

**Identifikation chromosomaler Bruchpunkte
der genetisch instabilen Region 9p23-24 in
BRCA2-Mutationsträgern**

Stefan Brouwers

2004

**Identifikation chromosomaler Bruchpunkte
der genetisch instabilen Region 9p23-24 in
BRCA2-Mutationsträgern**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

(D386)

vorgelegt von Diplom-Biologe Stefan Brouwers

Betreuer: Prof. Dr. Manfred Schwab
Koreferent: Prof. Dr. John Cullum

Datum: 15.01.2004

Prüfungskommission :

- Vorsitzender: Prof. Dr. Heinrich Zankl
1. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schwab
2. Gutachter: Prof. Dr. John Cullum

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in der Abteilung Tumorgenetik (Leiter: Prof. Dr. Manfred Schwab) in Heidelberg angefertigt und im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern von Prof. Dr. Manfred Schwab wissenschaftlich betreut.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
1. Einleitung	4
1.1 Krebsentstehung.....	4
1.1.1 Modelle und Hypothesen der Krebsentstehung.....	5
1.1.2 Genetische Instabilität am Beispiel bekannter Gene	7
1.1.3 Genetische Instabilität und DNA-Reparatur.....	10
1.2 Brustkrebs	14
1.2.1 Genetische Prädispositionen für weiblichen/männlichen Brustkrebs.....	14
1.3 <i>BRCA2</i>	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien.....	21
2.1.2 Radioisotope	22
2.1.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	23
2.1.4 Antibiotika	23
2.1.5 Nukleinsäuren.....	23
2.1.6.Oligonukleotide / Klone	24
2.1.7 Photomaterialien.....	24
2.1.8 Zellkulturmedien	25
2.1.9 Zelllinien.....	25
2.1.10 Computerserver (Datenbanken) und Bildverarbeitungsprogramme.....	25
2.1.11 Laborgeräte.....	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 Präparation genomischer DNA / (m)RNA aus humanen Zellen	28
2.2.2 Behandlung von YAC-transformierten Hefen.....	29
2.2.3 Präparation von BAC-DNA.....	30
2.2.4 Herstellung von Bakterien-DNA und Hefe-Lysaten für die PCR	30
2.2.5 Restriktionsverdau genomischer DNA	31
2.2.6 Nick Translation	32
2.2.7 Spreiten von Metaphase-Chromosomen.....	32
2.2.8 RNase-Pepsin-Behandlung von Metaphase-Präparaten für die FISH	34
2.2.9 Chromosomale Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH).....	35
2.2.10 Restriktion von <i>BRCA2</i> -Mutationsträger DNA mittels häufig restringierender Enzyme..	37
2.2.11 Präparation von in Gelblöcken eingebetteter DNA	37
2.2.12 Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE).....	39
2.2.13 Radioaktive Markierung von DNA	40
2.2.14 PCR-Amplifikation von BAC spezifischen DNA-Proben.....	41
2.2.15 Southern Blot (Alkali Blot)	42
2.2.16 Southern-Hybridisierung	42
2.2.17 Bioinformatische Programme zur Herstellung von Hybridisierungssonden	43
2.2.18 Identifizierung potentiell transkribierter Sequenzen in human-genomischer DNA	44

3. Ergebnisse	47
3.1 Aufbau einer BAC-Contig zur Charakterisierung der chromosomalen Bruchpunkte in drei Familien mit <i>BRCA2</i> -Mutationsträgern	47
3.2 Analyse der chromosomalen Region 9p23-24 in <i>BRCA2</i> -Mutationsträgern	50
3.2.1 FISH Analyse der Mutationsträger von Familie 1	50
3.2.2 Chromosomale Analyse des Mutationsträgers 3.2 von Familie 2	53
3.2.3 Chromosomale Analyse des <i>BRCA2</i> -Mutationsträgers 4.4 der Familie 3	55
3.3 Untersuchung von Mutationsträgern der drei Familien mit Hilfe der Interphasen-FISH	57
3.4 Chromosomale Analyse mittels Southern-Hybridisierungen	61
3.4.1 PCR-Proben detektieren aberrante DNA-Fragmente im Bereich <i>D9S774</i> und <i>D9S267</i> der <i>BRCA2</i> -Mutationsträger	62
3.4.2 PCR-Proben detektieren Bruchpunkte im DNA-Bereich proximal <i>D9S774</i> und proximal <i>D9S267</i> in <i>BRCA2</i> -Mutationsträgern	64
3.5 Bioinformatische Analyse der genomischen Sequenz im Bereich der chromosomalen Bruchpunkte	70
3.6 Das <i>mPDZ</i> - und <i>TYRP1</i> -Gen innerhalb der Inversion in <i>BRCA2</i> -Mutationsträgern	73
3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse	76
4. Diskussion	77
4.1 Kartierung der Inversion/Duplikation des Bereiches 9p23-24 in <i>BRCA2</i> -Mutationsträgern	77
4.1.1 Die BAC-Contig des genetisch instabilen Bereiches 9p23-24	78
4.1.2 Inversion und Duplikation	79
4.1.3 Southern-Analysen der Inversion 9p23-24	81
4.2 <i>Repeats</i> als <i>hot-spots</i> genetischer Instabilität?	83
4.3 Zusammenhang zwischen der <i>BRCA2</i> -Mutation und der instabilen Region 9p23-24	87
4.3.1 Haploinsuffizienz von <i>BRCA2</i> als Faktor der genetischen Instabilität?	88
4.3.2 <i>mPDZ</i> und <i>TYRP1</i> als Modifikatoren des männlichen Brustkrebs?	90
4.4 Ausblick	91
5. Literaturverzeichnis	92
6. Abkürzungen	103
7. Anhang	105
A. Verzeichnis der BAC-Klone	105
B. Verzeichnis der Primersequenzen für die PCR	105
C. Lebenslauf	111
D. Publikationen	112
E. Danksagung	113

Zusammenfassung

Bei Frauen ist Brustkrebs mit einem Viertel aller Krebserkrankungen die am häufigsten diagnostizierte Krebsart, während die Inzidenz bei Männern wesentlich geringer ist. Nur 10-15% aller Brustkrebserkrankungen können auf familiär prädisponierende Faktoren wie *BRCA1* und *BRCA2* zurückgeführt werden. Eine genetische Prädisposition bei hereditärem männlichem Brustkrebs wird für *BRCA2* bestätigt. Funktionelle Analysen geben Grund zur Annahme, dass *BRCA2* eine duale Rolle besitzt. Neben der Caretaker-Funktion für genomische Stabilität, ist auch eine Gatekeeper-Funktion bei der Transkriptionsregulation beschrieben. Die Basis dieser Arbeit beruht auf der Beobachtung, dass männliche *BRCA2*-Mutationsträger von 3 verschiedenen Familien mit hereditärem Brustkrebs auffällige chromosomale Veränderungen der Region 9p23-24 aufweisen. Vorarbeiten ließen einen kausalen Zusammenhang zwischen *BRCA2*-Mutation und 9p-Veränderung möglich erscheinen.

Das Ziel der Arbeit bestand darin, durch molekularbiologische Methoden die Bruchpunkte in 9p23-24 bei *BRCA2*-Mutationsträgern unabhängiger Familien zu identifizieren und damit einen weiteren Hinweis auf die Entstehung dieser Instabilität zu geben. In dieser Arbeit konnten mittels FISH, PFGE und bioinformatischer Techniken sowohl Inversionen als auch Duplikationen festgestellt werden. Eine überlappende Inversion zeigte sich hierbei deutlich bei allen untersuchten Mutationsträgern. Mit einer FISH-Analyse konnte bei den Mutationsträgern der Familien 1 bis 3 eine Inversion im Bereich der STS-Marker *D9S267* und *D9S775* detektiert werden. Ferner konnte durch Interphasen-FISH eine Duplikation im Bruchpunktbereich um den STS-Marker *D9S268* identifiziert werden. Southern-Analysen konnten Bruchpunkte in den Mutationsträgern der Familien 1 und 2 mittels der Enzyme *EcoRI* und *SacI* bestätigen. In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die Inversionsbruchpunkte der Mutationsträger 3.3, 3.4 und 3.5 von Familie 1 in der unmittelbaren Nähe von *low-copy repeats* befinden, deren Größe 5kb-8kb beträgt. Die identifizierte Inversion überspannt im Wesentlichen die Gene *TYRP1* und *mPDZ*. Bei dem durch die Inversion direkt betroffenen Gen handelt es sich um das *mPDZ*-Gen. Das Protein besitzt 13 PDZ-Domänen, deren Interaktionspartner beschrieben sind. Die Genexpression beider Gene konnte in lymphoblastoiden Zellen nachgewiesen werden.

Die Erkenntnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass *repeat*-Sequenzen in der Umgebung der Bruchpunkte bei der Entstehung von Rearrangements auch in diesen *BRCA2*-Mutationsträgern eine große Rolle spielen.

1 Einleitung

1.1 Krebsentstehung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen des Menschen in den westlichen Industrienationen. Jährlich erkranken dabei etwa 350.000 Menschen neu an Krebs. Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Ursachen, die im Zusammenhang mit der Krebsentstehung stehen sind Viren, Chemikalien, Ernährung und ionisierende Strahlung. Erste Hinweise, dass körpereigene Gene für die Entstehung von Krebs verantwortlich sind, wurden 1975 gefunden. Experimente zeigten, dass das Rous-Sarcoma-Virus ein Gen enthält, das für die Ausbildung von Sarkomen bei Hühnern verantwortlich ist (Duesberg, Kawai et al. 1975). Dieses virale Gen *v-src* ist das erste beschriebene Onkogen. Duesberg und Hanafasu stellten fest, dass dieses Gen vom Wirt (Huhn) über einen gezielten Mechanismus des Virus (Transduktion) aufgenommen und in ein virales Onkogen (*v-onc*) umgewandelt wird, um dann, wenn es zurück in Hühner gelangt, Krebs auszulösen. Die größte Entdeckung war aber, dass eine Kopie dieses *src*-Gens in Tieren und Menschen vorhanden ist. In ihrer natürlichen (nicht-mutierten) Form heißen diese Gene daher „Proto-Onkogene“. Sie sind natürlicher Bestandteil des zellulären Genoms und sind zwischen Eukaryonten konserviert. Das Proto-Onkogen *src* kodiert für eine Proteinkinase, die eine Signalweiterleitung (Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyrosinreste) auf Wachstumsfaktoren während der Zellentwicklung durchführt. Die onkogene Form des *src* ist eine aktivierte Kinase, die die Zellproliferation trotz des Fehlens von Wachstumsfaktoren fördert. Weitere bekannte Onkogene sind das *BCL*-Gen (B-cell lymphoma) oder das *MYC*-Gen (ein zelluläres, dem Onkogen des Myelozytomatose-Virus homologes Gen).

