

3.10 Einschleusen von DNA in Bakterienzellen

3.10.1 Präparation kompetenter *E. coli* Zellen

Die meisten Bakterienarten, darunter auch *E. coli*, nehmen DNA normalerweise nur in begrenztem Umfang auf. Um solche Arten wirksam zu transformieren (Transformation = Aufnahme von Fremd-DNA durch Bakterienzellen), müssen die Zellen durch Behandlung mit Chemikalien und Kälte vorbereitet werden. Wahrscheinlich wird dadurch die Zellmembran aufgelockert bzw. eine bessere Anheftung der DNA herbeigeführt. Bakterienzellen, die eine solche Behandlung durchlaufen haben, bezeichnet man als kompetent.

Die eigentliche Wanderung von DNA-Molekülen in die kompetenten Zellen hinein wird ermöglicht, indem man die Bakterien einem kurzen Hitzeschock (42-45 °C) aussetzt.

Durchführung:

100 ml dYT-Medium wurden mit 100 µl einer Übernachtkultur von Bakterienzellen des *E. coli*-Stammes JM83 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine Dichte von ca. 5x 10^7 Zellen /ml, OD ca. 0,4, erreicht war (Dauer etwa 2-3 h).
Die Kultur wurde dann auf Eis abgekühlt und bei 4 °C 10 min lang bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet resuspendierte man vorsichtig in ca. 15 ml eiskaltem Transformationspuffer I (TFB I) und stellte die Lösung für 1 h auf Eis. Die Zellen wurden erneut bei 4 °C zentrifugiert (10 min, 3000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml kaltem TFB II resuspendiert.
Die nun kompetenten Zellen wurden aliquotiert à 50 - 200 µl, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Wichtig für den Erfolg der Präparation ist, daß sich die Bakterienzellen nach der Abkühlung auf Eis nicht mehr erwärmen, da sie sonst wieder in den Zellzyklus eintreten und mit dem Stoffwechsel beginnen, wodurch die Kompetenz verloren geht bzw. verringert wird.

3.10.2 Transformation von Bakterienzellen

Durchführung:

Ein Aliquot der kompetenten *E. coli* JM83-Zellen (ca. 50 µl) wurde auf Eis aufgetaut (ca. 5 min). Zu diesen Zellen gab man den zu transformierenden Ligationsansatz, mischte beides und inkubierte die Lösung für 20-30 min auf Eis. Man setzte die Zellen dann einem kurzen Hitzeschock aus, indem man sie 90 sec lang bei 42-45 °C im Wasserbad inkubierte. Anschließend gab man 200 µl dYT-Medium zu und inkubierte den Ansatz 30 min bei 37 °C
→ Die Ampicillin-Resistenz wird exprimiert.
Danach wurde der Ansatz kurz zentrifugiert (1 min, 9000 rpm), der Überstand bis auf 100 µl abpipettiert und das Pellet resuspendiert. Der Transformationsansatzes wurde auf dYT-Amp/X-Gal-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.10.3 Selektion transformierter Zellen

Um unterscheiden zu können, ob eine Bakterienzelle ein Plasmid aufgenommen hat, bedient man sich eines selektierbaren Markers, der in dem entsprechenden Plasmid enthalten ist. Dieser Marker verleiht der transformierten Zelle eine neue Eigenschaft, d.h. eine Eigenschaft, die die nichttransformierte Zelle nicht besitzt. Die Plasmidvektoren pBluescript und pUC18 tragen z.B. das Gen für die Ampicillinresistenz (*amp*^{R}). Nach einer Transformation mit diesem Plasmid können nur die *E. coli* Zellen auf einem Ampicillin-Agarnährboden Kolonien ausbilden, die das Plasmid besitzen. Zellen, die das Plasmid nicht aufgenommen haben, sind weiterhin Ampicillin-sensitiv und bilden daher auf dem Selektionsmedium keine Kolonien aus.

Durch das Ausplattieren auf einem Selektionsmedium ist es also möglich, transformierte von nichttransformierten Zellen zu unterscheiden. Um nun festzustellen, welche der trans-formierten Zellen auch tatsächlich ein Plasmid mit der entsprechenden Insertions-DNA aufgenommen haben, untersucht man die Aktivität der β-Galaktosidase (Enzym von *E. coli*):

Die Klonierungsvektoren pBluescript und pUC 18 enthalten das *lacZ'*-Gen, das das α-Peptid der β-Galaktosidase codiert und das bei den Zellen des Stammes *E.coli* JM83 deletiert ist. Durch die Aufnahme eines Plasmids, das den fehlenden *lacZ'*-Teil des Gens enthält, wie z.B. pUC18, wird das Bakteriengen komplementiert und die Bakterienzellen können das Enzym β-Galaktosidase bilden.

Die Insertion von Fremd-DNA in die Polylinkersequenz des Plasmid bewirkt jedoch, daß das *lacZ'*-Gen auseinandergerissen wird mit der Folge, daß keine β-Galaktosidase mehr gebildet werden kann.

Der Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgt durch eine Farbreaktion. Dabei bedient man sich des farblosen Laktose-Analogons X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid), das bei der Spaltung durch die β-Galaktosidase ein blaues Produkt ergibt.

Zusammengefaßt:

blaue Klone : β-Galaktosidase wird gebildet und X-gal daher gespalten
→ die Kolonien enthalten Plasmidvektoren ohne DNA-Insert

weiße Klone : β-Galaktosidase wird nicht gebildet und X-gal daher nicht gespalten
→ die Kolonien enthalten das rekombinierte Plasmid

3.11 YAC-Endfragment-Isolierung

Um eine lückenlose YAC-Contig erstellen zu können, ist die Isolierung von YAC-Armen von Bedeutung, da man mit Hilfe dieser Endfragmente häufig in der Lage ist, überlappende Klone identifizieren zu können, die dann den Schluß einer bestehenden Lücke erlauben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die YAC-Endfragmente mit Hilfe der inversen PCR isoliert, in pBluescript kloniert und mit der T7-Polymerase sequenziert.

3.11.1 Inverse PCR

Mit Hilfe der inversen PCR ist es möglich, unbekannte DNA-Sequenzen auf beiden Seiten einer bereits bekannten Sequenz zu amplifizieren:
Man schneidet die DNA so, daß sich die bekannte Sequenz sowie die beiden benachbarten Bereiche auf einem kleinen Restriktionsfragment befinden. Anschließend ligiert man die DNA und bringt durch den Ringschluß die beiden Nachbarregionen zusammen. Primer, die von den Enden der bekannten Sequenz abstammen und ursprünglich von einander weg gerichtet waren, ermöglichen jetzt die Amplifikation der unbekannten, benachbarten Sequenzen (s. Abb. 7).

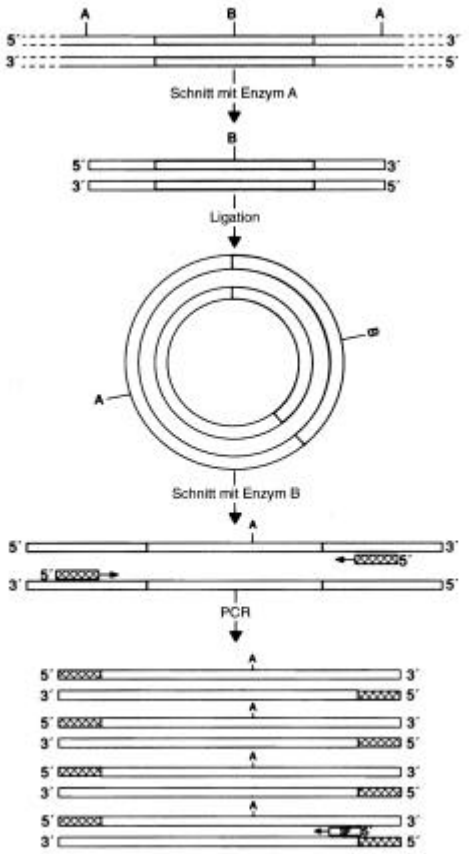


Abb. 7: Prinzip der inversen PCR
SP = Sequenzierungsprimer

(aus Newton, CR., Graham, A. (1994), PCR,
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

Durchführung:

200-400 ng YAC-DNA (ca. 8 µl) wurden in einem Eppendorf-Cup vorgelegt und mit 1 µl 10x Restriktionspuffer gemischt. Anschließend wurde 1 µl (10 U/µl) eines Restriktionsenzyms zugegeben. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme waren Sau 3A, Hae III, Alu I sowie Hha I. Der Reaktionsansatz wurde dann über Nacht im Wasserbad bei 37° C inkubiert und am nächsten Morgen 10 min bei 70° C erhitzt.

Der Verdau wurde mit 80 µl A. bidest. verdünnt. 10 µl 10x Ligase-Puffer sowie 1 µl T_4-Ligase wurden zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend 4 h bei 32° C im Wasserbad bzw. im Brutschrank inkubiert (Ringbildung der DNA).

Danach wurde die Ligation wieder erhitzt, 10 min bei 70° C, mit 10 µl Natriumacetat (pH 5,3) und 200 µl Ethanol gemischt und 30 min bei -20° C stehengelassen.

Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm) pelletiert, nach Abnahme des Überstandes mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet unter der Clean Bench getrocknet.

Das Pellet wurde in 18 µl A. bidest gelöst und mit 2 µl Restriktionspuffer gemischt. 1 µl (10 U/µl) eines selten schneidenden Restriktionsenzyms wurde dazugegeben, z.B. Sma I für den rechten YAC-Arm, und der Restriktionsansatz mindestens 2 h inkubiert (die Inkubationstemperatur richtete sich nach dem gewählten Restriktionsenzym). Zum Schluß wurde der Ansatz nochmals 10 min bei 65-70° C erhitzt und konnte dann als Template (s.u.) für die inverse PCR verwendet werden.

PCR:

2 µl DNA (aus oben beschriebenem Reaktionsansatz) wurden in Eppendorf-Cups vorgelegt. Anschließend wurden 48 µl Pre-Mix zugegeben, sodaß das Reaktionsvolumen 50 µl betrug.

Pre-Mix:	Nukleotidmix	10 µl
	10x Puffer	5 µl
	phosphorylierter Primer A (10 pmol/µl)	1,5 µl
	phosphorylierter Primer B (10 pmol/µl)	1,5 µl
	$MgCl_2$ (25 mM)	2 µl
	Taq-Polymerase	0,5 µl

Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

T_0:	94 °C	3 min
T_1:	94 °C	30 sec
T_2:	62 bzw. 66 °C	1 min
T_3:	72 °C	1 min
T_4:	72 °C	5 min
T_5:	15 °C	∞

Anzahl der Zyklen: 37

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und überprüft. Der Ansatz mit dem geeignetsten PCR-Resultat wurde für die Klonierung des YAC-Armes in ein Plasmid verwendet.

Protokoll für die Phosphorylierung der Primer:

6 µl Primer (15 pmol/µl)
1 µl 10 mM ATP
1 µl 10x Polynukleotid-Kinase Reaktionspuffer
2 µl T4-Polynukleotid-Kinase (1:10 verdünnt)

→ Der Ansatz wurde 45 min bei 37 °C inkubiert, anschließend 10 min auf 65 °C erhitzt und konnte dann eingesetzt werden.

Primer-Sequenzen:

a) rechter YAC-Arm:

YACRP 1-2	AACGCCCGATCTCAAGATTAC
YACRP 2	TCCATTCACTTCCCAGACTTG

(Annealing-Temperatur: 66 °C)

b) linker YAC-Arm:

YACLP 1	AATACTCTCGGTAGCCAAGTTG
YACLP 2	TTATCCGGTCCTTCCAAGA

(Annealing-Temperatur: 62 °C)

3.11.2 Klonierung der PCR-Produkte

Im ersten Schritt wurde die zu klonierende DNA vorbereitet:

- Produkt der inversen PCR (s.o.) in Eppendorf-Cups pipettieren
- 1 µl Klenow-Enzym (5 U/µl) zugeben und 30 min bei 37 °C inkubieren
- Ansatz ad 200 µl mit A. bidest 'auffüllen', 200 µl Phenol/Chloroform zugeben, 30 sec vortexen
- Ansatz zentrifugieren (5 min, 13000 rpm), obere Phase in neues Eppendorf-Cup geben
- DNA fällen: Zugabe von 2 Volumen EtOH/Natriumacetat, 30 min bei -20 °C inkubieren, anschließend zentrifugieren (15 min, 13000 rpm)
- Überstand verwerfen, Pellet in 200 µl 70 %igem Ethanol waschen, dann trocknen und in 40 µl A. bidest. lösen (15 min bei 50 °C)

Für die Ligation gab man dann 10 µl 5x Ligase-Puffer, 1 µl T4-Ligase und 1 µl pBS EcoRV cip (Vektor) zur DNA und inkubierte den Ansatz 4 h lang bei 32 °C oder üN bei RT.

Der Ligationsansatz wurde anschließend mit 50 µl kompetenter *E.coli* JM83-Zellen transformiert (s. 3.10), der Transformationsansatz auf Amp/X-Gal-Agarplatten ausplattiert und die Platten bei 37 °C üN im Brutschrank inkubiert.
Von positiven weißen Kolonien wurde DNA präpariert und das Insert durch Verdau mit EcoRI und HindIII 'ausgeschnitten':

pro Ansatz:	5 µl DNA
	4 µl ddH_2O
	1 µl 10x Puffer 'B' (Boehringer)
	je 0,2 µl Eco RI und Hind III

Der Verdau wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und dann auf einem Agarosegel überprüft. Klone der richtigen Größe wurden dann mit Hilfe der T7-Polymerase ansequenziert (s. 3.12). Die Sequenz speicherte man anschließend im Computerprogramm DNAsis und suchte mit Hilfe des Programmes Oligo™ neue Primer aus, um durch PCR mit dem isolierten Endfragment neue überlappende YAC-Klone identifizieren zu können.

3.12 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode

Die von Sanger et al. (1977) entwickelte Methode der enzymatischen DNA-Sequenzierung basiert auf dem zufälligen Einbau von Didesoxynukleotiden während der Neusynthese von DNA, der zu einem Abbruch der Synthese führt:

Didesoxynukleotide (ddNTPs) sind Analoga der dNTPs, von denen sie sich durch eine fehlende Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom unterscheiden. Sie können zwar an die wachsende Nukleotid-Kette angehängt werden, können jedoch, da die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, an ihrem 3'-Kohlenstoffatom keine Phosphodiesterbindung ausbilden. Es kommt zum Kettenabbruch. Da dieser zufällig erfolgt, erhält man bei der Reaktion eine statistische Mischung aller Kettenlängen, von der jedoch jede mit einem bestimmten Nukleotid endet.

Die DNA-Matrize für die Sequenzierung besteht aus einem Einzelstrang. Ein komplementärer Primer bindet spezifisch an eine Region, die an den zu sequenzierenden Bereich angrenzt. Mit Hilfe der T7-Polymerase wird der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Man führt parallel vier basenspezifische Reaktionen durch, wobei jeder Reaktionsansatz die vier dNTPs und eines der vier ddNTPs enthält. Da man im Vergleich zu den dNTPs wesentlich weniger ddNTP zugibt, kommt es in statistischer Verteilung zum Einbau des ddNTPs und damit zum Kettenabbruch. Die DNA-Fragmente besitzen ein durch den Primer definiertes übereinstimmendes 5'-Ende, ihre 3'-Enden sind jedoch verschieden, da abhängig vom Einbau des jeweiligen ddNTPs (s. Abb. 8).

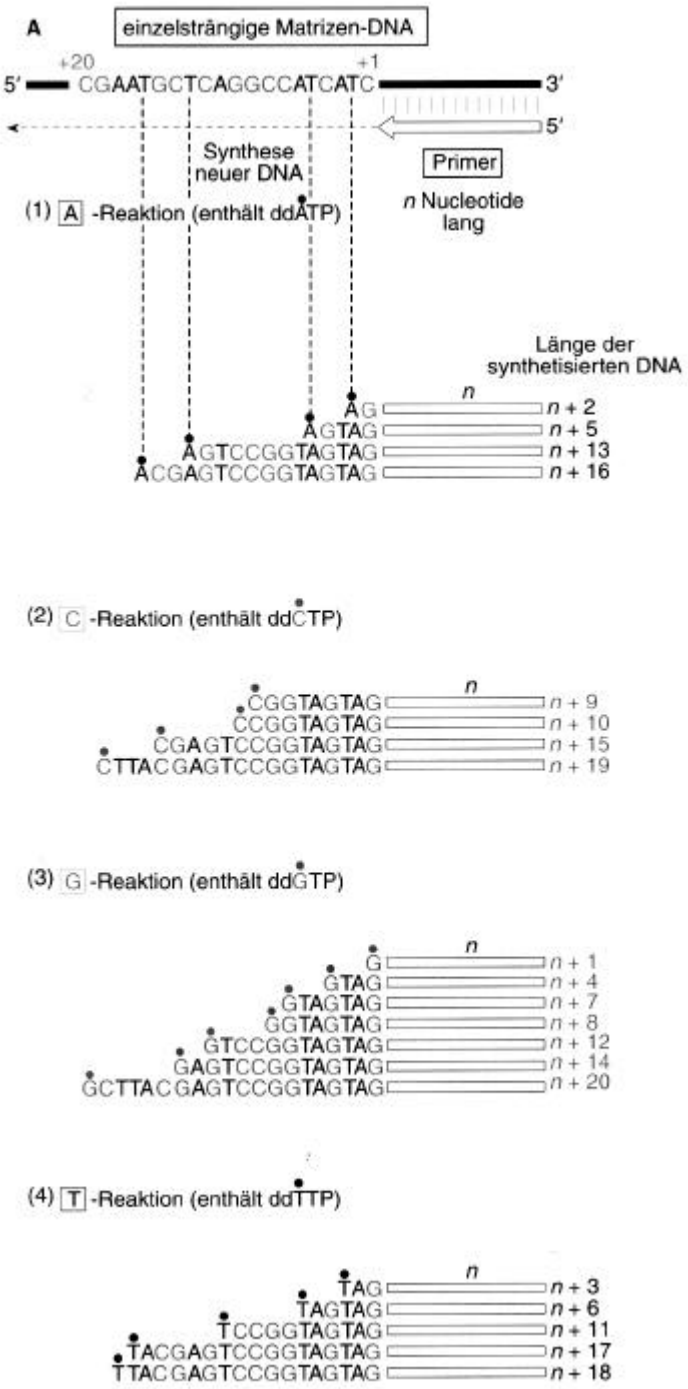


Abb. 8: Prinzip der Didesoxysequenzierung

(aus Strachan, T., Read, A.P. (1996), Molekulare Humangenetik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

Durchführung der Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit dem ‘T7-Sequencing Kit’ der Fa. Pharmacia durchgeführt, sowie mit den Primern T7 und T3.

(1) Vorbereitung der Proben / Denaturierung

Ca. 30 µl (= 2-5 µg) der zu sequenzierenden Plasmid-DNA wurden gefällt und gewaschen, das Pellet wurde unter der Clean Bench getrocknet. Um die DNA zu denaturieren, gab man 40 µl 0,2 M NaOH / 0,2 mM EDTA zum Pellet und ließ den Ansatz 20 min lang im Wasserbad bei 37 °C inkubieren. Durch Zugabe von Ammoniumacetat und Ethanol wurde die DNA anschließend neutralisiert und gefällt:

4 µl 2 M Ammoniumacetat sowie 100 µl Ethanol abs. wurden zum Ansatz pipettiert, gemischt und 10 min lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach zweimaligem Waschen mit 100 µl 70 %igem Ethanol getrocknet.

(2) Annealing (Anlagerung) der Primer

2 µl Primer (30 ng/µl), 2 µl Annealing-Puffer sowie 10 µl A. bidest. wurden zum denaturierten Pellet (s.o.) gegeben. Der Ansatz wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert und anschließend einige Minuten bei RT zum Abkühlen stehen gelassen.

(3) Markierungsreaktion

Entsprechend der Probenzahl n wurde folgender Pre-Mix angesetzt:

Labeling Mix dATP:	3n µl
ddH_2O:	n µl
T7-Polymerase (verd.)*:	2n µl
^{35}S-dATP (10 µCi/µl):	n µl

*die T7-Polymerase wurde kurz vor dem Ansetzten des Pre-Mixes mit Enzym-Verdünnungspuffer auf eine Konzentration von 1,5 U/µl eingestellt

Je 6 µl des Pre-Mixes wurden zu den Annealing-Ansätzen (s.o.) gegeben und 5 min bei RT inkubiert.

(4) Kettenabbruchreaktion (Termination)

Die Kettenabbruchreaktion erfolgte bei 37 °C in vier getrennten Reaktionsansätzen: In vier Eppendorf-Cups wurden je 2,5 µl des für die Kettenabbruch-Reaktion spezifischen Didesoxynukleotids (A, C, G, T) vorgelegt und ca. 1 min bei 37 °C vorgewärmt. Anschließend wurden je 4,5 µl des Markierungsansatzes (s.o.) dazu pipettiert und die Ansätze 5 min lang bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl Stoppuffer wurde die Reaktion dann beendet.

(5) Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Sequenzierungs-Proben wurden 3 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in einem 6 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 3.4.2). Dazu wurden je 3 µl der Proben in der Reihenfolge A-C-G-T aufgetragen.

Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden ermittelt durch Ablesen der Autoradiographie des Polyacrylamid-Gels (s. auch 3.9): Beginnend mit der Bande des kleinsten Fragmentes liest man auf dem Röntgenfilm die Sequenz von unten nach oben und notiert dabei die Nukleotide der entsprechenden Banden. Man geht Bande für Bande vor und erhält so die 5'→3'-orientierte Sequenz des neu synthetisierten DNA-Stranges (s. Abb.8).

Die Auswertung und Bearbeitung der Sequenzen erfolgte anschließend mit Hilfe der Computerprogramme DNAsis und Oligo™.

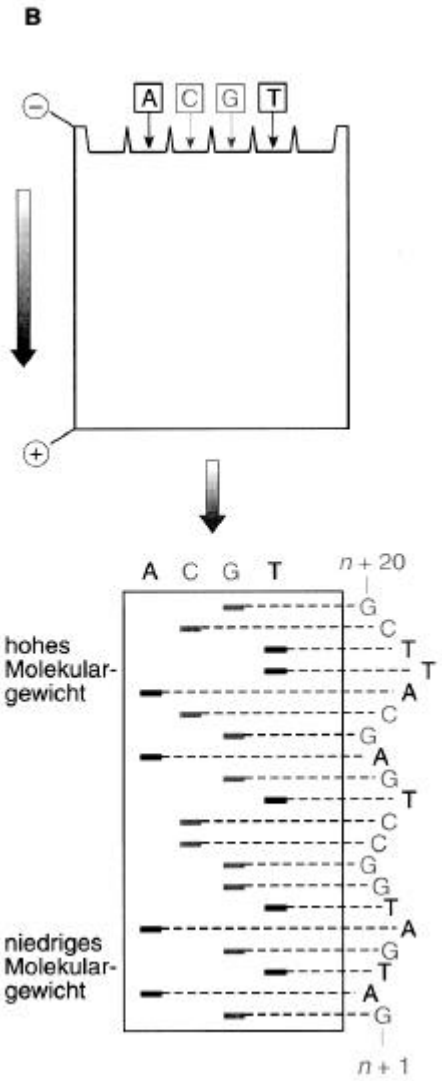


Abb. 9: Auftrennung der bei der Sequenzierung entstandenen Fragmente in einem Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie

(aus Strachan, T., Read, A.P. (1996), Molekulare Humangenetik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

3.13 Oligonukleotid-Präzipitation

Diese Methode dient der schnellen Aufreinigung und Entsalzung von Oligonukleotiden. Man gab 360 µl der in Ammoniak gelösten Oligonukleotide in ein Eppendorf-Cup, pipettierte 40 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,3) und 1,2 ml 100 %igen EtOH dazu, mischte alles vorsichtig und zentrifugierte den Ansatz für 20 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das

Pellet mit 1 ml 70 %igem EtOH gewaschen, dann getrocknet und in 200 µl A. bidest. gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C.