Neben den Onkogenen gibt es Gene, die der Krebsentstehung entgegenwirken und die als Tumorsuppressorgene bezeichnet werden. Die Proteine dieser Gene können in Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparaturproteine, Zellkontakt-Proteine sowie Mitglieder der Signaltransduktionskette gegliedert werden. P53 und RB zählen zu den bekanntesten Vertretern der Tumorsuppressoren. P53 kodiert für einen Transkriptionsaktivator und ist benannt nach der Proteingröße von 53 kDa (Linzer and Levine 1979; Levine, Momand et al. 1991). Wird die DNA einer Zelle durch ionisierende Strahlung oder chemische Kanzerogene geschädigt, kommt es zu einer Akkumulation von p53-Proteinen in der Zelle. Dies führt zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase (Lane 1992). Proteine der DNA-Reparatur besitzen dann die Möglichkeit, die DNA-Schädigung zu reparieren. Gelingt dies nicht, so

kann p53 den Zelltod (Apoptose) einleiten. Es ist bekannt, dass das Tumorsuppressorgen *p53* in über 50 % aller bekannten Tumoren mutiert ist (Hollstein, Sidransky et al. 1991). P53 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus sowie ein entscheidender Vermittler der apoptotischen Antwort in DNA-geschädigten Zellen. Durch die mannigfaltigen Wirkungsweisen seiner Zielgene dient p53 dem Erhalt der genomischen Stabilität einer Zelle (Baker, Markowitz et al. 1990; Mercer, Shields et al. 1990). Zudem konnte gezeigt werden, dass p53 in seiner primären Rolle als Transkriptionsfaktor verschiedene wichtige Funktionen vermittelt, so ist der Zellzyklus-Inhibitor p21 (el-Deiry, Tokino et al. 1993) ebenso ein p53-Zielgen, wie der für die Regulation der Apoptose essentielle BCL-2-Antagonist BAX (Miyashita and Reed 1995). Auch verschiedene DNA-Reparaturenzyme wie PCNA (Morris, Bischoff et al. 1996) und GADD45 (Kastan, Zhan et al. 1992) stehen unter der Kontrolle von p53.

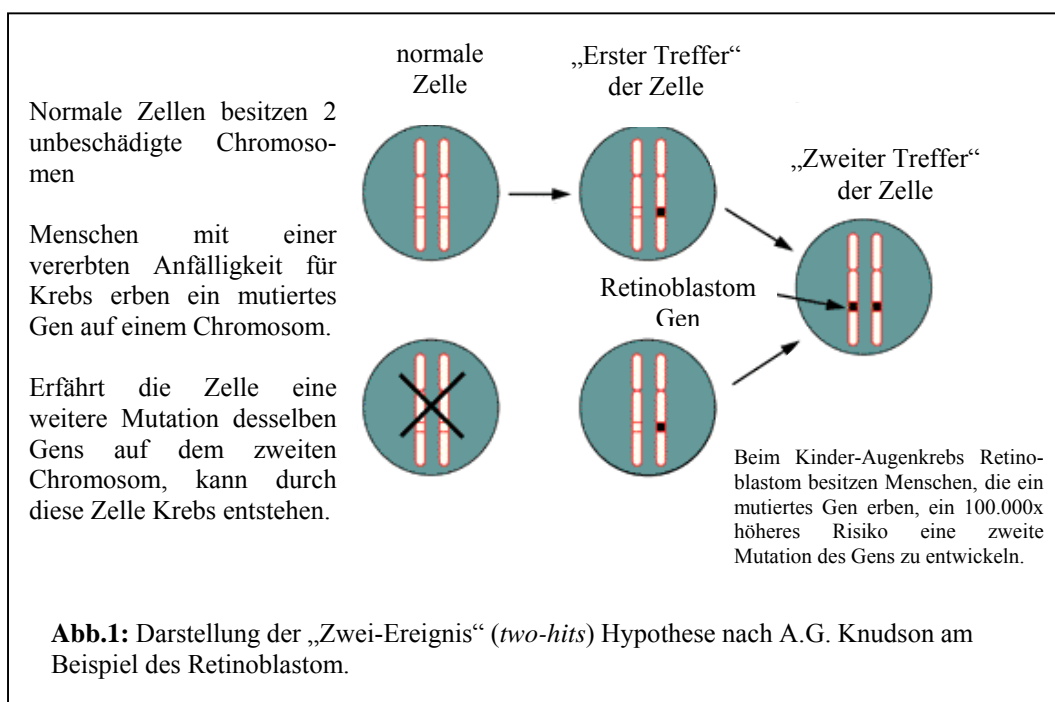
1.1.1 Modelle und Hypothesen der Krebsentstehung

Durch die Entdeckung von Duesberg und Hanafasu, dass vermutlich zelluläre Gene in Onkogene mutieren können, formulierten Varmus und Bishop die heute bekannte Onkogenhypothese. Hierbei stellten sie durch Arbeiten an Retroviren fest (Stehelin, Varmus et al. 1976), dass Krebsgene (Onkogene) sich aus zellulären Genen (Proto-Onkogene) entwickeln können. Diese Hypothese besagte, dass der Grund der Krebsentstehung genetische Information ist, die vor langer Zeit von Viren in eukaryontische Zellen übertragen wurde. Für ihre Ergebnisse und die Hypothese erhielten Varmus und Bishop 1989 den Nobelpreis. Heute weiß man, dass Punktmutationen, Deletionen, Translokationen oder auch Amplifikationen eine entscheidende Rolle bei der Umwandlung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen spielen. Die meisten Proteine der Proto-Onkogene zählen zu den Wachstumsfaktoren, Wachstumsrezeptoren, Proteinkinasen, G-Proteinen und Transkriptionsfaktoren.

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Aufklärung genetischer Disposition für die Krebsentstehung war die Beobachtung von A.G. Knudson beim Retinoblastom (1971) und die von ihm abgeleitete „Zwei-Ereignis“ (*two-hits*) Theorie, die damals auf rein epidemiologischen Erkenntnissen beruhte (Knudson 1971; Stehelin, Varmus et al. 1976). Retinoblastome entstehen aus Zellen der embryonalen Retina und treten bei Kindern mit einer Inzidenz von 1:20000 auf. Knudson unterschied hierbei zwei Gruppen von Retinoblastomen. In der ersten Gruppe, bei etwa 40% der Kinder mit Retinoblastom, liegt eine genetische Disposition vor, wobei die Tumore häufig bilateral auftreten. In der zweiten Gruppe, etwa 60% der Kinder, liegt ein Retinoblastom vor, ohne dass eine familiäre Vorgeschichte bekannt wäre. Das

Retinoblastom tritt hierbei nur unilateral auf. Auf der Basis dieser Zusammenhänge formulierte Knudson eine Theorie, die besagt, dass zwei unabhängige Mutationen auf beiden Allelen für die maligne Entartung der Retinazellen erforderlich sind. Bei der hereditären Form wird bereits ein mutiertes Allel über die Keimbahn vererbt. Eine somatische Mutation des zweiten Allels führt zur Entstehung des Tumors (Abb.1). Durch diese Theorie wird erklärt, warum bei bilateralen Tumoren immer eine genetische Prädisposition vorhanden ist. Bei bilateralen Tumoren ohne Disposition müsste das *RB*-Gen in 2 Zellen auf beiden Allelen getroffen werden, was jedoch äußerst unwahrscheinlich ist. Diese These wird durch die geringe Inzidenz (1:30000) beim unilateralen Retinoblastom bestätigt.

Das damals noch unbekanntes Gen wurde anhand seiner Zellwachstum-kontrollierenden Funktion auch als Tumorsuppressorgen bezeichnet. Erst im Jahre 1988 konnte das auf 13q14 gelegene *RB1*-Gen isoliert werden und war somit das erste molekularbiologisch charakterisierte Tumorsuppressorgen.



Eine heute sehr verbreitete Hypothese für die Krebsentstehung ist die Viel-Treffer (*multi-hit*)-Hypothese, bei der mehrere Mutationsereignisse auftreten müssen, damit ein Tumor ausgebildet werden kann. Ein bekanntes Beispiel ist der Kolonkrebs, bei dem mehrere Gene (APC -> K-RAS -> DDC -> TP53 -> ?) mutiert sein müssen, um diesen Phänotyp auslösen zu können (Fearon and Vogelstein 1990). Sowohl die Zwei-Treffer-Theorie (Knudson) als auch die Viel-Treffer-Theorie (Fearon) beruhen auf der Annahme, dass erst eine homozygote Mutation eines Gens auftreten muss, um einen genetischen Effekt (Tumorentstehung)

auslösen zu können. Eine Gegenhypothese stellt die Haploinsuffizienz (heterozygoter Mutationsstatus) dar, die durch neue Forschungsergebnisse an Gewicht erhält (Fodde and Smits 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation oder der Verlust eines der beiden Allele eines Gens ausreichend sein kann, um eine Tumorgenese auszulösen. Dieser Gen-Dosis-Effekt wird auch Haploinsuffizienz genannt und wurde bisher durch zwei experimentelle Ansätze gezeigt. Einerseits zeigten Menschen oder Mäuse, die eine heterozygote Mutation eines Tumorsuppressorgens besitzen, eine höhere Rate der Tumorentwicklung als Wildtypen (Venkatachalam, Shi et al. 1998; Song, Sullivan et al. 1999). Andererseits kann Haploinsuffizienz das Krebsrisiko in Menschen und Mäusen, die schon eine heterozygote Mutation eines Tumorsuppressorgens besitzen (s.a. Knudson's „Zwei-Ereignis-Theorie“), weiter erhöhen (Smits, Ruiz et al. 2000).

1.1.2 Genetische Instabilität am Beispiel bekannter Gene

Heute kennen wir eine Vielzahl von Genen, die durch eine Mutation zur Krebsentstehung beitragen.

1. Dysregulation des *BCL-2* Gens bei Lymphomen durch Translokation

Diese Translokation zwischen dem Chromosom 14 und 18 (t(14;18) (q32;q21)) ist eine der häufigsten Veränderungen in menschlichen Lymphomen. Man findet sie in ca. 80% der folliculären, in ca. 20% der diffusen großzelligen und in ca. 50% der adulten undifferenzierten Lymphome (Cleary and Sklar 1985). Die Lokalisation des Bruchpunktes deutet auf eine fehlerhafte Rekombination zwischen D- und J-Segmenten des Immunoglobulin-Schwerkettengens auf Chromosom 14 hin. Auf Chromosom 18 liegen die Bruchstellen in der Nähe des Onkogens *BCL-2* (B-cell lymphoma). Als Folge der Translokation t(14;18) gerät das *BCL-2* Gen unter die Kontrolle eines anderen Promotors und wird verstärkt durch NF- κ B mittels des CRE (c-AMP response element) und SP1-Bindestellen exprimiert (Heckman, Mehew et al. 2002). In transgenen Mäusen, die das *Bcl-2* Gen überexprimieren zeigte es sich, dass die Lebensdauer von B-Lymphozyten verlängert ist (Nunez, London et al. 1990).

2. Das *MYC*-Gen des Burkitt-Lymphoms

Das Burkitt-Lymphom ist eine maligne Erkrankung von Lymphozyten der B-Zelllinie. In bestimmten Malariagegenden Zentral- und Ostafrikas ist das Burkitt-Lymphom der häufigste bösartige Tumor bei Kindern. Diese Form wird auch als endemisches Burkitt-Lymphom (Inzidenz in Äquatorial Afrika von 1:10.000) bezeichnet, wobei das Epstein-Barr-Virus häufig mit vergesellschaftet ist. Demgegenüber werden die außerhalb von Malariagebieten weltweit vorkommenden, jedoch wesentlich selteneren Burkitt-Lymphome als sporadische Burkitt-Lymphome bezeichnet. In den meisten Fällen findet man eine Translokation, die einen reziproken Austausch zwischen den langen Armen der Chromosomen 8 und 14 darstellt. In seltenen Fällen kann die Translokation auch mit Abschnitten des Chromosoms 2 oder 22 stattfinden (Rabbitts 1994). Wie festgestellt wurde, beinhaltet die Translokation $t(8;14)$ auf Chromosom 8 das Gen *MYC* und auf Chromosom 14 das Ig-Schwerketten-Gen. Bei den seltenen Fällen sind das IG-Leichtketten-Gen auf Chromosom 2 (Ig-kappa) oder Chromosom 22 (Ig-lambda) betroffen. Gemeinsam ist allen Translokationen die Verwicklung der Immunoglobulin-Loci und eine Dysregulation des *MYC*-Gens. Diese Dysregulation lässt sich hierbei auf verschiedene Promotor- bzw. Enhancer-Kombinationen zurückführen, die durch die unterschiedlichen Translokationen hervorgerufen werden können. Hierzu konnte gezeigt werden, dass bei der $t(2;8)$ das *MYC*-Gen unter die Kontrolle des Ig-kappa Locus gesetzt wird. Expressionskonstrukte zeigten dabei, dass die Transkriptionsaktivierung des *c-MYC*-Gens hauptsächlich über den P1-Promoter durchgeführt wird. Dieser Ig-kappa Locus zeichnet sich durch eine Matrix-Anlagerungsregion, Intron-Enhancer und einen 3'-Enhancer aus (Polack, Feederle et al. 1993).

3. Hybridgene: Das „Philadelphia“-Chromosom und das *RET*-Onkogen

Nowell und Hungerford beschrieben 1960 erstmals eine, in einem Tumor häufig auftretende, Chromosomenanomalie des Chromosoms 22, welche heute als „Philadelphia“ (Ph1)-Chromosom bezeichnet wird. 1973 konnte die Gruppe um Janet Rowley nachweisen, dass das Philadelphia-Chromosom das Produkt einer reziproken Translokation $t(9;22)$ (q34;q11) zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 ist (Rowley 1973). Einige Jahre später zeigten Bartram bzw. Groffen und Mitarbeiter, dass es infolge der Translokation zur Juxtaposition zweier Gene kommt, nämlich des *ABL*-Gens auf Chromosom 9 (Bartram, de Klein et al. 1983) und des *BCR*-Gens auf Chromosom 22 (Groffen, Stephenson et al. 1984). *ABL* ist das humane Homolog von *v-ABL*, ein Bestandteil eines Anfang der siebziger Jahre erstmalig von Abelson beschriebenen murinen Leukämievirus (MuLV) (Abelson and

Rabstein 1970). Der Name *BCR* (**B**reakpoint **C**luster **R**egion) wurde geprägt, als man realisierte, dass die Bruchpunkte auf Chromosom 22 in einer relativ begrenzten Region lokalisiert sind, die das Gen enthalten. Diese zu 90% in Chronischer Myeloischer Leukämie auftretende Translokation hat die Aktivierung des Onkogens „*BCR-ABL*“ zur Folge. Den *BCR-ABL* Transkripten fehlt das *ABL*-Exon 1a. Sie bestehen aus *BCR*-Exons, die direkt an das *ABL*-Exon a2 fusioniert sind. *ABL* kodiert für eine 145 kDa große nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die in verschiedenen Signalwegen involviert ist (Sawyers, McLaughlin et al. 1994; Baskaran, Wood et al. 1997). Die Kinase ist durch den Verlust des *ABL*-Exons 1a, hervorgerufen durch die Translokation, hyperaktiv, was zu einer verstärkten Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen führt und gleichzeitig deren Apoptose inhibiert (Melo 1996; Melo 1996).

***RET*-Onkogen**

Bei dem *RET*-Onkogen (*Rearranged during Transfection*) handelt es sich um ein Proto-Onkogen (*c-ret* Rezeptor-Tyrosinkinase), dessen Mutation verschiedene Formen des hereditären medullären Schilddrüsenkarzinoms auslöst. Hierbei kann das Gen, welches auf Chromosom 10 (10q11.1) lokalisiert, durch eine Inversion oder Translokation mit verschiedenen anderen Genen fusionieren. Das häufigste Rearrangement ist die parazentrische Inversion $inv(10)(q11.2;q21)$, wodurch das Hybridgen *RET/PTC1* entsteht. Die Hybridgene, die durch Anteile des *RET*-Gens und variabler Fusionspartner entstehen, werden als *PTC* (*papillary thyroid cancer*)-Gene bezeichnet. Die Häufung von Rearrangements des *RET*-Gens als Folge der Gamma-Strahlung inkorporierter Jod-Isotope deckt sich mit der Beobachtung, die in Zelllinien durch *in-vitro* Test durchgeführt wurden. In Experimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass in transgenen Mäusen (transgenes *RET/PTC1*: aktive Tyrosin-Kinase) Schilddrüsenkarzinome gebildet wurden, wenn das *RET/PTC1*-Gen unter Kontrolle eines Thyreoglobulin-Rezeptors stand (Portella, Salvatore et al. 1996; Tong, Xing et al. 1997). Als weitere Hybridgene sind das *RET/PTC2* bekannt, welches als Fusion von *RET* mit der regulatorischen Untereinheit RI-alpha von *PKA* entsteht, sowie das Hybridgen *RET/PTC3*, welches aus der Fusion von *RET* mit *elc1* entsteht (Bongarzone, Butti et al. 1994).

4. Amplifizierte Onkogene: *c-ERBB* und *c-ERBB2*

Das Gen *ERBB* wurde als Onkogen des akut transformierenden Retrovirus Erythroblastose-Virus entdeckt und kodiert für den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors EGF (epidermal growth factor). *c-ERBB*-Rezeptoren sind transmembrane Rezeptoren vom

Tyrosinkinase-Typ und vermitteln der Tumorzelle Wachstumssignale. Die Überexpression des Rezeptors gilt dabei als ein wichtiger molekularbiologischer Indikator für eine schlechte Tumorprognose. Das Gen ist in etwa 50% der fortgeschrittenen menschlichen Glioblastome (Stadium IV) und Mammakarzinome amplifiziert (Ekstrand, James et al. 1991). Zur gleichen Familie gehört auch das *ERBB-2*-Gen, welches in einem Viertel der Mammakarzinome und Ovarialkarzinome im Menschen amplifiziert ist (Hogdall, Christensen et al. 2003; Yang, Klos et al. 2003).

1.1.3 Genetische Instabilität und DNA-Reparatur

Es wird mittlerweile allgemein akzeptiert, dass Krebs durch das Akkumulieren von Mutationen in Genen ausgelöst wird, die direkt für die Kontrolle der Zellteilung, des Zellwachstums oder dem Zelltod verantwortlich sind. Es herrscht aber immer noch Unklarheit, wie diese Mutationen entstehen. Auf der einen Seite wird angenommen, dass eine genetische Instabilität absolut notwendig ist, um verschiedene Mutationen auszulösen (Loeb 1991; Hartwell 1992). Auf der anderen Seite wird vermutet, dass natürliche Mutationsraten, gekoppelt mit mehreren Zellzyklen ausreichend sind, um Krebs auszulösen (Tomlinson, Novelli et al. 1996). Im Folgenden werden wesentliche Aspekte der DNA-Reparatur aufgezeigt, die in Abbildung 2 schematisch zusammengefasst werden.

1. „Feine“ Sequenzänderungen: Diese Veränderungen beinhalten Basen-Austausch, Deletionen und Insertionen von wenigen Nukleotiden. Im Vergleich zu anderen genetischen Veränderungen, sind diese nicht durch zytogenetische Verfahren nachweisbar. Als Beispiel lässt sich hierbei das *K-ras*-Gen anführen, dessen „*missense*“-Mutation in über 80% der Pankreas-Tumoren nachweisbar ist.

Instabilitäten dieser Form sind im humanen Krebs eher untypisch, führen aber zu dramatischen Phänotypen. Ursachen dieser Instabilität lassen sich auf Fehler der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und der Postreplikativen-Reparatur oder *Mismatch*-Reparatur (MMR) zurückführen. Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur ist verantwortlich für die Reparatur defekter DNA, wie sie durch viele exogene Mutagene ausgelöst werden kann. Hierzu gehören neben der UV-Strahlung auch mutagene Chemikalien und ionisierende Strahlung. Durch biochemische und genetische Experimente bei der Krankheit *Xeroderma pigmentosum* konnten so verschiedene Gene der NER entdeckt werden. Es zeigte sich dabei, dass

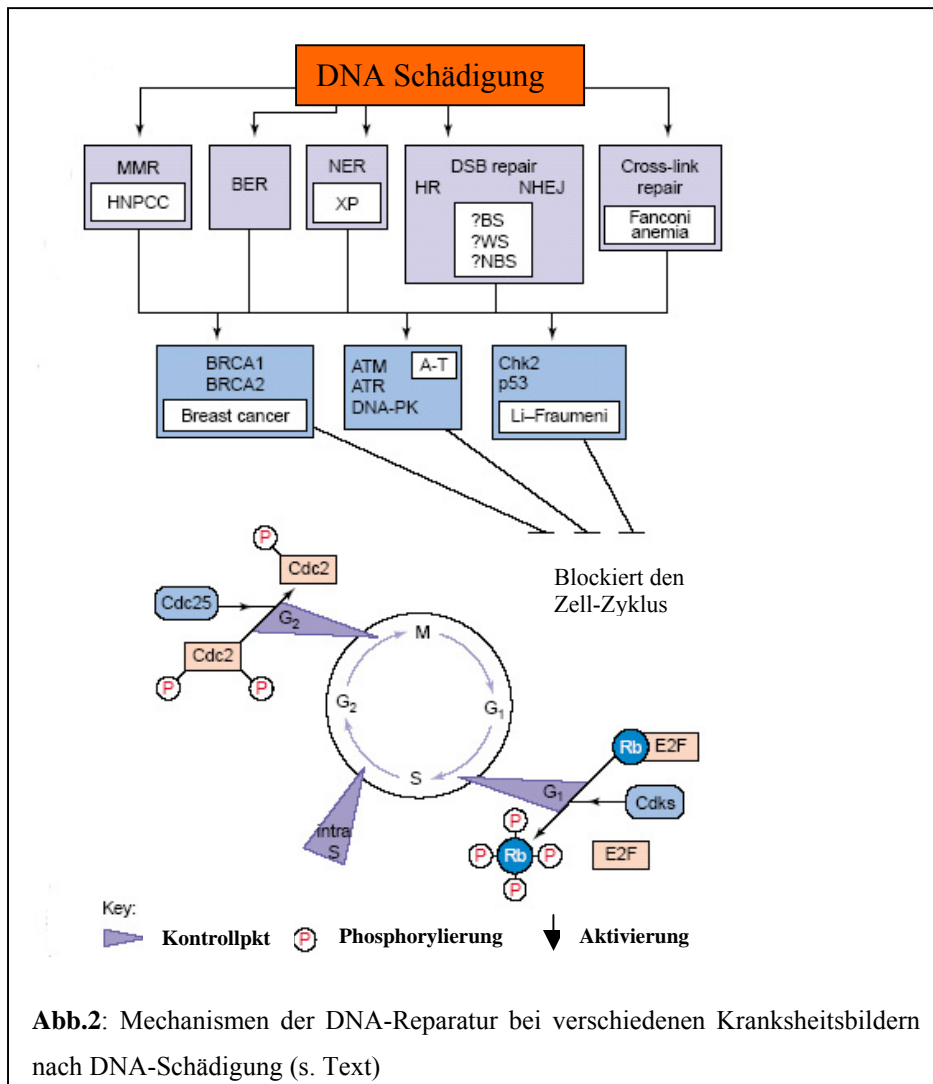
Fibroblasten von *Xeroderma pigmentosum*-Patienten eine hohe UV-Empfindlichkeit besitzen. Durch die Fusionierung von Zellen verschiedener Patienten konnte in Experimenten das Vorhandensein verschiedener NER-Gene aufgedeckt werden (Wood 1996).