4 ERGEBNISSE

4.1 Screening der YAC-Banken - Identifikation von YAC-Klonen für den Bereich 5q31.3-q33.1

4.1.1 Etablierung von PCR-Bedingungen

Um mit dem Durchmustern (Screening) der YAC-Banken beginnen zu können, mußten zunächst die PCR-Bedingungen für die jeweiligen Primerpaare ausgetestet bzw. bei bereits veröffentlichten Markern überprüft werden. Dazu wurden die Annealing-Temperatur, die $MgCl_2$-Konzentrationen sowie ferner Zyklusdauer und -häufigkeit der PCR variiert. Ausgewählt wurden diejenigen Konditionen, die in der Agarose-Gelelektrophorese nur eine definierte Bande zeigten, die der Größe des zu erwartenden PCR-Produktes entsprach.

Zu niedrig gewählte Annealing-Temperaturen erlaubten eine unspezifische Amplifikation; zu stringente, d.h. zu hohe Temperaturen hingegen ließen die Bindung der Primer an 'ihre' entsprechenden Sequenzen nicht zu, so daß es zu keiner Amplifikation kam.

In bezug auf die $MgCl_2$-Konzentrationen zeigte sich, daß einige Primerpaare in ihrem Verhalten fast gänzlich unbeeinflußt blieben von Änderungen der $MgCl_2$-Bedingungen, während bei anderen ein 'Zuviel' bzw. 'Zuwenig' an $MgCl_2$ sich negativ auf die PCR auswirkten (keine bzw. nur schwache Amplifikation).

Zyklusdauer und -häufigkeit der PCR wurden nur in begrenztem Maße variiert und blieben ohne Einfluß auf die PCR. Die Primer-spezifischen Konditionen für die im Contig etablierten Marker sind in Tab. 2 beschrieben.

4.1.2 Isolierung der YACs

Das Screening der YAC-Bibliotheken von ICRF bzw. CEPH erfolgte wie unter 3.6 detailliert beschrieben mittels PCR, basierend auf der sogenannten *two-step-pooling strategy*.

Die DNA von Tertiär- und Sekundärpools stand bereits in gelöster Form zur Verfügung, wohingegen die DNA der einzelnen YAC-Klone noch wie unter 3.2.1 beschrieben aus Hefe-Kolonien isoliert werden mußte, um als Template für die PCR eingesetzt werden zu können.
Die Konzentration der präparierten Hefe-DNA betrug in aller Regel zwischen 100 und 200 ng/µl.

Die der ICI-Bibliothek entstammenden YACs 15HB8, 1DG4, MFD116, 20AB9, 24EB3 sowie 13BH12 und 11GA3 wurden nicht selbst via Screening isoliert, sondern von Dr. M. Dixon direkt als im Bereich 5q31-33 lokalisiert zur Verfügung gestellt. In diesen Fällen wurde 'nur' auf positive Reaktionen zwischen bereits bekannten Markern und den oben aufgeführten YACs getestet. Generell gilt, daß alle isolierten YACs mit allen etablierten Markern durch PCR kreuzgetestet wurden, um im Screening nicht gefundene YACs doch noch detektieren zu können.
Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die im Contig etablierten Marker und den entsprechenden isolierten YACs.

Marker: polymorphe DNA-Segmente	**positive YACs**
D5S119	748 D10, 850C10, 936H1
D5S207	148C7, 56E12, 77A1, 888A7, 888G7
D5S209	748D10, 757D5, 939A5, 850C10, 15HB8, 1DG4, MFD116
D5S210	84C10, 939F12, 841D10, 844D6, 861C7
D5S372	746E11, 20FA1
D5S373	888A7, 888G5, 888G7
D5S376	746E11, 939F12, 20AB9, 24EB3
D5S378	x116G5, 822E10, 930D10
D5S379	7448H7, 889C8, 930D10, 13BH12, 11GA3

D5S412	693F4, 760A3, 766B6, 770G7, 880B11, 902C3, 930D10, 943H1
D5S487	930D10, 965H3, 748H7, 889C8, 11GA3, 13BH12
D5S497	757H2, 965H3
D5S519	83E11, 119H2, 816D6
D5S547	939F12, 844D6, 861C7, 888G5, 888A7, 888G7
D5S640	83E11, 119H2, 816D6
D5S662	889C8, 748H7
D5S670	748D10, 757H2, MFD116
D5S673	936H1, 850C10, 748D10

Marker: Sequence-tagged sites	**positive YACs**
STS11	850C10, 748D10, 757D5
STS89	822E10, 930D10
STS254	748D10, 850C10, 936H1

Marker: Gene	**positive YACs**
ADRB2	746E11, 20AB9
ANX	939G3, 816D6
CSF1R	142A6, 906F1, 752D10, 150B10
FGF1	935G7, 955F5
GLR	757H2, WYA223B6

GM2A	931A5, 939G3, 816D6
GRIA	757H2, WYA223B6
HLADG	906F1
ITK	930D10
MFAP	757H2
NKSF1	930D10, 822E10, 880B11, 766B6
RPS14	816D6, 699C4
SPARC	143B6, 816D6, 931A5

Tab.2: Zuordnung isolierter YACs zu den im Contig integrierten Markern (Übersicht)

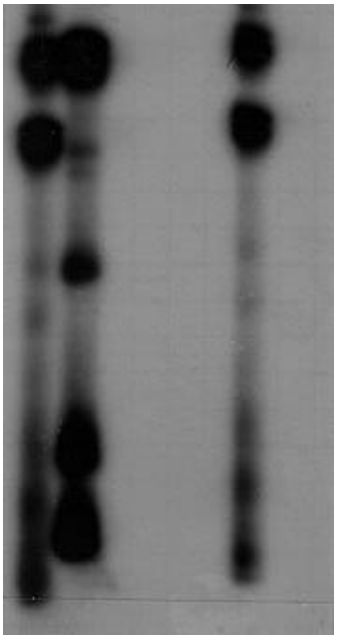


Abb. 10: Isolierung des YACs 143B6 (ICRF) für das Gen ‘SPARC’ mittels radioaktiver PCR,
Lane 1 und 6: XY-Kontroll-DNA, Lane 2: YAC 143B6, Lane 3: YAC 143B8,
Lane 4: YAC 143F6, Lane 5: YAC 143F8

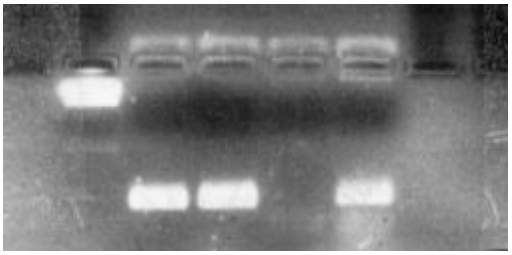


Abb. 11: Lane 1: Lambda-Größenstandard, 2 + 3: positive YACs für D5S378 (822E10, 930 D10),
Lane 4: Negativkontrolle (YAC 935G5), Lane 5: Positivkontrolle (XY-gesamtmenschliche DNA).

Für die folgenden Marker/Gene konnten zwar YACs mittels Screening identifiziert werden, jedoch stellten sich diese Marker im Verlauf der Arbeit als distal von 5q33.1 lokalisiert heraus. Die korrespondierenden YACs konnten daher in das im Rahmen dieser Arbeit zu erstellende Contig nicht eingeordnet werden (vgl. auch Dissertation L. Flöter).

D5S 211,	STS 50,	STS 279,
D5S 403,	STS 63,	STS 330,
	STS 132,	STS 364,
ADRA1B,	STS 147,	STS 410,
CL 100,	STS 163,	STS 467,
IG 22,	STS 219,	STS 492

Für folgende Marker konnten keine YACs isoliert werden:

D5S 193	STS 17	STS 329
D5S 219	STS 76	STS 330
D5S 365	STS 134	STS 362
D5S 436	STS 137	STS 461
D5S 470	STS 161	
D5S 546	STS 239	

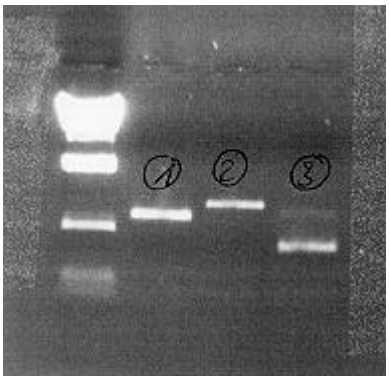
D5S 636 STS 269

D5S 643 STS 298

4.2 Isolierung von YAC-Endfragmenten

Die Isolierung und Sequenzierung von YAC-Endfragmenten diente dem Entwurf neuer STS-Marker, mit deren Hilfe nach überlappenden YAC-Klonen gesucht werden sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit basierte die Isolierung der Endfragmente auf dem Prinzip der inversen PCR (eine ausführliche Darstellung der angewandten Methoden erfolgte unter 3.5.4).
Die Amplifikation eines Endfragmentes durch inverse PCR stellte in aller Regel kein Problem dar. Nach Verdau der YAC-DNA mit je einem der folgenden Restriktionsenzyme Hha I, Hae III, Alu I oder Sau 3A, Ligation und erneuter Linearisierung ergab die PCR in allen Fällen mindestens ein PCR-Produkt, das das gewünschte Endfragment enthalten sollte.



1 2 3 4

Abb. 12: Inverse PCR für den linken YAC-Arm. Lane 1: Lambda-Größenstandard, Lane 2: 930D10/Sau3A, Lane 3: 822E10/HaeIII, Lane 4: 806D6/AluI

Nach Ligation des potentiellen Endfragments mit *pBluescript SK+* und Transformation von *E. coli* - Zellen (JM83) wurde von mindestens 10 positiven Kolonien die Plasmid-DNA isoliert

und durch Restriktionsverdau das Vorhandensein des ‘richtigen’ Inserts (→PCR-Produkt) überprüft (s. Abb 12).

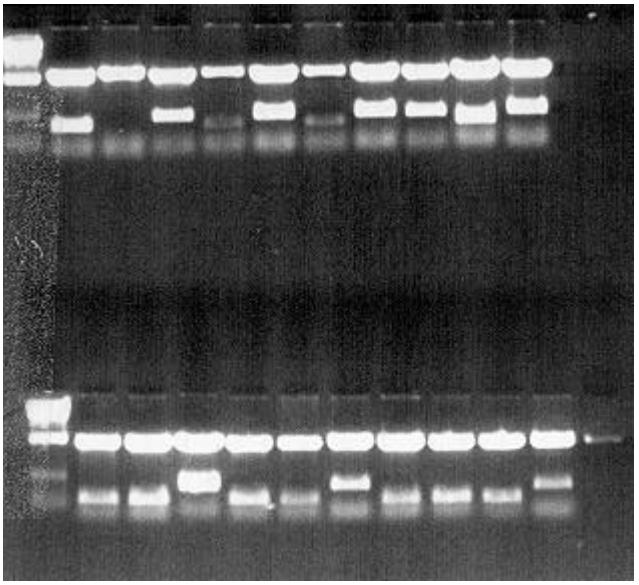


Abb. 13: Gelelektrophoretische Auftrennung von Minipräps nach Restriktionsverdau

Die positive Plasmid-DNA, d.h. die Klone mit dem ‘richtigen’ Insert, wurden nach der Didesoxymethode von beiden Seiten wie unter 3.12 beschrieben ansequenziert (s. Abb. 14). Basierend auf den Ergebnissen dieser Sequenzierungen konnten dann mit Hilfe des Computerprogramms Oligo™ Oligonucleotid-Primer entworfen werden, die die weitere Suche nach überlappenden YACs ermöglichten.

Von den folgenden YACs wurde versucht, ein Endfragment zu isolieren:

930D10

757H2

889C8

822E10

939F12

Von den YACs 930D10, 889C8 sowie 822E10 konnte jeweils ein echtes Endfragment isoliert werden. Das aus einem vermeintlichen Endstück von 939F12 generierte Primer-Paar lief in der PCR nur unspezifisch und repräsentiert wahrscheinlich eine Hefesequenz. Die Sequenzierung mehrer Plasmid-Inserts für 757H2 ergab nicht verwertbare Alu-Sequenzen.

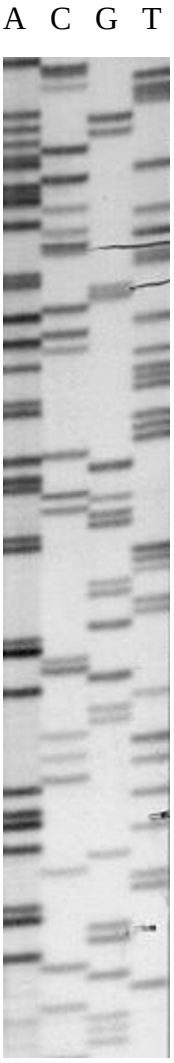


Abb. 14: Beispiel einer Sequenzierung eines YAC-Arms.