Die Rolle der *Mismatch*-Reparatur in der Krebsentstehung konnte durch die Erkenntnisse des „Hereditären kolorektalen Karzinoms ohne Polyposis“ (HNPCC) gezeigt werden. Es zeigte sich, dass in sporadischen (nicht-familiären) Darm-Tumoren eine weit gestreute Veränderung von poly(A)-Gebieten (Mikrosatelliten) im Genom auftrat. Es konnte durch weitere Untersuchungen gezeigt werden, dass auch poly(CA)-Wiederholungen (*repeats*) dabei betroffen waren. Durch diese Erkenntnisse wurde der Begriff Mikrosatelliteninstabilität (MIN) etabliert. Bisher wurden sechs Gene (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH3*) identifiziert, deren Keimbahnmutationen für das Auftreten von HNPCC verantwortlich gemacht werden. Alle diese Gene kodieren für DNA-Reparatur-Enzyme, die bei der Zellteilung entstandene, falsche Basenpaarungen korrigieren (Modrich 1995; Kolodner 1996; Perucho 1996)

2. Veränderungen in der Chromosomenzahl: Solche Veränderungen lassen sich zytogenetisch durch den Verlust oder die Zunahme von Chromosomen(-armen) erkennen (Aneuploidie). Diese Veränderungen treten bei vielen bekannten Krebsarten auf, z.B. beim Verlust des 10q-(*PTEN*) in Glioblastomen, was die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *PTEN* bedeutet. Eine Zunahme ist detektierbar beim Nierenzellkarzinom, wobei eine Zunahme des Chromosoms 7 eine Duplikation des mutierten *MET*-Onkogens bedeutet.

Die Zunahme oder der Verlust ganzer Chromosomen tritt häufiger in malignen Tumoren auf. In zwei unterschiedlichen Experimenten konnten folgende Einsichten gewonnen werden: Im ersten Versuch wurde gezeigt, dass der Verlust oder die Zunahme von Chromosomen ungefähr 10-100mal häufiger in aneuploiden kolorektalen Krebszelllinien auftrat als in normalen Zellen oder diploiden Krebsarten desselben histologischen Subtyps. Ein anderer Versuch zeigte, dass ein LOH (Verlust der Heterozygotie) von Markern um ein selektives Gen 10mal häufiger in einer *Mismatch*-Reparatur-defizienten kolorektalen Krebszelllinie stattfand als in *Mismatch*-Reparatur-ausübenden Zelllinien (Phear, Bhattacharyya et al. 1996). Ein LOH wird hierbei häufig im Brust-, Colon-, Pankreas- oder Prostatakarzinom beobachtet. Es wird heutzutage angenommen, dass bestimmte „Prüfstellen-Gene“ (*Checkpoint*-Gene), die den Fortlauf des Zellzyklus kontrollieren, an der Progression der Instabilität teilhaben. Eine

dieser Prüfstellen ist der Spindel-*Checkpoint*. Hier wird sichergestellt, dass die Chromatiden nicht separieren, bevor die Chromosomen sich nicht korrekt entlang der mitotischen Spindel angelagert haben. Zu den humanen *Checkpoint*-Genen, die in Krebsarten verändert sind, gehört das *hMAD2* (niedrige Expression in einigen Brustkrebsen) und das *hBUB1* oder *hBUBR1* (somatische Mutation bei kleiner Gruppe von kolorektalen Karzinomen). Ein anderer Kontrollpunkt, der für die DNA-Schadenserkennung zuständig ist, stellt sicher, dass



Zellen mit einem DNA-Schaden nicht in die Mitose eintreten. DNA-Schäden entstehen durch Fehler der normalen Replikationsenzyme, durch ionisierende Strahlung, durch endogene Genotoxine oder durch unvollständige DNA-Reparatur. Chromosomen mit beschädigter DNA können fehlerhaft segregieren, da die Schwesterchromatiden noch immer über die DNA oder DNA-Protein-Verbindungen verknüpft sind. Solche Chromosomen sind anfällig für große chromosomale Veränderungen aufgrund von Einzelstranglücken oder Doppelstrangbrüchen. Gene, die in diese Prozesse involviert sind, werden in Zusammenhang mit der humanen

Tumorgenese gebracht. Dazu zählen sowohl das ATM-assoziierte Protein ATR, BRCA1 und BRCA2, die wiederum mit dem humanen RAD51 assoziieren, als auch p53 (Lane 1998).

3. Chromosomen-Translokationen: Sie werden in der Zytogenetik als Fusionschromosomen verschiedener Chromosomen oder als nichtkontinuierliche Segmente eines einzelnen Chromosoms detektiert. Auf molekularer Ebene können diese Fusionen meist ein Zusammenkommen zweier völlig verschiedener Gene bedeuten, wobei das neu gebildete Fusionsgen einen onkogenen Charakter besitzen kann. Ein bekannter Vertreter dieser Form ist das „Philadelphia-Chromosom“ mit dem Krankheitsbild der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML). Bei dieser Translokation wird der Carboxy-Terminus des *c-ABL* Gens von Chromosom 9 mit dem Amino-Terminus des *BCR*-Gens auf Chromosom 22 verbunden (Nowell 1997).

Der molekulare Vorgang, der zu Translokationen führt, ist bis heute nicht bekannt. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass Zellen in die Mitose eingehen, bevor rekombinationsfördernde Doppelstrangbrüche (DSB) repariert werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Gene wie *ATM*, *ATR*, *BRCA1/2*, *p53* und andere Faktoren, die in die Reparatur von DSBs involviert sind, mögliche Kandidaten für eine Translokationsinstabilität sind (Elledge 1996; Paulovich, Toczyski et al. 1997).

4. Genamplifikationen: Auf zytogenetischer Ebene werden Amplifikationen als *double minutes* (DM) oder *homogeneously stained regions* (HSR) erkennbar. Während die DM als zahlreiche kleine Chromatinpartikel in Erscheinung treten, sind die HSR als große homogen angefärbte Zusatzregionen in einzelnen Chromosomen nachweisbar. Auf molekularer Ebene können diese Amplifikationsbereiche (*amplicons*), die einen DNA-Bereich von 0.5-10 Megabasen enthalten können, eine Amplifikation von wachstumsfördernden Genen verursachen. Ein bekannter Vertreter dieser Amplifikation ist das *N-myc*-Gen, welches in ~20% aller Neuroblastome auftritt (Seeger, Brodeur et al. 1985).

Genamplifikationen von Onkogenen treten häufig in späten Stadien der Krebsentwicklung in Organen auf. Der Mechanismus, durch den diese Amplifikationen entstehen, ist weitestgehend unbekannt. Eine wichtige Rolle spielt aber womöglich p53, da Amplifikationen häufiger auftreten, wenn p53 inaktiviert ist. Weitere Experimente müssen unternommen

werden, um die Entstehung von Amplifikationen zu verstehen. (Livingstone, White et al. 1992)

1.2 Brustkrebs

Bei Frauen ist Brustkrebs mit einem Viertel aller Krebserkrankungen der am häufigsten diagnostizierte Krebs. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts von 2002 erkrankten in Deutschland jährlich über 46 000 Frauen an Brustkrebs, etwa 18 000 sterben daran. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate nach der Diagnose beträgt durchschnittlich 73 Prozent. Brustkrebs tritt hauptsächlich im höheren Lebensalter auf, d.h. mehr als die Hälfte aller diagnostizierten Fälle betrifft Frauen über 60 Jahre. Auch etwa 250 Männer sterben in Deutschland jedes Jahr an Brustkrebs. Bei der Analyse des Gefährdungsrisikos an Brustkrebs zu erkranken, konnte gezeigt werden, dass bei acht von neun an Brustkrebs leidenden Frauen weder Mütter noch Schwestern noch Töchter von dieser Krankheit betroffen sind. Das Brustkrebsrisiko steigt jedoch mit einer Zunahme der Krankheitsfälle in der nächsten Verwandtschaft. Bei zwei Brustkrebsfällen beträgt das eigene Erkrankungsrisiko über 13 Prozent, bei drei Betroffenen mehr als 20 Prozent (2001). Wie man inzwischen weiß, sind vor allem bei jungen Frauen die beiden Gene *BRCA1* und *BRCA2* für den vererbaren Brustkrebs verantwortlich. Ist bei einer Frau eines dieser Gene fehlerhaft, besteht ein erhöhtes Brustkrebsrisiko. Erste Studien in familiären Hochrisiko Brustkrebs-Clustern zeigten eine Penetranz von 87%, die jedoch durch Untersuchungen an Ashkenazi Juden mit familiären Brustkrebsvorfällen auf 56% korrigiert wurde. Eine anschließende Studie zeigte in Familien ohne Brustkrebserkrankungen ein Risiko von lediglich 36% (Ford, Easton et al. 1998). Epidemiologische Studien gehen heutzutage davon aus, dass ein Großteil der Brustkrebserkrankungen in familiären Clustern nicht mit *BRCA1* oder *BRCA2* assoziiert ist (Tonin 2000). Ein großer Teil der familiär assoziierten Fälle scheint dabei durch bisher nicht identifizierte Modifizierungsgene (*modifier genes*) ausgelöst zu werden.

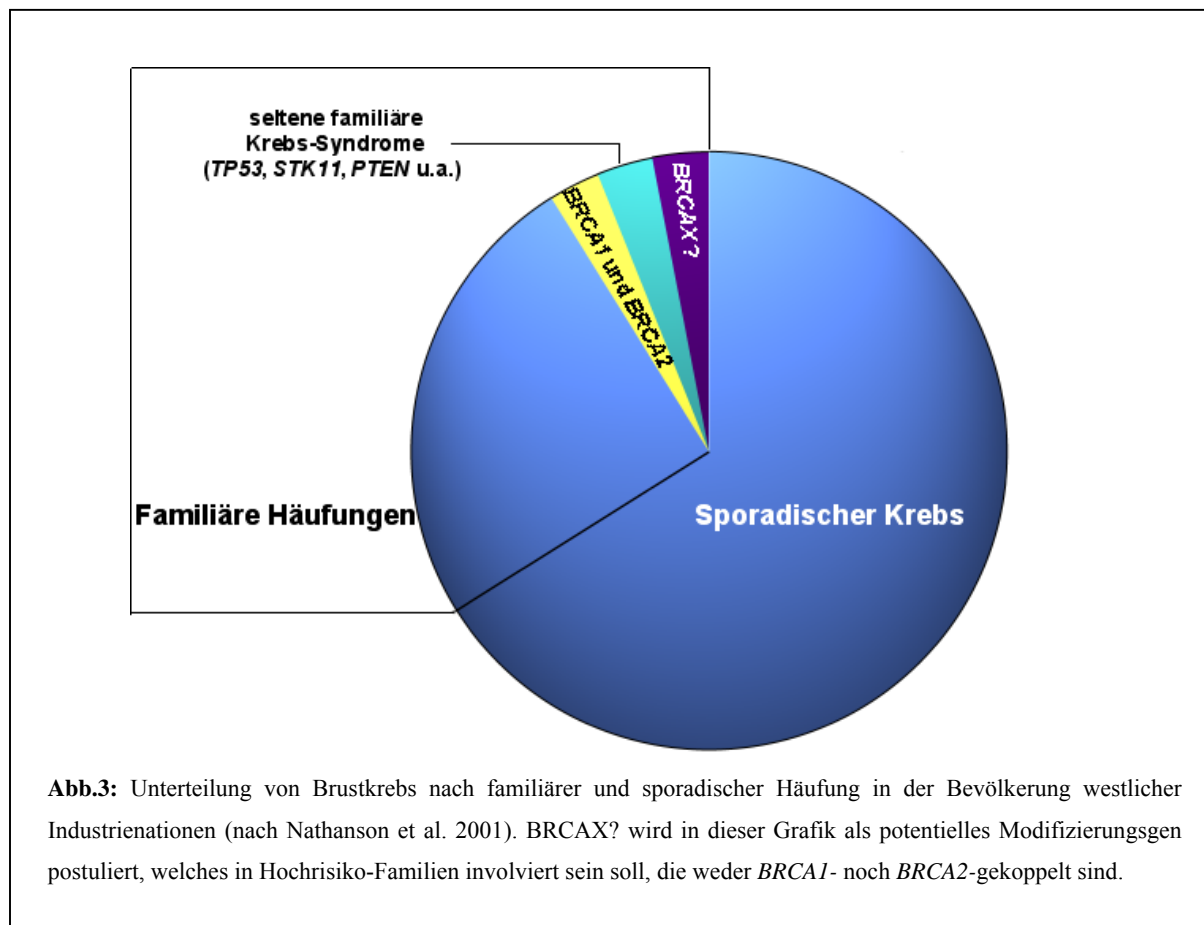
1.2.1 Genetische Prädispositionen für weiblichen/männlichen Brustkrebs

Etwa 10-15% aller Brustkrebserkrankungen können auf familiär prädisponierende Faktoren zurückgeführt werden. Die Inzidenz der durch *BRCA1* und *BRCA2* verursachten familiär auftretenden Brustkrebs-Erkrankungen beträgt 5-10%. Zu den seltenen hereditären Syndromen mit komplexeren klinischen Manifestationen gehören das Li-Fraumeni-Syndrom, Peutz-Jeghers-Syndrom, Cowden-Syndrom, Muir-Torre-Syndrom, Fanconi-Anaemi und

Ataxia telangiectasia (Abb.3), deren Inzidenz auf 5% geschätzt wird. Eine genetische Prädisposition bei männlichem Brustkrebs wird hierbei für *BRCA2* bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass in Familien, in denen Brustkrebs aufgetreten ist und zumindest ein Mann von Brustkrebs betroffen war, mit 60-70%iger Wahrscheinlichkeit eine *BRCA2*-Mutation vorliegt (Ford, Easton et al. 1998; Osorio, Barroso et al. 2000). Die Frequenz von *BRCA2*-Mutationen in Männern ohne familiären Hintergrund ist dabei wesentlich niedriger. Hier konnte von 54 Fällen nur bei 2 Individuen (4%) eine *BRCA2*-Mutation festgestellt werden (Friedman, Gayther et al. 1997). Als weitere molekulare Marker genetischer Prädisposition werden hierbei *c-ERBB2*, *p53*, *BCL2*, Cyclin D1 und EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor) angesehen. Das *c-ERBB2* Proto-Onkogen kodiert für einen transmembranen Rezeptor der Tyrosinkinase Familie, der in 20-30% der Brustkrebsfälle bei Frauen mit schlechter Prognose exprimiert wird (Dickerson 2000). Bei Männern wurde die Rate mit 35% angegeben (Gattuso et al. 1995). Diese Ergebnisse konnten jedoch durch anschließende Studien nicht bestätigt werden (Bloom, Govil et al. 2001). Im Anschluß konnte die Mayo Klinikstudie keine Assoziation zwischen *c-ERBB2*-Expression und Überlebensrate feststellen (Rayson, Erlichman et al. 1998). Studien am Tumorsuppressorgen *p53*, welches für die Kontrolle des Zellwachstums durch Zellzyklusblockade, Apoptose und Zelldifferenzierung verantwortlich ist, zeigten, dass in 30% der Frauen mit Brustkrebs eine Mutation im *p53*-Gen vorliegt (Dickerson 2000). Bei immunohistochemischen Untersuchungen konnte eine Akkumulation des Proteins festgestellt werden. Bei Männern konnte in einer Studie in 30% von 143 Fällen eine Mutation festgestellt werden (Anelli, Anelli et al. 1995; Wick, Sayadi et al. 1999). Obwohl eine prognostische Signifikanz noch nicht etabliert ist, zeigen Studien, dass eine *p53*-Mutation mit einer geringeren Überlebensrate assoziiert ist (Joshi, Lee et al. 1996; Pich, Margaria et al. 1996). Eine erhöhte Expression des Proto-Onkogens *BCL2*, welches Apoptose inhibiert und somit Zellwachstum fördert, wird ebenfalls in 79% der männlichen Brustkrebsfälle detektiert. Im Vergleich zeigen Männer jedoch eine weitaus höhere Expression als Frauen (Weber-Chappuis, Bieri-Burger et al. 1996). Trotzdem konnte bisher kein direkter prognostischer Zusammenhang entdeckt werden (Rayson, Erlichman et al. 1998).

Cyclin D1 ist in der Zellzyklusregulation involviert, indem es hilft, den Eintritt von Zellen in die S-Phase zu kontrollieren. In der onkogenen Form wurde die Überexpression des Gens in 51% der Fälle bei Männern und Frauen detektiert (Milde-Langosch, Bamberger et al. 2000). Rayson et al. konnten zeigen, dass eine Cyclin D1 Überexpression mit einer verkürzten

Überlebensrate assoziiert ist (Rayson, Erlichman et al. 1998). Cyclin D1 stellt somit einen guten prognostischen Marker in Karzinomen der Brust dar.



1.3 BRCA2

Das Gen kodiert für ein Protein von 384 kDa, das nur in kurzen Abschnitten Homologien zu bekannten Proteinen aufweist (Tavtigian, Simard et al. 1996). Durch Untersuchungen der humanen bzw. murinen BRCA2-Proteine konnten funktionelle Erkenntnisse über BRCA2 erbracht werden.

Die Nukleotidsequenz des murinen *Brca2* ist zur humanen cDNA 74% homolog. Auf Aminosäure-Ebene besteht 57% Identität bzw. 72% Ähnlichkeit (Sharan and Bradley 1997). Durch die Herstellung von verschiedenen Mausmutanten konnte gezeigt werden, dass homozygote *Brca2*^{-/-} Mäuse schon am Ende der Embryonalentwicklung oder kurz nach der Geburt sterben (Sharan, Morimatsu et al. 1997). Die überlebenden *Brca2*^{-/-} Mäuse zeigten

neben kleinerer Gestalt, auch Veränderungen der Testis, sowie maligne Lymphome des Thymus. Bei heterozygoten Mäusen konnten diese Veränderungen nicht gezeigt werden (Connor, Bertwistle et al. 1997; Friedman, Thistlethwaite et al. 1998). Zusätzlich zeigen *Brca2*^{-/-} Mäuse eine höhere Sensitivität bei ionisierender Strahlung (Sharan, Morimatsu et al. 1997). Diese Sensitivität äußert sich durch eine hohe genomische Instabilität, die sich in Translokationen und Deletionen zeigt (Chen, Silver et al. 1998; Yu, Koehler et al. 2000). Diese erhöhte genomische Instabilität lässt auf den Verlust spezieller DNA-Reparaturmechanismen schließen, die durch den Verlust von BRCA2 nicht mehr durchgeführt werden können. Dies wurde an *Brca2*^{-/-} Mäusen bestätigt, die nach Bestrahlung eine höhere Doppelstrangbruchrate zeigten als heterozygote Mäuse (Abbott, Freeman et al. 1998).

Die Assoziation von BRCA2 mit RAD51 (ein Homolog des bakteriellen RecA-Proteins; Clark 1996) impliziert einen Zusammenhang in der DNA-Reparatur mittels homologer Rekombination (HR). RAD51 fördert einen DNA-Strangaustausch zwischen homologen DNA-Strängen, wobei RAD51 an die DNA bindet, um ein Nucleo-Protein-Filament zu bilden (Baumann, Benson et al. 1996). Die *BRC-repeats* stellen dabei die Interaktionsdomäne dar, da sie RAD51 als Monomer binden (Davies, Masson et al. 2001). Experimente zeigten, dass *Rad51*^{-/-} Embryonen eine ähnliche Strahlungssensitivität wie *Brca2*^{-/-} Mäuse aufweisen (Lim and Hasty 1996; Sharan, Morimatsu et al. 1997). Dieses Ergebnis wurde als funktionelle Gemeinsamkeit der beiden Proteine gewertet. Das RAD51 Homolog in *Saccharomyces cerevisiae* ScRAD51 ist ebenfalls bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt (Sung 1994).

Eine Coimmunopräzipitation von BRCA2 und BRCA1 wies auf eine weitere Funktion von BRCA2 hin (Chen, Silver et al. 1998). Es ist bekannt, dass eine BRCA1-Hyperphosphorylierung durch eine DNA-Schädigung induziert werden kann (Scully et al., 1997). Die hyperphosphorylierte Form des BRCA1 liegt in später G₁- und S-Phase vor. In der S-Phase ist BRCA1 mit BRCA2, RAD51 und BARD1 in Foci innerhalb des Nukleus colokalisiert (Chen, Chen et al. 1998). Es wird angenommen, dass dieser Multiprotein-Komplex Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen während der Synthesephase vermittelt. Welche Funktion BRCA2 in diesem Zusammenhang einnimmt, ist bisher noch unklar (Abb. 4).

Funktionelle Analysen geben Grund zur Annahme, dass BRCA2 eine duale Rolle besitzen könnte. Neben der *Caretaker*-Funktion für die genomische Stabilität scheint auch eine *Gatekeeper*-Funktion in der Transkriptionsregulation wahrscheinlich.