930D10YL (YL - **Y**AC-Arm, **L**inks) reagierte zudem positiv mit den YACs 889C8 und 748H7, 889C8YR reagierte mit 748H7 und die YACs 930D10 sowie 889C8 waren positiv für 822E10YL.

4.3 Größenbestimmung von YAC-DNA mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) und Hybridisierung

4.3.1 Elektrophoresebedingungen

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA während der PFGE hängt wie unter 3.4.3 beschrieben v.a. von der angelegten Spannung und der Pulsdauer ('*Switch*-Zeit') ab. Durch Veränderungen der Laufzeit, der Gelkonzentration, des Puffertyps sowie der Pufferkonzentration kann die Auftrennung der DNA ebenfalls beeinflußt werden.

Die anzulegende Spannung, die Pulsdauer sowie die Laufzeit des Gels wurden in Testläufen wie folgt verändert:

Angelegte Spannung:	5 V/cm bis 6,5 V/cm
Pulszeiten:	35-90 sec bis zu 50-120 sec
Laufzeit:	22 bis 27 h

Zu kurze ''Switch-Zeiten'' führten ebenso wie zu kurze Laufzeiten zu einer nur mangelhaften Auftrennung der Banden; bei einem zu langem Gellauf waren die kleineren Banden bereits zu weit bzw. bereits aus dem Gel gelaufen. Die Variation der Spannung führte zu keinen nennenswerten Unterschieden im Trennungsverhalten.
Folgende Bedingungen erwiesen sich für die Auftrennung der Hefechromosomen als am besten geeignet:

Spannung:	200 Volt (6V/cm)
Pulsdauer:	50-120 sec
Laufzeit:	24 h

4.3.2 Hybridisierung und Auswertung

Die aus den Hefezellen präparierte DNA umfaßt neben der YAC-DNA auch die DNA der restlichen 16 Hefechromosomen. Daher entspricht die Auftrennung der Hefe-DNA durch PFGE einer Auftrennung aller 17 Chromosomen. Da sich die fragliche YAC-Bande auf dem Pulsed-Field-Gel mit dem bloßem Auge in aller Regel nicht klar erkennen ließ, transferierte man die DNA auf eine Nylon-Membran (siehe Southern-Blotting, 3.7) und hybridisierte mit gesamtmenschlicher DNA (siehe 3.8). Da nur die YACs aufgrund ihrer einklonierten humanen DNA mit der Hybridisierungssonde reagierten, konnte man sie autoradiographisch lokalisieren (siehe Abb. 15). Die Größenbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Längen-standards wie unter 3.4.3 beschrieben.
Die Größen der im Contig integrierten YACs sind in Tab. 3 dargestellt.

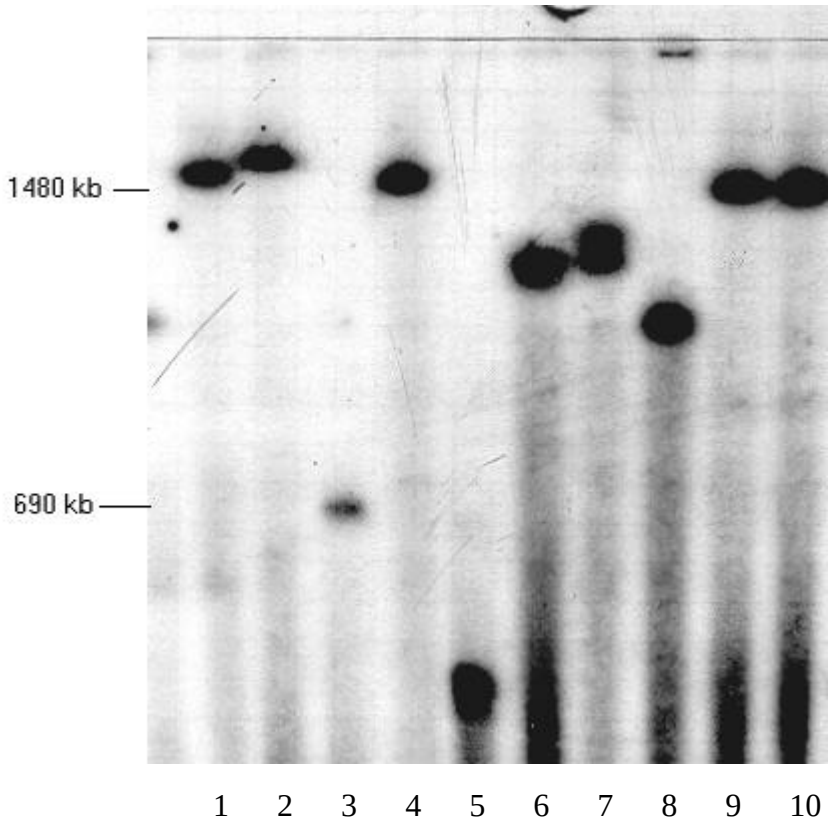


Abb. 15: Detektion von YACs mittels Autoradiographie nach PFGE, Hybridisierung mit gesamt-menschlicher DNA und Southern-Blotting.

Lane 1:	850C10	Lane 6:	757H2
Lane 2:	748D10	Lane 7:	965H3
Lane 3:	757D5	Lane 8:	963C7
Lane 4:	939A5	Lane 9:	748H7

Lane 5: 639A1 Lane 10: 889C8

YAC	YAC-Größe (in kb)	Bibliothek	Chimäre
935G7	1570	CEPH	+
955F5	1460	CEPH	-
77A1	690	ICRF	-
56E12	690	ICRF	-
148C7	590	ICRF	-
888G5	210	CEPH	+
888A7	1300	CEPH	-
888G7	230	CEPH	+
939F12	1580	CEPH	-
84C10	780	ICRF	-
841D10	1430	CEPH	-
844D6	1420	CEPH	-
861C7	1480	CEPH	-
746E11	760	CEPH	+
20AB9	600	ICI	-
24EB3	295	ICI	-
20FA1	300	ICI	-
142A6	590	ICRF	+
906F1	1590	CEPH	+
752D10	1570	CEPH	+
150B10	370	CEPH	-
699C4	nb	CEPH	+
939G3	1340	CEPH	-
83E11	655	ICI	+
119H2	380	CEPH	-
816D6	1600	CEPH	+
816D6*	685	CEPH	+
143B6	870	ICRF	+
931A5	1420	CEPH	+

936H1	1060	CEPH	-
850C10	1260	CEPH	-
748D10	1390	CEPH	+
757D10	690	CEPH	-
939A5	1230	CEPH	+
1DG4	240	ICI	-
15HB8	250	ICI	-
MFD116	530	ICI	-
WYA223B6	380	ICI	-
757H2	1200	CEPH	-
965H3	1350, +	CEPH	-
748H7	1480	CEPH	-
889C8	1480	CEPH	-
11GA3	150	ICI	-
13BH12	330	ICI	-
930D10	1430	CEPH	+
822E10	1120	CEPH	-
116G5	570	ICRF	-
760A3	980	CEPH	-
880B11	780	CEPH	-
902C3	1450	CEPH	-
693F4	1640	CEPH	-
766B6	1590	CEPH	+
943H1	1660	CEPH	-
770G7	970	CEPH	-

Tab. 3: Größe der im Contig integrierten YACs. Aufgeführt sind zusätzlich die Bibliothek , aus der das entsprechende YAC stammt, sowie das Ergebnis der Testung auf Chimärismus (persönliche Mitteilung cand. med. Kerstin Eppelt, Gießen).

4.4 Erstellung des YAC-Contigs

Die Anordnung der YACs wurde basierend auf den Ergebnissen der PCR vorgenommen. YACs, die mit denselben Markern in der PCR reagierten, wurden als überlappend betrachtet und entsprechend angeordnet. Die Isolierung von YAC-Endfragmenten wurde durchgeführt, um weitere Überlappungen feststellen zu können. Der Versuch, Endfragmente von YAC 939G3 zu isolieren, verlief erfolglos. Dies hatte aber letzlich keine Konsequenzen, da später weitere YACs für diese Region identifiziert werden konnten und zum Schluß der Lücke verhalfen. Im distalen Bereich des Contigs konnte von den YACs 889C8, 930D10 und 822E10 je ein Endfragment isoliert werden, was eine genauere Anordnung der YACs in diesem Bereich ermöglichte.

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit weite Teile der Region 5q31/32-q33 durch YACs abzudecken, der vollständige Lückenschluß wurde jedoch nicht erreicht. So konnte FGF1 nicht in das Contig eingebunden werden. Eine Lücke blieb zwischen SPARC und D5S673 sowie zwischen D5S497 und D5S662.

Insgesamt wurden 53 YAC-Klone für den Bereich 5q31-q33 identifiziert und in das Contig integriert. 41 Marker konnten zugeordnet werden, darunter 11 Gene. 9 neu generierte Marker konnten integriert werden.

MARKER	PRIMER-SEQUENZ (5¢ ® 3¢)	PCR-Produkt (bp)	Annealing-Temperatur (°C)	$MgCl_2$-Konz. (mM)
FGF1	GTAGCATTACATTTGCACTTGG CTCAGAGCTGCAGTAGCCT	339	53	1
D5S207	TTGGAAGCCTTAGGAAGTGC AAGAATTCTAGTTTCAATACCG	139	50	1
D5S373	GGTAACAAGAGAGAAACTCC CAATTTCTTAGTGCACACATC	132	52	1
D5S547	CAGGCAGCTAACCAATCTAGA ATTTACTAGCCTCTGCCAGCA	125	60	1
D5S210	ATGCAGAATCTACAAGGACC CTTTAACATCCTTTAACAGC	216	50	1
20AB9R*	TGCTTTACGAATCTGGGTGC TACTCCCTACAAATGGAAA	198	53	1
20AB9L*	ACTACATCTACCCACATGAAT TCATGAACTCACAATCATT	130	53	1
24EB3YL*	nicht bekannt	168	52	1
D5S376	GAAACCTCTCATCTTGGTGG TCCTATGTCTCCAGACAAGG	176	51	1
ADRB2	GTACTGTGCCTAGCGATAAC TATAGCAGACTCAGGTCCTC	345	60	1
D5S372	TGCATTCATTCAGGGTTCTG TTAGAAAAGCCACCTGGTG	198	53	2
D5S559	AACTTGGCTACCGAGAGTGA CGTAAATACTAGTTAGTAGATGA	130	59	1
CSF1R	CAGGTTGCTAACCACCCTGT GTGCACACTTGGACAGCATT	168	53	1
HLADG**	GACCAAGTGCCAGGAAGAGG GGGGAAGACACACCAGCAGT	136	63	1
D5S551	GGTTGTCTCACTGATGTCTG CTACTGTCCTTCAGGGACTGG	98	60	1
RPS14	CTCACTGGGATATTCTCATTCT ACGTAGGTCAGTGACTGAGG	160	53	1
D5S640	CCCACATAGCACTCACAGC GCCCAGTTGCCACCTT	88	60	./.
D5S519	TACAGAGTGGAAAGCCCAGT CTTCCCACATAGCACTCACA	100	53	1

ANX6	GCACTTCTGCCAAGAAATGG ACAGACAGAGGTTCAGGATG	350	54	1
GM2A	CTGTGCATGGGATCTTGATC CACTATACTCACACATGGGC	187	53	1
SPARC	TATGTTCACAAGAGGGTGTC ATCTCGCCACTGTACTCTAC	160	52	1
D5S673	TGGAGAGATAGTGTCCCG GGTCTGAGTTCCACATCAT	259	53	1
STS254	AGCTTCCATGTGGTGTTTGGACTGC CTTCTCACAGCTGCACTAGACAGTG	236	59	1
D5S119	TCCTACCTTAATTTCTGCCT GCAGGTTGTTTAATTTCGGC	192	53	1
STS11	TAATACCTCACTCAACGTTCACATC AAGTTACTTGGCCCTTTTGAGGCTC	103	54	1
D5S209	CTGCACTAGAAAGGCAGAGT TGCAGCACCAAACACCAAGT	198	54	./.
D5S670	AATATCTCCAGACATTGCCA TGTAGGTAAGGGTTATGACTTAGAG	160	53	1
MFAP	CCTAACAAAATCAGCTCGCTCTC CATCATGTTTATCTGGGGCTCC	236	62	1
GLR1	CATCCCAAACCCTTCAGTGC ACTCTACTCTCAGAGACACAGG	192	54	1
GRIA**	GAGAGAATGGTCGGGTGGTC TTTTTGCACTGAAGGGTTTG	178	64	1
D5S497	CGTAAAGGGTAGCACGAGAA GGCTCACCTGCCCATC	218	55	1
889C8R	TTTCTACTCATTTTCTCTGTG TCATTTACTTCTACTCAACCA	184	55	1
D5S662	TTGTAACGTGATAAACTGCCTT ATTGCCGCCAGAGGGT	94	62	2
930D10L	GTCTCTTTTTACAGTTTTTG GACACATTTAGATTGCAAG	128	52	2
D5S487	TCTTGGTAAGCCCACAATGA CTGGCCTTGGAAATTAGACC	258	56	1
D5S379	GCCTACATCATTCATTTGGC CTAGTTTAGCCAACACACTC	215	53	2
822E10L	GCAGGCATCTAAGATATAAC AGCCAAGCTATTACATCTAC	139	52	1

STS89	AGTGAAATTTCCAAACTCGCAAGTG CTATTTTGTTCCCCAATCATATGGC	116	55	1
D5S378	GGTGCTTTGTAAACTCACAG TAGACGATGCATCCAAAGAC	174	53	1
NKSF1**	TGCAGTGTTCTGATACCAGTGC GGGAACTAGCATCTTGTTCTCC	210	59	1
D5S412	GCTGGGGAATGTTACAGTAT CCCATGAGAACTTCCACATA	175	57	./.
ITK**	CCTCATTCCATAGAGCATTAGA TAGAGGAAGGGCAGAGACAT	194	60	./.