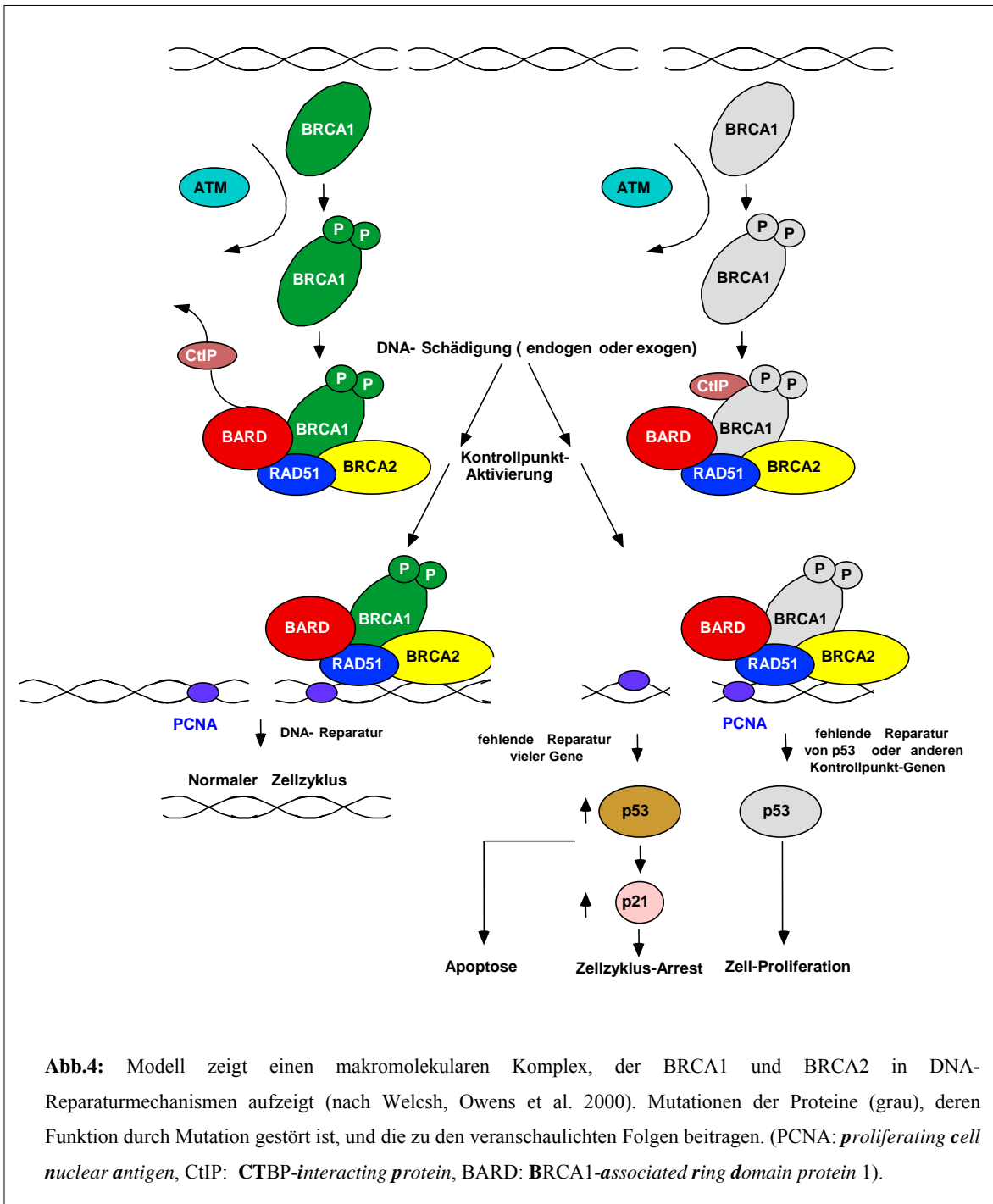
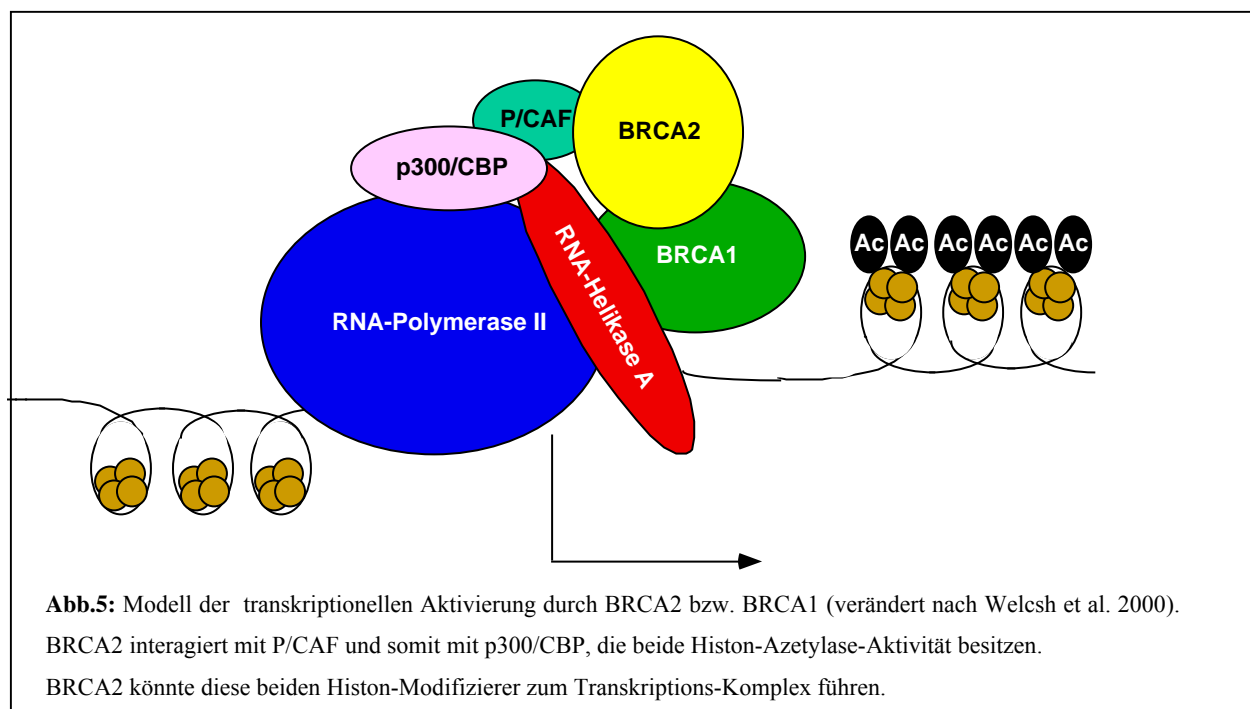


Abb.4: Modell zeigt einen makromolekularen Komplex, der BRCA1 und BRCA2 in DNA-Reparaturmechanismen aufzeigt (nach Welsh, Owens et al. 2000). Mutationen der Proteine (grau), deren Funktion durch Mutation gestört ist, und die zu den veranschaulichten Folgen beitragen. (PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*, CtlP: *CTBP-interacting protein*, BARD: *BRCA1-associated ring domain protein 1*).

Milner und Kollegen zeigten erste Zusammenhänge von BRCA2 in der Transkriptionskontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass Exon 3 (Position 60-105) des *BRCA2*-Gens, welches eine Sequenzhomologie mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun besitzt, die Transkription stimulieren kann, wenn sie an GAL4-DNA fusioniert wird (Milner, Ponder et al. 1997). Die Homologie besteht zu der c-Jun-Aktivierungsdomäne, die die Bindestelle für

die c-Jun Kinase (JNK) beinhaltet (Hibi, Lin et al. 1993). Weiterführende Untersuchungen konnten jedoch nicht zeigen, dass BRCA2 an JNK1 bindet. (Milner, Fuks et al. 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass BRCA2 spezifisch mit der Histon-Azetyltransferase P/CAF interagiert (Fuks, Milner et al. 1998). Die Transkriptionsregulation, in die BRCA2 involviert ist (Abb. 5), scheint durch die Assoziation mit der P/CAF Histon-Azetyltransferase ermöglicht zu werden. Es wird ferner davon ausgegangen, dass Histon-Azetylierungen durch Veränderung der Chromatin-Struktur die Transkription regulieren können (Fuks, Milner et al. 1998). Neue Hinweise zeigen auch, dass BRCA2 mit Stat5A interagiert und dessen Transkriptionsaktivität supprimiert (Vidarsson, Mikaelssdottir et al. 2002). Stats (*signal transducers and activators of transcription*) gehören zur Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine transkriptionelle Antwort durch eine Gruppe von Cytokinen und Wachstumsfaktoren geben. Stat5A, auch als Brustdrüsen-Faktor bekannt, wird durch viele Cytokine und Wachstumsfaktoren, unter anderem auch Prolaktin (PRL), aktiviert und vermittelt die Transkription von Milchproteinen (β -Casein). Durch die Studien konnte gezeigt werden, dass BRCA2 spezifisch die transkriptionelle Aktivität von Stat5A auf den β -Casein-Promotor hemmt.



1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die genetischen Ursachen, die im Menschen Brustkrebs verursachen, sind noch immer weitestgehend unverstanden. Es konnte jedoch in familiär auftretenden Brustkrebsfällen gezeigt werden, dass eine Mutation des Tumorsuppressorgens *BRCA2* eine genetische Prädisposition darstellt. Trotz dieser Prädisposition lassen sich Unterschiede in der Inzidenz des Mammakarzinoms feststellen, die sich durch weitere genetische Faktoren innerhalb der Tumorgenese erklären lassen könnten.

In mehreren Familien mit hereditärem Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass in *BRCA2*-Mutationsträgern Duplikationen und Amplifikationen im Bereich 9p23-24 detektierbar sind. Das Ziel der Arbeit bestand darin, durch molekularbiologische Methoden die Bruchpunkte auf 9p23-24 in *BRCA2* Mutationsträgern verschiedener unabhängiger Familien zu identifizieren und damit einen weiteren Hinweis auf die Entstehung dieser Instabilität zu geben. Die Auswahl geeigneter Proben für die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) und die Analyse mittels geeigneter BAC (bakterielles artifizielles Chromosom)-Klone waren ein wichtiger Bestandteil der Arbeit. Da zum Beginn der Arbeit keine komplette Sequenz des humanen Genoms zur Verfügung stand, wurde mittels bioinformatischer Methoden eine zusammenhängende BAC-Contig erstellt. Durch die Anordnung der BAC-Klone sollten nun die Bruchpunkte durch geeignete Proben in der FISH detektiert werden. Durch eine anschließende Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) und Southern-Analysen unter Zuhilfenahme PCR-amplifizierter chromosomaler Sonden sollten die Bruchpunkte identifiziert und charakterisiert werden.

Nach der Detektion der Bruchpunkte sollte weiterhin untersucht werden, ob Gene in diesem Bereich lokalisiert sind und ob ein bestimmter sequenzieller Zusammenhang zwischen Bruchpunkt und benachbarter DNA für die Rearrangements verantwortlich gemacht werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

α -D-Glukose	Serva, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
1,4-Diazobicyclo(2.2.2)octan (DABCO)	Sigma, München
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, München
8-Hydroxylchinolin	Sigma, München
Agarose, ME	Seakem Marin Colloids, Rockland, Maine, USA
Aminobenzyloxymethyl-Cellulose (ABM-Cellulose)	Sigma, München
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydroxid	Sigma, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Bacto Casaminsäuren	DIFCO-Labs, Dreieich
„Bacto yeast nitrogen base“ (ohne Aminosäuren)	DIFCO-Labs, Dreieich
Bacto-Agar	DIFCO-Labs, Dreieich
Bacto-Trypton	DIFCO-Biotest, Dreieich
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Colcemid	Serva, Heidelberg
Dextransulfat	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, München
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fluorescein Avidin DN	Vector Laboratories Burlingame, Kalif., USA
Formaldehyd	Sigma, München
Formamid	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	DIFCO Biotest, Dreieich
ICRF-154; 4,4'-(1,2-ethanediyl)bis(2,6-piperazinedion)	LabKemi, Stockholm, Schweden
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lauroylsarcosin (siehe N-Lauroylsarcosin)	
Low gelling temperature Agarose	Seakem Marin Colloids, Rockland, Maine, USA
Magnesiumchlorid	Serva, Heidelberg
Mineralöl	Sigma, München
N-2-hydroxymethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosin (Natriumsalz)	Sigma, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Sigma, München
Phenol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, München
Rinderserumalbumin	Roche Diagnostics, Mannheim
Salzsäure	J.T. Baker, Deventer, NL
Schwefelsäure	J.T. Baker, Deventer, NL
Sorbitol	Sigma, München
Saccharose	BioRad Lab., München
Tris (hydroxymethyl)-methylamin	Life Technologies, Eggenstein
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck-Schuchardt, München
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

2.1.2 Radioisotope

[³² -P]dCTP ~3000Ci/mM, 10mCi/ml	Amersham Buchler, Braunschweig
----------------------------------------------	--------------------------------

2.1.3 Enzyme und Immunreagenzien

Anti-Avidin D (biotinyliert) (Ziege)	Vector Lab., Burlingame, Kalif., USA
Avidin-FITC	Vector Lab., Burlingame, California, USA
Anti-Digoxigenin-IgG1κ (Maus)	Roche Diagnostics, Mannheim
Cy3-konjugiertes Anti-Maus IgG (Schaf)	Dianova, Hamburg
DNA-Polymerase I	MBI-Fermentas, St.Leon-Rot
DNA-Polymerase-Klenow-Fragment	NEB, Schwalbach
DNase I / RNase frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Lyticase	Sigma, München

Pepsin	Sigma, München
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI-Fermentas, St.Leon-Rot / Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
BlueGENE Nichtradioaktives Nukleinsäure-Nachweissystem	Life Technologies, Eggenstein
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
NICK Spin-Columns, Sephadex G50	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Template Suppression Reagent (TSR)	Applied Biosystems, Weiterstadt

2.1.5 Antibiotika

Amphotericin B	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Serva, Heidelberg
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg

2.1.6 Nukleinsäuren

1kb DNA-Größenstandard	Life Technologies, München
Biotin-16-dUTP	Roche Diagnostics, Mannheim
C ₆ t1-DNA	Life Technologies, München
Digoxigenin-11-dUTP (alkalisch stabil)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA-Größenstandard Lambda-PFGE-Standard	FMC, Vertrieb Biozym
dNTP	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Hefe-Chromosomen-Standard (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH149)	FMC, Vertrieb Biozym
Heringsperma-DNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Hexanukleotide (pd(N) ₆)	Amersham-Pharmacia, Freiburg

2.1.7. Oligonukleotide / Klone

Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma, Darmstadt synthetisiert und teilweise HPLC gereinigt.