Tab. 4.: Überblick über die in das Contig integrierten Marker. Fett gedruckte Marker wurden neu entwickelt. * kennzeichnet die Generierung durch Dixon et al. (persönliche Mitteilung), mit ** gekennzeichnete Marker wurden von Dr. Markus Kostrzewa entwickelt (persönliche Mitteilung).

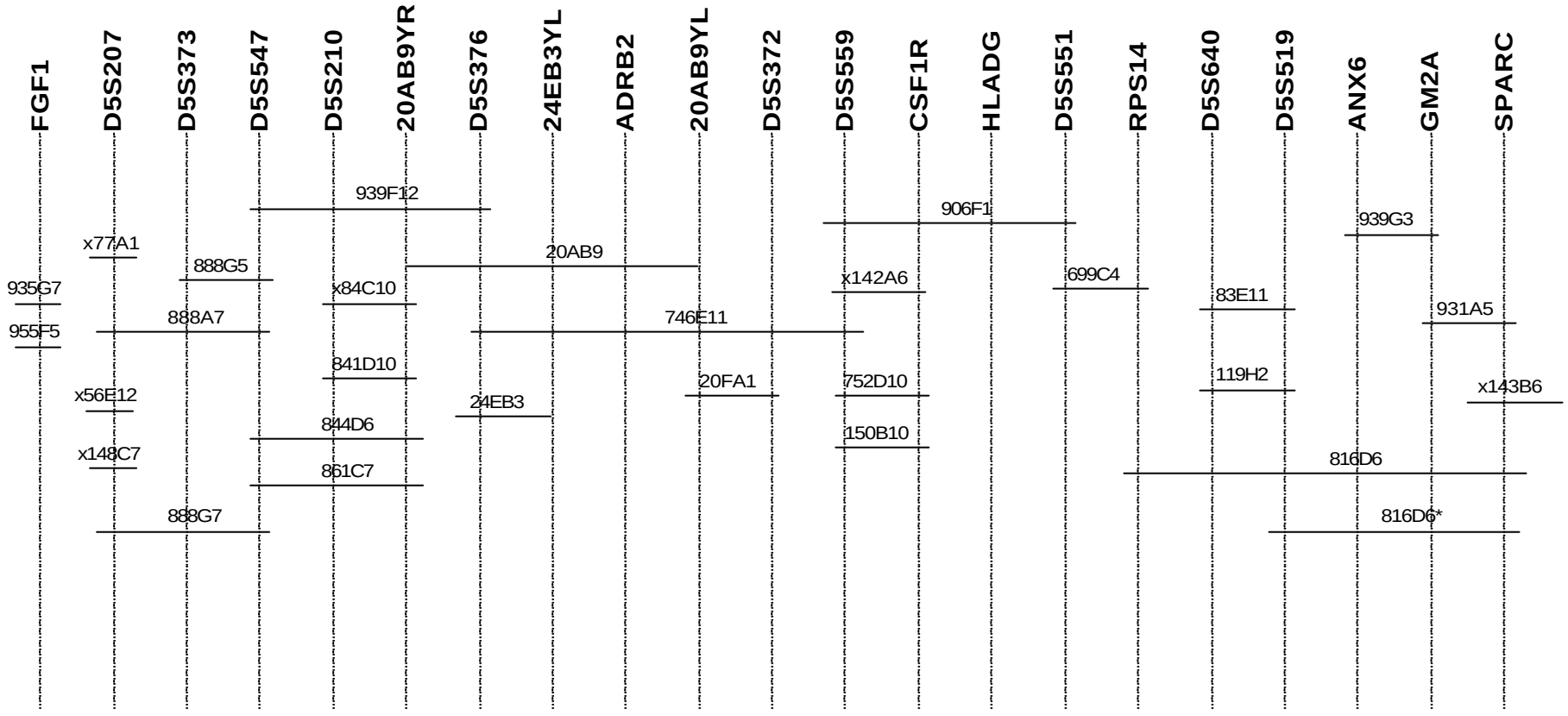
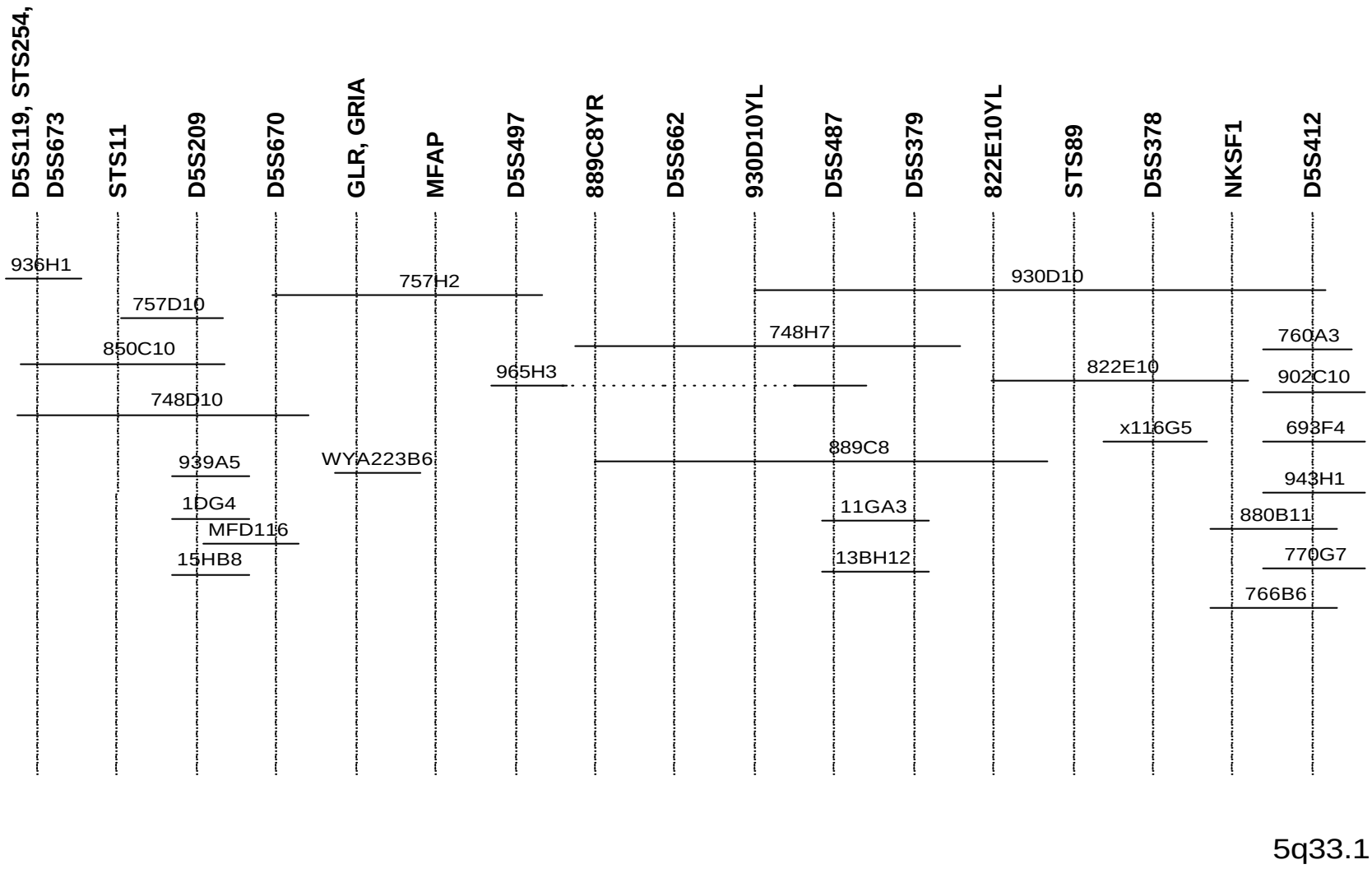


Abb. 16: YAC-Contig 5q31.3-q33.1



Fortsetzung: YAC-Contig 5q31.3-q33.1 (Abb. 16)

5 DISKUSSION

5.1 Konstruktion eines YAC-Contigs im Bereich 5q31-q33

5.1.1 Screening der YAC-Banken mit Hilfe der PCR

Das Durchmustern von YAC-Banken nach positiven Klonen für verschiedenste Marker wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion in drei Schritten durchgeführt. Dieses Vorgehen basiert im wesentlichen auf der von Green et al. 1990 beschriebenen bzw. etablierten Methode.

Das Durchsuchen von YAC-Bibliotheken mittels PCR bietet einige Vorteile gegenüber der Kolonie-Hybridisierung. Diese Vorteile beruhen vor allem auf der hohen Sensitivität und der hohen Spezifität der PCR. So läßt sich unter Verwendung von weniger als 100 ng Template-DNA, die die DNA eines aus Tausenden von YACs bestehenden Pools repräsentiert, ein einzelner positiver Klon identifizieren.
Diese hohe Sensitivität kann sich jedoch auch nachteilig auswirken. So traten beim Durchmustern der YAC-Bibliotheken im Verlauf dieser Arbeit mehrfach falsch-positive Signale auf. In der Regel traten diese falsch-positiven Signale beim ‘Screening’ der Primärpools auf, d.h. die PCR ergab ein positives Signal, das sich anschließende ‘Screening’ der entsprechenden Sub- bzw. Sekundärpools zeigte jedoch keinen positiven Pool. Ursache dieser falsch positiven Ergebnisse können Kontaminationen bei der PCR sein, z.B. durch mehrfach verwendete Mikrotiterplatten oder Verunreinigungen des DNA-Templates bereits im Vorfeld.
Seltener trat der Fall ein, daß positive Primär- und Sekundärpools identifiziert werden konnten, der entsprechende Einzelklon jedoch nicht gefunden wurde. Der Grund hierfür ist nicht sicher bekannt, eine mögliche Erklärung wäre aber beispielsweise, daß der fragliche Klon in einer deletierten Form vorliegt und die gesuchte Sequenz nicht mehr aufweist.

Falsch negative PCR-Ergebnisse dagegen waren in erster Linie auf zu hohe Konzentrationen des DNA-Templates zurückzuführen. Wie bereits von Green et al. 1990 gezeigt wurde, hemmen

(YAC-) DNA-Konzentrationen > 80 ng/µl die PCR in den meisten Fällen. Es war daher wichtig, nach jeder DNA-Isolierung eines Einzelklons die Konzentration zu testen, um die DNA vor dem ersten PCR-Lauf entsprechend verdünnen zu können.

5.1.2 Chimäre YAC-Klone

Wie in Kapitel 1.2 bereits beschrieben, können in YACs DNA-Fragmente von bis zu 2 Mb kloniert werden. Die künstlichen Hefechromosomen stellen dadurch ein nahezu unerläßliches Vektorsystem für die physikalische Kartierung dar.
Nachteilig sind allerdings die geringe Transformationseffizienz im Rahmen der YAC-Konstruktion, der Ertrag an klonierter DNA (eine Kopie pro Zelle) sowie das Auftreten chimärer YAC-Klone. Unter Chimären versteht man künstliche Hefechromosomen, die verschiedene DNA-Abschnitte enthalten, die im Genom nicht zusammenhängend vorliegen. Ursächlich für diese Erscheinung ist u.a. eine Rekombination zwischen verschiedenen YACs während der Transformation (Larionov et al., 1994) oder auch eine Co-Ligation verschiedener Restriktionsfragmente. Chimäre YACs können zum einen Bruchstücke verschiedener Chromosomen enthalten, aber auch unzusammenhängende Fragmente ein und desselben Chromosoms aufweisen. Da YACs zudem zu internen Deletionen und Rearrangements neigen, kann eine Fehlinterpretation bzw. Fehlanordnung von YACs sowie DNA-Markern beim Konstruieren des Contigs nicht immer vermieden werden. Die Häufigkeit chimärer YACs wird abhängig von der jeweiligen YAC-Bank bzw. vom verwendeten Hefestamm mit bis zu 50 % angegeben (Haldi et al., 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chromosomale Zuordnung der im Contig angeordneten YACs deshalb mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) überprüft. Die von cand. med. Kerstin Eppelt und Fr. Dr. Angelika Köhler erzielten Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt.
Die Konstruktion des Contigs war durch vorhandene chimäre YACs wie zu erwarten erschwert. Als problematisch erwies sich besonders die Isolierung von Endfragmenten, da ein *chromosome walking* mit Endstücken, die einem völlig anderen Chromosomenbereich zuzuordnen sind, nicht möglich ist.
YAC 816D6 ist ein typisches Beispiel für ein chimäres und deletiertes bzw. trunkiertes YAC. In seiner nicht deletierten Form mit einer Größe von 1600 kb ist es positiv für die Marker RPS14

sowie D5S519, mit denen es in seiner verkürzten Form (685 kb) nicht reagiert. Ebenfalls chimär und deletiert ist YAC 965H3. Der interne Fragmentverlust verhindert hier den Lückenschluß zwischen D5S479 und D5S662.

5.1.3 Isolierung von Endfragmenten

Um ein vollständig überlappendes Contig zu konstruieren, führt man in aller Regel ein *chromosome walking* durch. Eine der für die 'Chromosomenwanderung' etablierten Methoden ist die Isolierung von Endfragmenten. Die Endfragmente, d.h. die Stücke, die an den Enden des DNA-Inserts liegen, isoliert man dabei von denjenigen Klonen, die eine bestehende Lücke eingrenzen. Durch Sequenzierung dieser Endfragmente lassen sich neue STS-Marker generieren, mit denen dann nach neuen überlappenden Klonen gesucht werden kann. Alternativ lassen sich die Endfragmente auch direkt als Hybridisierungssonde einsetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei Endfragmente mit Hilfe der inversen PCR isoliert werden. Die übrigen 5 potentiellen YAC-Arme stellten sich bei der Sequenz-Analyse u.a. als Alu-Sequenz (939G3YR) oder Teil der Hefe-eigenen Sequenz (757H2YL) heraus und konnten daher nicht weiter verwendet werden.

Lassen sich mittels inverser PCR keine YAC-Arme generieren, ist es notwendig, auf andere Methoden zur Endfragment-Isolierung auszuweichen. Das Vektoretten-System (Riley et al, 1990) oder auch die Vektor-Alu-PCR (Nelson et al., 1989; Ledbetter et al., 1990) beispielsweise stellen mögliche Alternativen zur inversen PCR dar. Die Vektoretten-PCR z.B. ist eine Form der PCR, bei der man sich eines doppelsträngigen Oligonucleotid-Linkers bedient, der zentral eine ungepaarte Region aufweist. Voraussetzung auch für diese PCR ist, daß die zu charakterisierende DNA-Sequenz einen bereits bekannten Bereich einrahmt. Der Oligonucleotid-Linker wird zunächst an die unbekannte Ziel-DNA ligiert. Die zentral ungepaarte Region des Linkers (auch 'Blase' genannt) erlaubt die Konstruktion eines linkerspezifischen Primers. Der zweite Primer kann abgeleitet werden aus der bereits bekannten DNA-Sequenz. Zusammen ermöglichen die Primer die Amplifikation der uncharakterisierten DNA auf einer Seite der bekannten Sequenz.

5.1.4 Erstellung des YAC-Contigs

Ziel dieser Arbeit war der Aufbau eines YAC-Contig in der Region 5q31-q33. Leider wurde das Ziel eines vollständigen Contigs nicht erreicht. Es konnten jedoch drei Teilcontigs zwischen den Markern D5S207 und D5S412 aus insgesamt 54 YAC-Klonen konstruiert werden. 41 Marker, darunter 11 Gene konnten integriert werden. Ein Teil dieser Marker war durch frühere Untersuchungen dem langen Arm des Chromosoms 5 bereits zugeordnet worden (Loftus et al., 1993; Warrington et al., 1994). Sie dienten nun als Startpunkt bei der Suche nach in der Region 5q31-33 lokalisierten YACs.

Wie bereits ausführlich beschrieben, basierte die Identifikation positiver YACs für den Bereich 5q31-q33 auf der systematischen Durchmusterung der ICRF- und der CEPH-YAC-Bibliothek. Die identifizierten YACs wurden mit Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung auf Chimärismus überprüft und ihre Größe mittels Pulsed Field-Gelelektrophorese bestimmt. Nach Etablierung der optimalen Elektrophoresebedingungen ergaben sich hier keine weiteren Probleme.

Zahlreiche der ins Contig integrierten Klone stammten aus der CEPH-Mega-YAC-Bibliothek. Der Vorteil dieser YACs liegt in der Größe ihres Inserts (> 1000 bp), das eine weite Abdeckung des zu kartierenden Bereiches ermöglicht und damit die Zahl der zum Lückenschluß notwendigen *chromosome walks* reduziert.

Im Verlauf dieser Arbeit veröffentlichte eine amerikanische Arbeitsgruppe ein ca. 3 Mb umspannendes YAC-Contig im Bereich 5q31-q33 (Li et al., 1994). Integriert in dieses Contig waren vier CEPH-YAC-Klone, die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mittels Screening identifiziert worden waren. Bezogen auf die Anordnung gemeinsamer Marker ergaben sich keine Unterschiede. Li et al. konnten allerdings das Gen GRL in ihrem Contig lokalisieren, und zwar in einem Bereich etwa 200 kb proximal des Markers D5S207. Versuche, GRL im hier vorliegenden Contig zu lokalisieren, verliefen erfolglos. Keiner der für D5S207 positiven YACs, deren Größe zwischen 590 und 1300 kb liegt, reagierte positiv mit diesem Gen. Da auf diesen YACs ein anderes Gen liegt, FGF1, das im Contig von Li et al. nicht integriert wurde, läßt sich vermuten, daß GRL weiter proximal von FGF1 lokalisiert ist. Möglich wäre auch, daß es sich bei dem für GRL positiven YAC um eine Chimäre handelt. Weiterhin ließ sich das Gen PDEA nicht lokalisieren. PDEA war durch Bestrahlungshybrid-Analyse dem Bereich zwischen ADRB2 und CSF1R

zugeordnet worden (Warrington et al., 1994). Da auch Li et al. (1994) dieses Gen nicht integrieren konnten, ist es wahrscheinlich, daß PDEA weiter distal liegt, z.B. im noch nicht abgedeckten Bereich des Contigs zwischen SPARC und D5S673.
Nicht sicher lokalisieren ließen sich die Gene MFAP3 und ITK. MFAP3 liegt entweder proximal oder aber distal von GLR und GRIA auf dem YAC 757H2. Klärung könnte die Anordnung weiterer YACs in diesem Abschnitt bringen. ITK reagierte deutlich positiv mit YAC 930D10, nicht aber mit den anderen überlappenden YACs. Zu erklären wäre dies beispielsweise mit einer Deletion in einem der anderen YACs. FGF1 liegt proximal von D5S207, konnte aber aufgrund fehlender Überlappungen der YACs 935G7 und 955F5 nicht in das Contig eingebunden werden.

Das Contig konnte nur in Teilbereichen ohne Lücken konstruiert werden. Die Region zwischen den Markern FGF1und D5S207 (s.o.) konnte nicht geschlossen werden, ebenso der Bereich zwischen SPARC und D5S119/D5S673/STS254 sowie D5S479 und 889C8YR. Im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen wird daher zunächst die Suche nach anderen in diesem Bereich liegenden YACs sowie die Generierung neuer Endfragmente/STS-Marker stehen. Aufgrund der noch bestehenden Lücken ist es nur schwer möglich, eine Aussage über die Größe des Contigs zu machen. Unter Zuhilfenahme der Größe der bisher angeordneten YACs umfaßt das Contig wahrscheinlich mehr als 8 Mb.

5.1.5 Ausblick

Die Konstruktion eines YAC-Contigs ist ein erster wichtiger Schritt auf dem Weg zur Sequenzierung des menschlichen Genoms. Mittlerweile umfassen auf YAC-Contigs basierende physikalische Karten mehr als 90 % des menschlichen Genoms (Weissenbach, 1998). Aufgrund der zahlreichen Rearrangements und Deletionen, die in YACs auftreten, können diese physikalischen Karten nicht als Grundlage oder Unterstützung der Genomsequenzierung dienen (Weissenbach, 1998). Ziel ist daher die Erstellung sogenannter *sequence-ready maps* durch Konstruktion von BAC- und PAC-Contigs auf der Grundlage bestehender YAC-Contigs. Die bereits in der Einleitung kurz beschriebenen BACs und PACs können Fragmente bis zu 300 (BACs) bzw. 150 kb (PACs) aufnehmen. Ebenso wie Cosmide (Insertgröße ca. 30-45 kb)

ermöglichen sie eine höhere Auflösung der physikalischen Karte und können direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden (*sequence-ready template*).

Ein weiterer wichtiger Schritt besteht in der Identifizierung und Isolierung von Klonen mit codierender DNA. Auf der Suche nach ‘den Genen’ kann man sich verschiedener Verfahren bedienen. Mittels *exon trapping* lassen sich Sequenzen nachweisen, die sich in einem speziellen Vektor durch Spleißen mit Exons verbinden können. Exons können so gezielt identifiziert werden. Durch Zoo-Blot-Hybridisierung lassen sich codierende Sequenzen detektieren, die bei den unterschiedlichen Spezies während der Evolution konserviert worden sind. Weiterhin kann man genomische DNA-Klone mit mRNA/cDNA hybridisieren oder CpG-Inseln durch Southern-Blotting identifizieren. Durchgesetzt hat sich vor allem die Identifizierung sogenannter exprimierter sequenzmarkierter Stellen (*expressed sequence tag*, EST). Diese werden generiert durch Sequenzierung von cDNA-Fragmenten. EST-Sequenzen erlauben ein schnelles Durchmustern genomischer DNA-Abschnitte. Man schätzt, daß sich bis zu 80 % der menschlichen Gene durch EST-Marker identifizieren lassen.

5.2 Chancen und Risiken des Human Genome Project

5.2.1 Bedeutung des Human Genome Project für die Medizin

Ein Maßstab für den Erfolg des Human Genome Project ist die Anzahl neu identifizierter Gene. Von unmittelbarer Bedeutung für die klinische Medizin sind dabei diejenigen Gene, die, falls in ihrer Sequenz verändert, zu bestimmten Krankheiten prädisponieren. Hierzu zählen z.B. Tumorsuppressor- und Protoonkogene, d.h. Gene, die an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind und damit eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Erkrankungen spielen. Weiterhin zählen u.a. Gene dazu, die an der Entwicklung neurologischer bzw. neuro-degenerativer und hämatologischer Krankheiten sowie an Stoffwechselerkrankungen beteiligt sind. Die Liste läßt sich beliebig fortsetzen.