YACs („yeast artificial chromosomes“):

YACs wurden vom Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) Paris und dem Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (GmbH), Berlin bezogen. Die verwendete CEPH-Mega-YAC-Bibliothek repräsentiert sieben haploide humane Genomäquivalente (Albertsen et al., 1990). Die Bibliothek umfaßt ca. 10000 zugeordnete STS (Sequence Tagged Sites) und 50000 YAC-Klone. Der verwendete Hefestamm ist AB1380 mit dem Genotyp MATa+, ura3, trp1, ade2-1, can1-100, lys2-1, his5 (Burke et al., 1987). Das humane DNA-Material ist in den YAC-Vektor pYAC4 (Burke et al. 1987) inseriert.

BACs („bacterial artificial chromosomes“):

Die BAC-Klone mit humanen Insertionen stammen aus der am Roswell Park Cancer Institute hergestellten humanen RPCI-11 BAC-Bibliothek (Oseogawa et al., 1998). Diese Bibliothek wurde aus Blut eines männlichen Probanden hergestellt. Die human-genomischen Fragmente wurden in den Vektor pBACe3.6 ligiert und in *Escherichia coli*-Stamm DH10B transformiert. Alle erwähnten BAC-Klone wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (GmbH), Berlin bezogen.

ESTs („Expressed Sequence Tags“):

Die EST wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (GmbH), Berlin bezogen.

2.1.8 Photomaterialien

Entwickler Dektol, Kodak	Profi-Shop, Stuttgart
Fixierer AL-4, Kodak	Profi-Shop, Stuttgart
Photokleber Fixogum Rubber Cement, Marabu, Tamm	Profi-Shop, Stuttgart
Thermoprinter (Yamaha)	BioRad, München
Photopapier Ilford Ilfospeed RC, IS3.1M	Profi-Shop, Stuttgart
Röntgenfilme:	
Kodak Biomax MS	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Fuji New RX	Profi-Shop, Stuttgart

2.1.9 Zellkulturmedien

Fötales Kälberserum (FCS)

Life Technologies, München

RPMI 1640 (inklusive 4mM Glutamin)

Life Technologies, München

Medium für EBV-transformierte Lymphozyten: RPMI 1640, 10% FCS (56°C/1h inaktiviert), 100U/ml Penicillin G, 0,1mg/ml Streptomycin, 5µg/ml Amphotericin B.

2.1.10 Zelllinien

Name	Zelltyp	BRCA2-Status	Diagnose	Bezugsquelle
Familie 1:				
3.3	EBV-transf. Lymphozyten	<i>mutBRCA2</i> (2041insA)	männliches Mamma-karzinom	Dr. Finke, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin
3.4	EBV-transf. Lymphozyten	<i>mutBRCA2</i> (2041insA)	männliches Mamma-karzinom	Dr. Finke, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin
3.5	EBV-transf. Lymphozyten	<i>mutBRCA2</i> (2041insA)	männliches Mamma-karzinom	Dr. Finke, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin
4.1	EBV-transf. Lymphozyten	<i>wtBRCA2</i>	-	Dr. Finke, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin
4.2	EBV-transf. Lymphozyten	<i>wtBRCA2</i>	-	Dr. Finke, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin
Familie 2:				
3.2	EBV-transf. Lymphozyten	<i>mutBRCA2</i> (7989delC)	männliches Mamma-karzinom	Dr. Barbara L. Weber, University of Pennsylvania, Medical Center, Philadelphia
Familie 3:				
3.1	Vollblut, EBV-transformiert	<i>mutBRCA2</i> (8923C>T)	männliches Mamma-karzinom	Prof. Siegfried Scherneck, Max-Delbrück-Centrum, Berlin
4.4	Vollblut EBV-transformiert	<i>mutBRCA2</i> (8923C>T)	-	Prof. Siegfried Scherneck, Max-Delbrück-Centrum, Berlin
4.3	Vollblut, EBV-transformiert	<i>wtBRCA2</i>	-	Prof. Siegfried Scherneck, Max-Delbrück-Centrum, Berlin

2.1.11 Computerserver (Datenbanken) und Bildverarbeitungsprogramme

2.1.11.1 Bildanalyse-Software

Adobe Photoshop 7.0

Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA

IPLab-Spectrum 3.0

Signal Analytics, Vienna, VA, USA

CW4000 FISH - Cytogenetik

Leica Systems, Bensheim, Germany

2.1.11.2 Öffentliche Datenbanken und Programmpakete

Integrierte Chromosomen-Karten:

e! (Kooperation des EMBL-EBI und des Sanger-Instituts)

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

Chromosom 9-Workshop <http://www.gene.ucl.ac.uk/chr9/index.shtml>

The Genome Database <http://www.gdb.org>

Klon-Bestellung:

Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (GmbH) <http://www.rzpd.de>

Sequenz- und Fragmentanalyse:

GENESCAN 2.1 Applied Biosystems, Weiterstadt

Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources (HUSAR) Genetics Computer Group, Heidelberg
<http://genome.dkfz-heidelberg.de/>

Sequencing Analysis 3.0 Applied Biosystems, Weiterstadt

YAC-Informationen:

Whitehead Center for Genome Research <http://www-genome.wi.mit.edu>

STS-Daten:

National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

The Genome Database <http://www.gdb.org/>

Whitehead Center for Genome Research <http://www-genome.wi.mit.edu>

2.1.12 Laborgeräte

Automatische Sequenziersysteme:

ABI 310 Applied Biosystems, Weiterstadt

CCD-Kamera CH250 Photometrics, München

Eppendorf-Tischzentrifuge Eppendorf-Metheler-Hinz, Hamburg

Feinwaage PM 4600 Mettler, Gießen

IKA-Schlauchpumpe PA-B1 Janke & Kunkel, Staufen

Neubauer Zählkammer Migge, Heidelberg

Magnetrührer Heidolph-Elektro, Kehlheim

Mikroskop Leica CW4000 Leica, Bensheim

Mikroskop Axiophot Zeiss, Oberkochen

Mikroskop IM 35 Zeiss, Oberkochen

Mini-Gelelektrophoreseapparatur GIBCO/BRL, Eggenstein Renner, Darmstadt

Netzgerät Pherostab 500 Biotec Fischer, Reiskirchen

PCR-Heizblock Biometra Trio Thermoblock Biometra, Göttingen

PCR-Heizblock GeneAmp 9600 Perkin-Elmer, Weiterstadt

PCR-Heizblock GeneAmp 9700 Perkin-Elmer, Weiterstadt

PCR-Heizblock GeneAmp 2400 Perkin-Elmer, Weiterstadt

pH-Meter pMX 2000 WTW, Weilheim

Pulsfeldgelelektrophorese-Apparaturen,
CHEF-DR III System BioRad, München

Röntgenfilmentwickler Gevomatic 60 AGFA-Gevaert, München

Schüttelinkubatoren G25, G24 New Brunswick Scientific, Offenbach

Schüttler IKA KS250	Janke & Kunkel, Staufen
Imagingsystem (GelDok)	BioRad, München
Sofortbildkamera	Polaroid; Offenbach
Spektralphotometer Du 7	Beckman Instr., München
Ultraschallgerät Sonifier 250	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
UV-Tischplatten:	
254nm	Konrad Benda, Wiesloch
302nm	Vetter, Ostende, Belgien
Vakuum-Konzentrator	Bachofer, Reutlingen
Vibromixer IKA-Vibrax XR	Janke & Kunkel, Staufen
Vortex-Schüttler	Heidolph-Elektro, Kehlheim
Wasserbäder	GFL, Hans Bayer, Mannheim; Julabo, Labortechnik, Seelbach;

Zentrifugen:

Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Biofuge pico	Heraeus, Osterode
GP-Centrifuge	Beckman Instr., München
J-6 M/E Centrifuge	Beckman Instr., München
J 2-21 M/E Centrifuge	Beckman Instr., München
Varifuge 3.2RS	Heraeus, Osterode

Rotoren:

Rotor 5310	Heraeus, Osterode
JS 13.1	Beckman Instr. München
JA 10	Beckman Instr. München
JA 20	Beckman Instr. München

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation genomischer DNA / (m)RNA aus humanen Zellen

Lyselösung:	0,2% SDS, 40mM Tris, 40mM EDTA
Proteinase K	20mg/ml
Phenol	TE-äquilibriert
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	25:24:1, TE-äquilibriert
Trizol©	Life Technologies, GIBCO BRL
Isopropanol	
75% Ethanol :	mit DEPC behandeltem H ₂ O
RNase freies Wasser:	mit DEPC behandelt
DEPC-H ₂ O:	alkalisiert, pH 7.5

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden 5×10^7 humane Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden bei 500xg für 5min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und in 50ml PBS einmal gewaschen. Daraufhin wurden 10ml Lyselösung hinzupipettiert und der Ansatz vorsichtig geschwenkt. Um die vorhandenen Proteine zu verdauen, wurden 200µg/ml Proteinase K zugesetzt und das Gemisch bei 56°C für zwei Stunden inkubiert. Zur Abtrennung des Proteinanteils wurde einmal mit TE-äquilibriertem Phenol, zweimal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, TE-äquilibriert) und einmal mit Chloroform extrahiert. Zur Trennung der phenolischen von der wässrigen Phase wurde jeweils eine Zentrifugation bei 4000xg für 15 min durchgeführt und die obere wässrige Phase mit der DNA in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die übrigbleibende, untere Protein-Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase wurde zuletzt mit eiskaltem Ethanol (100 %) auf 40ml aufgefüllt. Die hochmolekulare DNA wurde dann im 50ml Falcon©-Röhrchen durch kreisende Bewegungen aufgespindelt. Mit einer sterilen Plastikimpföse wurde die DNA dann vorsichtig aufgenommen, in 70% EtOH gewaschen, einige Minuten getrocknet und in einem geeigneten Volumen alkalisierten H₂O_{bidest.} (ca. 1-2 ml) gelöst. Eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei 260nm mit Überprüfung des Proteinanteils schloss sich an.

Die RNA wurde mittels Trizol© (Life Technologies, GIBCO BRL) isoliert. Hierbei wurden frisch kultivierte Zellen (2×10^7 Zellen) bei 500xg zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden mit sterilem 1x PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in Trizol resuspendiert. Das Trizol-Volumen soll dabei für $5-10 \times 10^6$ Zellen ungefähr 1ml betragen. Bei den Lymphozyten zeigte sich ein Volumen von 5-6ml Trizol für ausreichend. Die homogenisierte Lösung wurde nun für 5 min bei RT inkubiert, um eine Dissoziation von Nukleoprotein-Komplexen zu erreichen.