Informationen über Veränderungen dieser Gene, vorhandene pathogene Mutationen beispielsweise, können im Sinne einer prädiktiven Diagnostik verwendet werden. Mit Hilfe molekulargenetischer Analyse lassen sich Aussagen treffen über das Risiko bzw. die Wahrscheinlichkeit, an einer Krankheit zu erkranken. Ein Vorteil kann für die betroffene Person dann die Möglichkeit der sekundären Prävention darstellen, beispielsweise die Teilnahme an Früherkennungsprogrammen bei einer Prädisposition zu bestimmten malignen Tumoren oder die Änderung bestehender Lebensgewohnheiten bei Existenz risikomodifizierender Faktoren. Die präsymptomatische Diagnostik beschränkt sich jedoch nicht auf ‘Gentests’ beim Erwachsenen, sondern schließt auch die Pränatal- bzw. Präimplantationsdiagnostik ein.

Über verbesserte diagnostische Möglichkeiten hinaus erhofft man sich von der Gen-Sequenzierung und den damit verbundenen Informationen über Genstrukturen eine raschere Aufklärung von Funktion und Regelung einzelner Gene. Diese Erkenntnisse könnten den Weg ebnen für die Entwicklung verschiedenster neuer Therapieansätze, von denen die Gentherapie als solche nur eine von vielen Möglichkeiten darstellt.

Von Bedeutung für zukünftige Therapieregime ist auch die Identifizierung sogenannter *modifier genes* (modifizierende Gene), die beispielsweise durch Beinflussung der Pharmakokinetik, durch Verstärkung oder auch Minderung von Resistenzen beim Individuum ein unterschiedliches

Ansprechen des Einzelnen auf dieselbe (medikamentöse) Therapie bewirken könnte. Bei Kenntnis des individuellen ‘Genprofils’ könnte die in Frage kommende Therapie entsprechend ausgewählt und angepaßt werden.

Den *modifier genes* schreibt man jedoch nicht nur in der Pharmakogenetik eine wichtige Rolle zu. Eine große Anzahl genetischer Erkrankungen zeigt eine inter- sowie auch intra-familiäre Variabilität, die, neben Umweltfaktoren, Genotyp-Phänotyp Korrelationen u.a., vermutlich auch durch den Einfluß ‘modifizierender Gene’ auf den Krankheitsprozeß zu erklären wäre (Houlston et al., 1998). Die klinische Medizin wird sich auf lange Sicht einem grundlegenden Wandel nicht entziehen können. An die Stelle der Therapie weit fortgeschrittener Erkrankungen werden die Diagnose individueller Krankheitsprädispositionen und die damit verbundenen Präventionsmaßnahmen treten.

5.2.2 Ethische, soziale und rechtliche Implikationen

Jeder bedeutende Fortschritt in der Wissenschaft kann Furcht hervorrufen vor einem Mißbrauch der gewonnenen Erkenntnisse. Auch das Human Genome Project bildet hier keine Ausnahme. So hat beispielsweise die prädiktive Gendiagnostik neben all ihrem Nutzen auch Schattenseiten. Die Konsequenzen einer genetischen Analyse können sich weit über den medizinischen Bereich hinaus auf familiäres und gesellschaftliches Umfeld erstrecken. Personen, die aufgrund einer genetischen Veränderung für eine bestimmte Erkrankung prädisponiert sind, können wie oben bereits beschrieben, von Vorsorgeprogrammen profitieren; sie müssen sich aber auch mit dem prospektiv bedeutsamen Testergebnis auseinandersetzen, es in ihre weitere Lebensplanung integrieren. Schwere psychische Konflikte bis hin zum Suizid können die Folge sein. Psychologische bzw. psychotherapeutische Hilfestellung ist dann unabdingbar.

Weitere Probleme für Träger prädisponierender Mutationen sind in versicherungsrechtlicher Hinsicht zu erwarten. Es ist durchaus vorstellbar, daß Versicherungsunternehmen bei einer auffälligen Familienanamnese des Antragstellers auf eine genetische Untersuchung bestehen werden, um ein überdurchschnittlich erhöhtes Erkrankungsrisiko auszuschließen. Würde man in diesem Falle eine genetische Veränderung finden, könnte man der betroffenen Person die Aufnahme in die Kranken- oder Lebensversicherung verweigern.

Geht man von der Vorstellung aus, alle Gene des Menschen seien identifiziert, einschließlich pathogener Mutationen, wäre es denkbar, daß sich jeder Mensch, unabhängig von seiner Familiengeschichte, einem genetischen ‘check-up’ unterziehen müßte. Entsprechend seines ‘Risikoprofils’ würde er dann in verschiedene Klassen eingestuft werden, beispielsweise in die Kategorien Krebserkrankungen, anfällig für psychische Krankheiten oder Herz-Kreislauf-Problematik. Damit könnte sich eine Diskriminierung aufgrund genetischer Merkmale auf die Mehrheit der Gesellschaft ausdehnen.

Im Mittelpunkt der Furcht der Allgemeinheit vor dem Human Genome Project steht neben der Angst vor persönlicher Diskriminierung auch die Angst vor einem Wiederentstehen der Eugenik im Sinne einer ‘genetischen Verbesserung’ des Menschen. Der gezüchtete und geklonte Mensch als Schreckgespenst.

Die ethischen Probleme, die das Human Genome Project aufwirft, stellen sicherlich eine große Herausforderung an den Einzelnen wie auch an die Gesellschaft dar. Jedoch werden die Verringerung menschlichen Leidens, der enorme medizinische Nutzen und die stetig wachsenden Erkenntnisse über die menschliche Biologie dieses historisch einmalige Wissenschaftsprojekt rechtfertigen (Guyer et al., 1993).

Doch sollte bei allem Fortschrittsdenken das Recht des Einzelnen auf ‘Nicht-Wissen’ stets gewahrt bleiben. Dies bedeutet, daß genetische Untersuchungen nur mit ausdrücklicher Einwilligung des aufgeklärten und informierten Patienten durchgeführt werden dürfen.

Ende Mai 1999 waren 11.4 % des menschlichen Genoms sequenziert (http://weber.u.washington.edu/~roach/human_genome_progress2.html).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines YAC-Contigs in der Region 5q31/32-q33. Dieser Region waren zahlreiche Gene für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Hormonrezeptoren und Neurotransmitterrezeptoren zugeordnet worden. Zugeordnet hatte man diesem Chromosomenabschnitt auch mehrere Gene, die verantwortlich sind für eine Reihe verschiedenster Erkrankungen, u.a. dem Treacher Collins Syndrom. Diese Gene waren zu Beginn dieser Arbeit jedoch noch nicht isoliert. 5q31/32-q33 gilt im weiteren als kritische Region für das 5q- Syndrom, einer hämatologischen Erkrankung.

In der Region 5q31/32-q33 lokalisierte YACs wurden durch Screening der ICRF- sowie der CEPH-YAC-Bibliothek isoliert. Durchgeführt wurde das Screening mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR), basierend auf der sogenannten *two step pooling-method*.
Insgesamt konnten so 44 YACs isoliert werden (vier dieser 44 YACs wurden im Laufe dieser Arbeit durch Li et al. bereits in einem Contig integriert und veröffentlicht). Zusätzlich standen YACs der ICI-Bank für den Aufbau des Contigs zur Verfügung. Diese waren durch die Arbeitsgruppe von Dr. M. Dixon bereits der Region 5q31-qter zugeordnet worden. 9 ICI-YACs konnten integriert werden.
Aus allen YAC-Klonen wurde DNA isoliert.

Die Größe der einzelnen YACs wurde durch Pulsed-Field-Gelektrophorese (PFGE) bestimmt. Hierzu wurden zunächst die Elektrophoresebedingungen optimiert. Im Anschluß an die Auftrennung der Hefe-Chromosomen durch PFGE erfolgte ein Southern-Blotting sowie eine Hybridisierung gegen gesamtmenschliche DNA. Dies diente der Abgrenzung und Identifikation der YAC-Klone gegenüber den ‘natürlichen’ Hefe-Chromosomen. Das ‘kleinste’ YAC war ca. 200 kb groß, das ‘größte’ etwa 1600 kb.

Das Contig wurde konstruiert, indem man mit Hilfe der PCR nach Überlappungen zwischen verschiedenen YAC-Klonen suchte: YACs, die sich überlappen, zeigten in der PCR mit demselben Marker ein positives Ergebnis.

Mittels inverser PCR wurden YAC-Endfragmente isoliert. In Plasmiden kloniert und im Anschluß sequenziert, konnten insgesamt drei echte Endfragmente identifiziert werden. Die daraus generierten neuen STS-Marker konnten beim *chromosome walking* eingesetzt werden.

Ein vollständig überlappendes Contig konnte nicht konstruiert werden. Es wurden jedoch 3 Teilcontigs aus insgesamt 54 YACs erstellt. 41 Marker wurden in diese Karte integriert, darunter 11 Gene. Insgesamt konnten 9 neu generierte Marker zugeordnet werden. Das Contig umfaßt wahrscheinlich mehr als 8 Mb.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1994).
Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.
Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.

Boultwood, J., Lewis, S. and Wainscoat, J.S. (1994a).
The 5q- Syndrome.
Blood 84: 3253-3260.

Boultwood, J., Fidler, C., Lewis, S., Kelly, S., Sheridan, H., Littlewood, T.J., Buckle, V.J. and Wainscoat, J.S. (1994b).
Molecular mapping of uncharacteristically small 5q deletions in two patients with the 5q- Syndrome: delineation of the critical region on 5q and identification of a 5q- breakpoint.
Genomics 19: 425-432.

Boultwood, J., Fidler, C., Soularue, P., Strickson, A.J., Kostrzewa, M., Jaju, R.J., Cotter, F.E., Fairweather, N., Monaco, A.P., Müller, U., Lovett, M., Jabs, E.W., Auffray, C. and Wainscoat, J.S. (1997).
Novel genes mapping to the critical region of the 5q- Syndrome.
Genomics 45: 88-96.

Burke, D.T., Carle, G.F. and Olson, M.V. (1987).
Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors.
Science 236: 806-812.

Butler, R., Ogilvie, D.J., Elvin, P., Riley, J.H., Finniear, R.S., Slynn, G., Morten, J.E.N., Markham, A.F. and Anand, R., (1992).
Walking, cloning, and mapping with yeast artificial chromosomes: a contig encompassing D21S13 and D21S16.
Genomics 12: 42-51.

Cohen, D., Chumakov, I. and Weissenbach J. (1993).
A first-generation physical map of the human genome.
Nature 366: 698-701.

Collins, F. and Galas, D. (1993).
A new five-year plan for the U.S. Human Genome Project.
Science 262: 43-46.

Coussens, L., Van Beveren, C., Smith, D., Chen, E., Mitchell, R.L., Isacke, C.M., Verma, I.M. and Ullrich., A. (1986).
Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene fms at carboxyl terminus.
Nature 320: 277-280.

Dib, C., Faure, F., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J. and Weissenbach, J. (1996).
A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites.
Nature 380: 152-154.

Dixon, J., Gladwin, A.J., Loftus, S.K., Riley, J.H., Perveen, R., Wasmuth, J.J., Anand, R. and Dixon, M. J. (1994).
A YAC contig encompassing the Treacher Collins syndrome critical region at 5q31.3-32.
Am. J. Hum. Genet. 55: 372-378.

Dixon, J., Loftus, S.K., Gladwin, A.J., Scambler, P.J., Wasmuth, J.J. and Dixon, M.J. (1995).
Cloning of the human heparan sulfate-N-deacetylase/N-sulfotransferase gene from the Treacher Collins Syndrome candidate region at 5q32-q33.1.
Genomics 26: 239-244.

Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983).
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. 132: 6-13.

Green, E.D. and Olson, M.V. (1990a).
Chromosomal region of the cystic fibrosis gene in yeast artificial chromosomes:
A model for human genome mapping.
Science 250: 94-98.

Green, E.D. and Olson, M.V. (1990b).
Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 12113-1217.

Grady, D.L., Robinson, D.L., Gersh, M., Nickerson, E., McPherson, J., Wasmuth, J.J., Overhauser, J., Deaven, and Moyzis, R.K. (1996).
The generation and regional localization of 303 new chromosome 5 sequence-tagged sites.
Genomics 32: 91-96.

Guyer, M.S. and Collins, F.S. (1993).
The Human Genome Project and the future of medicine.
Am. J. Dis. Child. 147: 1145-1152.

Guyer, M.S. and Collins, F.S. (1995).
How is the Human Genome Project doing, and what have we learned so far?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10841-10848.

Haldi, M., Perrot, V., Saumier, M., Desai, T., Cohen, D., Cherif, D., Ward, D. and Landers, E.S. (1994).
Large human YACs constructed in a rad52 strain show a reduced rate of chimerism.
Genomics 24: 478-84.

Hästbacka, J., de la Chapelle, A., Mahtani, M.M., Clines, G., Reeve-Daly, M.P., Daly, M., Hamilton, B.A., Kusumi, K., Trivedi, B., Weaver, A., Coloma, A., Lovett, M., Buckler, A., Kaitila, I. and Lander, E.S. (1994).
The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping.
Cell 78: 1073-1087.

Heng, H.H.Q., Xie, B., Shi, X.M., Tsui, L.C. and Mahuran, D.J. (1993).
Refined mapping of the G_{M2} activator protein (GM2A) locus to 5q31.3-q33.1, distal to the spinal muscular atrophy locus.
Genomics 18: 429-431.

Hoffman, E.P. (1994).
The evolving Genome Project: current and future impact.
Am. J. Hum. Genet. 54: 129-136.

Houlston, R.S. and Tomlinson, I.P. (1998).
Modifier genes in humans: strategies for identification.
Eur. J. Hum. Genet. 6: 80-88.

Knippers, R. (1997).
Molekulare Genetik.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kostrzewa M., Grady, D.L., Moyzis, R.K., Flöter, L. and Müller, U. (1996a).
Integration of four genes, a pseudogene, thirty-one STSs, and a highly polymorphic STRP into the 7-10 MbYAC contig of 5q34-35.
Hum. Genet. 97: 399-403.

Kostrzewa, M., Kohler, A., Eppelt, K., Hellam, L., Fairweather, N.D., Levy, E.R., Monaco, A.P. and Müller, U. (1996b).
Assignment of genes encoding GABAA receptor subunits alpha 1, alpha 6, beta 2, and gamma 2 to a YAC contig of 5q33.
Eur. J. Hum. Genet. 4: 199-204.

Kostrzewa, M., Krings, B.W., Dixon, M.J., Eppelt, K., Kohler, A., Grady, D.L., Steinberger, D., Fairweather, N.D., Moyzis, R.K., Monaco, A.P. and Müller, U. (1998).
Integrated physical and transcript map of 5q31.3-qter.
Eur. J. Hum. Genet. 6: 266-274.

Larin, Z., Monaco, A.P. and Lehrach, H. (1991).
Yeast artficial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4123-4127.

Larionov, V., Kouprina, N., Nikolaishvili, N. and Resnick, M.A. (1994).
Recombination during transformation as a source of chimeric mammalian artificial chromosomes in yeast (YACs).
Nucleic Acids Res. 20: 4154-4162.

Ledbetter, S.A. (1990).
Rapid Isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetetive sequence polymerase chain reaction.
Genomics 6, 475-481,

Li, X., Wise, C.A., Le Paslier, D., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Pittler, S.J., Lovett, M. and Jabs, E.W. (1994).
A YAC contig of approximately 3 Mb from Human Chromosome 5q31 → q33.
Genomics 19: 470-477.

Loftus, S.K., Dixon, J., Koprivnikar K., Dixon, M.J. and Wasmuth, J.J. (1996).
Transcriptional map of the Treacher Collins candidate gene region.
Genome Research 6: 26-34.

Loftus, S.K., Edwards, S.J., Scherpbier-Heddema, T., Buetow, K.H., Wasmuth, J.J. and Dixon, M.J. (1993).
A combined genetic and radiation hybrid map surrounding the Treacher Collins Syndrome locus on chromosome 5q.
Human Molecular Genetics 11: 1785-1792.

Lu-Kuo, J.M., Le Paslier, D., Weissenbach, J., Chumakov, I., Cohen, D. and Ward, D.C. (1994).
Construction of a YAC contig and a STS map spanning at least seven megabasepairs in chromosome 5q34-35.
Human Molecular Genetics 3: 99-106.

Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F. (1989).
Molecular Cloning. A laboratory manual. Second Edition.
Cold Spring Harbour Laboratory Press.

McKusick, V.A. (1989).
The Human Genome Organisation: history, purposes and membership.
Genomics 5: 385-387.

McPherson, J.D., Apostol, B., Wagner-McPherson, C.B., Hakim, S., Del Mastro, R.G., Aziz, N., Baer, E., Gonzales, G., Krane, M.C., Markovich, R., Masny, P., Ortega, M., Vu, J., Vujicic, M., Church, D.M., Segal, A., Grady, D.L., Moyzis, R.K., Spence, M.A., Lovett, M. and Wasmuth, J.J. (1997).
A radiation hybrid map of human chromosome 5 with integration of cytogenetic, genetic and transcript maps.
Genome Research 7: 897-909.

Murray, A.W. and Szostak, J.W. (1988).
Künstliche Chromosomen.
Spektrum der Wissenschaft 1: 86-91.

Nelson, D.L., Ledbetter, S.A., Corbo, L., Victoria, M.F., Ramirez-Solis, R., Webster, T.D., Ledbetter, D.M. and Caskey, C.F. (1989).
Alu Polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6686-6690.

Neumann, W.L., Westbrook, C.A., Dixon, M., Espinosa, III, R., Patel, Y.D., Nakamura, Y., Weiffenbach, B. and Le Beau, M.M. (1993).
Physical localization of 70 polymorphhic markers to human chromosome 5 by fluorescence in situ hybridization.
Cytogenet. Cell Genet. 62: 207-210.

Newton, C.R. and Graham, A. (1994).
PCR.
Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.

Olson, M., Hood., L., Cantor, C. and Botstein, D. (1989).
A common language for physical mapping of the Human Genome.
Science 245: 1434-1435.

Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finniear, R., Jenner, D., Powell, S., Anand, R., Smith, J.C. and Markham, A.F. (1990).
A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones.
Nucleic Acids Res. 18: 2887-2890.

Rommens, J.M., Iannuzi, M.C., Kerem, B.S., Drum, M.L., Melmer, G., Dean, M. and Rozmahel, R. (1989).
Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping.
Science 245: 1059-1065.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.F., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988).
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase.
Science 239: 287-491.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977).
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.

Schepers, U., Glombitza, G., Lemm, T., Hoffmann, A., Chabas, A., Ozand, P. and Sandhoff P. (1996).
Molecular analysis of a GM2-activator deficiency in two patients with GM2-Gangliosidosis AB variant.
Am. J. Hum. Genet. 59: 1048-1056.

Schlessinger, D. (1990).
Yeast artificial chromosomes: tools for mapping and analysis of complex genomes.
Trends. Genet. 6: 248-258.

Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984).
Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.
Cell 37: 67-75.

Southern, E.M. (1975).
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Strachan, T., Read, A.P. (1996).
Molekulare Humangenetik.
Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.

Swallow, D.M., Islam, I., Fox, M.F., Povey, S., Klima, H., Schepers, U. and Sandhoff, K. (1993).
Regional localization of the gene coding for the G_{M2} activator protein (GM2A) to chromosome 5q32-33 and confirmation of the assignment of GM2AP to chromosome 3.
Ann. Hum. Genet. 57: 187-193.

Swaroop, A., Hogan, B.L.M. and Franke, U. (1998).
Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: Sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33.
Genomics 2: 37-47.

The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group (1996).
Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome.
Nat. Genet. 12, 130-1136.

Triglia, T., Peterson, M.G. and Kemp, D.J. (1988).
A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences.
Nucleic Acids Res. 16: 8186.

Warrington, J.A. and Bengtsson, U. (1994).
High-Resolution physical mapping of human 5q31-q33 using three methods: radiation hybrid mapping, interphase *in situ* hybridization, and pulsed-field gel elektrophoresis.
Genomics 24, 395-398.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. (1993).
Rekombinierte DNA.
Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.

Weber, J.L. (1990).
Informativeness of human $(dC\text{-}dA)_n \cdot (dG\text{-}dT)_n$ polymorphisms.
Genomics 7: 524-530.

Weissenbach, J. (1998).
The Human Genome Project: from mapping to sequencing.
Clin. Chem. Lab. Med. 36: 511-514.

White, R. and Jalouel, J.M. (1988).
Kartierung von Chromosomen mit DNA-Markern.
Spektrum der Wissenschaft 4: 80-89.

World-Wide-Web:

Understanding our genetic Inheritance. The U.S. Human Genome Project.
http://www.ornl.gov

Genes, Locations and Genetic Disorders on Chromosome 5.
http://gdbwww.gdb.org/gdbreports/chr.5.omim.html

The National Human Genome Research Institute.
http://www.nhgri.nih.gov

Sequenzierung des menschlichen Genoms - aktueller Stand.
http://weber.u.washington.edu/~roach/human_genome_progress2.html.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Aqua
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain
CHEF	contour clamped homogenous electrical field
Contig	contigous region
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat
ddH_2O	2'-Desoxy-Guanin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymin-5'-Triphosphat
dYT	double yeast tryptone
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	enhanced chemiluminescens
EDTA	Ethylendiamintetraesigsäure
EtOH	Ethanol
FISH	Fluorescens-*in situ*-Hybridisierung
kb	Kilobasen(paare)
konz.	konzentriert
Lsg.	Lösung
LMP	low melting point
M	Molare Lösung
Mb	Megabasen(paare)
mM	Millimolar
^{32}P	radioaktives Phosphorisotop 32
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

^{35}S	radioaktives Schwefelisotop 35
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SSC	standard saline-citrat
STS	sequence tagged site
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFB	Transformation Buffer
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
üN	über Nacht
X-Gal	5-Brom -4-chlor-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid
YAC	yeast artificial chromosome (künstliches Hefechromosom)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nicole Herröder
Anschrift	Zollernring 18
	89073 Ulm
Telefon	0731/9213457

Geburtsdatum	31. Oktober 1970
Geburtsort	Gedern
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch

Schulausbildung

1977 - 1981	Grundschule Friedrichstal
1981 - 1987	Gymnasialer Zweig der Gesamtschule Gedern
1987 - 1990	Gymnasium Nidda mit Abschluß Abitur

Studium

WS 1990/91	Beginn des Medizinstudiums an der Justus-Liebig-Universität in Giessen
Oktober 1992	Ärztliche Vorprüfung
September 1993	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1996	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 1997	Dritter Abschnitt der Arztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

Mai 1996 - Aug. 1996	Chirurgie am Baragwanath Hospital, Lehrkrankenhaus der University of the Witwatersrand in Johannesburg, Südafrika
Sept. 1996 - Okt. 1996	Gynäkologie am Lousiana State University Medical Center der LSU School of Medicine in New Orleans, USA
Okt. 1996 - Dez. 1996	Gynäkologie an der Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität Giessen
Jan. 1997 - März 1997	Innere Medizin am Massachusetts General Hospital sowie an zwei weiteren Lehrkrankenhäusern der Harvard Medical School in Boston, USA

28. Mai 1997	Erlaubnis für die Tätigkeit als Ärztin im Praktikum
Juni 1997 - Aug. 1997	Vorbereitung für den zweiten Teil des amerikanischen Staatsexamens / USMLE Step 2 (Prüfung abgelegt am 26./27. August 1997)
Okt. 1993 - Okt. 1995	Doktorandin am Institut für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität in Giessen (experimenteller Teil)

Beruf

Dez. 1997 - Mai 1999	Ärztin im Praktikum an der Universitäts-Frauenklinik Ulm
seit Juni 1999	Assistenzärztin an der Universitäts-Frauenklinik Ulm

Ulm, den 18.06.99

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. U. Müller danke ich für die Vergabe des Themas, sein stetes Interesse an dieser Arbeit und für die anregenden Diskussionen während der Durchführung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus Kostrzewa, der mich während meiner experimentellen Arbeit im Labor betreute. Seine zahlreichen Ratschläge und seine hilfreiche Unterstützung beim Durchführen der Versuche haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dr. med. Lars Flöter danke ich für die nette und kollegiale Zusammenarbeit im Labor, bei Kerstin Eppelt bedanke ich mich für die FISH-Analysen der YACs.

Ich danke weiterhin allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit.

Einen besonders lieben Dank möchte ich Dr. Volker Haeberlin aussprechen, der mich nicht nur im Verlauf dieser Arbeit, sondern auch während meines Studiums immer unterstützte und mich vor allem in ‘Krisenzeiten’ immer wieder neu motivierte.

Nicole Herröder