Anschließend wurde 0.2 ml Chloroform pro ml Trizol zu der Lösung gegeben und kräftig gemischt. Es schloss sich eine weitere Inkubation bei RT für 2-3 min an. Die Proben wurden nun bei 11000xg für 15min bei 4°C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation teilt sich die Lösung in eine untere Phenol-Chloroform-Phase (rötlich), eine Interphase und eine wässrige obere Phase. Die RNA befindet sich ausschließlich in der oberen wässrigen Phase und macht ungefähr 60% des Gesamtvolumens aus. Als nächstes wurde nun die obere Phase vorsichtig in ein neues steriles Gefäß transferiert und durch Zugabe von 0.5 Volumen Isopropanol pro 1 ml Trizol präzipitiert. Die Proben wurden nun bei RT für 15min inkubiert und 15min bei 11000xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 1ml 75% Ethanol pro 1ml Trizol gewaschen. Diese Lösung wurde nun kräftig gemischt und bei 7000xg erneut zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen und die gefällte RNA luftgetrocknet. Zum Abschluß konnte die RNA in alkalisiertem H₂O (pH 7.5) aufgenommen werden und die Konzentration photometrisch bestimmt werden.

Durch Herstellung von Erst-Strang-DNA sollten interessante Gene amplifiziert werden, um zu zeigen, dass eine Expression auch in lymphoblastoiden Zellen erfolgt. Hierzu wurde von isolierter RNA zuerst mRNA (Reaktionskit Oligotex, Qiagen) isoliert und anschließend eine Erst-Strang-Synthese (Reaktionskit, AMV; Roche) durchgeführt. Die Vorgehensweise hielt sich dabei an die vorgegeben Schritte, wie sie in den Protokollen aufgezeigt wurden.

2.2.2 Behandlung von YAC-transformierten Hefen

AHC: 1,7g YNB w/o aminoacids

10g casamino acids

5g ammoniumsulfat

50mg adeninhemisulfat

ad 950ml H₂O, pH 5.8; autoklavieren; + 50ml 40% (w/v) Glukose steril filtriert

Zwei bis drei Milliliter AHC-Flüssigmedium wurden inokuliert. Die Vereinzelnung der Hefen erfolgte auf AHC-Agarplatten. Die Hefen sind innerhalb von zwei Tagen Inkubation bei 30°C auf sichtbare Größe herangewachsen. Durch eine PCR mit Primer-Sequenzen aus dem rearrangierten chromosomalen Bereich (*D9S775*, *D9S168* und *D9S267*) konnten YACs zugeordnet werden. Positiv getestete Hefe-Klone wurden in Glyzerin (50% Endkonzentration) weggefroren und bei Bedarf erneut hochgezogen.

2.2.3 Präparation von BAC-DNA

2xLB: 10g Yeast Extract, 20g Tryptone, 10g NaCl (ad 1000ml)

Qiagen Plasmid Midi Kit

100mM IPTG (sterilfiltriert)

Zur Durchführung von FISH-Experimenten (2.2.12) wurden aufgereinigte BAC-DNAs benötigt. Die Durchführung der Präparation erfolgte mit einer leicht abgewandelten Form des Qiagen Plasmid Midi-Kit.

Vor der DNA-Isolation wurden zunächst 5ml einer Bakterienkultur in LB-Medium mit Chloramphenicol (30µg/ml) angeimpft. 50µl dieser über Nacht bei 37°C inkubierten Kultur wurden dann zur Inokulation von 300ml 2xLB-Medium mit Chloramphenicol verwendet. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator wurden die Bakterien durch eine 10minütige Zentrifugation bei 6000xg sedimentiert. Nach dem Abgießen des Überstands wurde das Pellet in 20ml P1-Puffer resuspendiert. Dann wurden 20ml P2 zugegeben, und die Bakteriensuspension wurde kurz vorsichtig geschwenkt. Die Lyse wurde 5-10min bei Raumtemperatur vollzogen. Daraufhin wurden 20ml eiskalten P3-Puffers hinzugegeben, kurz geschwenkt und das Lysat für 20min auf Eis gestellt.

Das Lysat wurde dann durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 8000xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der wässrige Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und über 2 Faltenfilter direkt auf Qiagen Maxi Säulen gegeben. Hierbei wurden letzte Lysatreste von der plasmidhaltigen Lösung getrennt, um Verstopfungen der Säule zu verhindern. Weitere Schritte folgten dem Qiagen-Protokoll bis zur Elution mit QF-Puffer. Nach der Elution wurde die Lösung dann mit 0,7 Volumen-Anteilen Isopropanol versetzt und bei 18500xg bei 4°C für 30min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, mit 70% EtOH gewaschen und erneut für 10min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die angetrocknete DNA in 200-400µl Tris-HCL (pH 8,5) gelöst und zur späteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4 Herstellung von Bakterien-DNA und Hefe-Lysaten für die PCR

Hefe-Lyse-Lösung:	1% Triton, 20mM Tris (pH8,5)
RNaseA	10mg/ml
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	25:24:1
Glasperlen	Ø420-600 µm, säure-gewaschen

Zur Herstellung von Template-DNAs, die für PCR-Anwendungen geeignet sind, wurden BAC-Klone zunächst in 5ml LB (inklusive Antibiotikum) angeimpft. Diese Kultur wurde bei

37°C für etwa 12h inkubiert. 2ml dieser Bakteriensuspension wurden daraufhin für 10min bei 6000xg zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde für eine anschließende DNA-Isolierung mittels Qiagen Protokoll durchgeführt. Für die Probengenerierung mittels PCR wurde ein 1µl dieser Isolation eingesetzt.

YAC-transformierte Hefen wurden in 5ml AHC-Medium (ohne Antibiotikum) inokuliert. Eine dreitägige Inkubationszeit bei 30°C schloss sich an. 1,5-3ml dieser Hefe-Kulturen wurden dann in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 14000xg für 5 Sekunden pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgossen und das Sediment in der verbliebenen Restmenge Flüssigkeit durch Mischen auf dem Rüttelmixer resuspendiert. Nach der Zugabe von je 200µl Hefe-Lyse-Lösung und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurde eine Spatelspitze (ca. 0,3g) Glasperlen beigemischt. Zur vollständigen Lyse der Hefen schloss sich ein 10-20minütiges Mischen auf dem Rüttelmixer an. Die Phasentrennung erfolgte durch 5minütige Zentrifugation bei 14000xg. Die abgenommene, wässrige Phase wurde mit Ethanol präzipitiert und das Pellet in 200µl H₂O inklusive 100µg/ml RNaseA aufgenommen. Der RNaseA-Verdau erfolgte bei 37°C für 30min. 1,5µl dieser DNA-Präparation wurden für anschließende PCR-Tests eingesetzt. Die präparierten Bakterien- und Hefe-DNAs können über Jahre bei -20°C gelagert werden.

2.2.5 Restriktionsverdau genomischer DNA

Human-genomische DNA wurde mittels Restriktionsenzymen in Fragmente zerlegt, die Größen von etwa 0,1kb bis 30kb repräsentieren. Dazu wurden für genomische Southern Blots 10-12µg DNA mit 35U Enzym (z.B. *EcoRI*, *HindIII*, *SacI*, etc.) in geeignetem Restriktionspuffer verdaut. Die Restriktion erfolgt bei 37°C im Wasserbad über Nacht. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt in einem 1% Agarosegel.

2.2.6 Nick Translation (nach Langer et al., 1981)

0,5M EDTA			
10% SDS			
Enzyme:		Reaktions-Gemisch:	
DNase I	10U/ μ l	10 μ l	10x Nick-Translations-Puffer (0,5M Tris-HCl (pH8); 50mM MgCl ₂ ; 0,5mg/ml BSA)
Polymerase I	10U/ μ l		
10x Biotin-NTP-Gemisch:		10 μ l	0,1M β -Mercaptoethanol
Biotin-16-dUTP	0,5mM	10 μ l	Biotin- bzw. Digoxigenin-Nukleotid-Gemisch
dATP, dCTP, dGTP	je 1mM	x μ l	BAC-DNA (3 μ g)
10x Digoxigenin-NTP-Gemisch:		ad 95 μ l	H ₂ O _{bidest.}
Digoxigenin-11-dUTP	0,25mM	3 μ l	DNase I (Verdünnung 1:1000 bis 1:2000)
dTTP	0,375mM	2 μ l	DNA-Polymerase I (10U/ μ l)
dATP, dCTP, dGTP	je 0,5mM		

Zur Herstellung von DNA-Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ist es notwendig, diese mit Biotin bzw. Digoxigenin zu markieren. Dies geschieht durch "nick translation".

Dabei wurden 3-4 μ g BAC-DNA (2.2.3) eingesetzt. Nach Zugabe der Komponenten des Reaktions-Gemisches wurde die Reaktion bei 15°C für 30min (BAC-DNA-Markierung) inkubiert. Vor Verwendung einer neuen DNase I-Stammlösung, muss diese in einer Testreihe auf eine geeignete Verdünnungsstufe (etwa 1:1000-1:2000) in der „nick translation“ geprüft werden. Die Fragmentgrößen wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung eines 7 μ l-Aliquots überprüft. Dabei zeigt sich ein DNA-Schmier, dessen stärkste Konzentration im Größenbereich von 250-500bp zu finden sein sollte. Sind die Fragmente zu groß, muss für eine geeignete Zeit nachinkubiert werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15mM EDTA und 0,1% SDS mit anschließendem 15 minütigem Erhitzen auf 68°C abgestoppt.

2.2.7 Spreiten von Metaphase-Chromosomen

55mM KCl	
1% Natriumcitrat	
Methanol/Eisessig	3:1, -20°C (frisch herstellen)
Colcemid	1 μ g/ml
Vinblastin	1mg/ml
ICRF-154	10mM

Zur Durchführung von Chromosomen-Bänderungs-Techniken sowie der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (2.2.9) ist es notwendig, die Chromosomen auf Objektträgern zu immobilisieren. Die Chromosomen zu vereinzeln, sie aber dennoch einer Zelle zuordnen zu

können, wird durch Spreiten isolierter Zellkerne gewährleistet. Dazu ist es zunächst notwendig, aus in Kultur wachsenden Zellen die Kerne zu isolieren.

Zur Gewinnung möglichst zahlreicher Metaphasen wird die Zellkultur synchronisiert. Die Zellen wurden abhängig von der Präparationstechnik in bestimmten Phasen des Zellzyklus arretiert. Dies kann durch Nährstoffmangel, der zur Synchronisation der Zellen in der späten G1-Phase führt, oder durch Zugabe von Giften, die in die Mitosephase des Zellzyklus eingreifen, erreicht werden.

24-48h vor der Zellkern-Isolation wurde das Kulturmedium erneuert. Bei Einsatz von Vinblastin oder Colcemid wurden zunächst 10ml Zellkultur-Medium mit 2,5µg Vinblastin bzw. 0,1µg Colcemid versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Vinblastin bzw. Colcemid binden an Tubulin und inhibieren somit die Ausbildung des Kernspindelapparates in der Mitosephase des Zellzyklus.

Zur Anreicherung von Prometaphase-Chromosomen wurden die Zellen einer Konzentration von 25µM ICRF-154 bei 37°C für 30min ausgesetzt. ICRF-154 inhibiert die Aktivität der DNA-Topoisomerase II (Hasinoff, Kuschak et al. 1995; Kizaki and Onishi 1997). Dieses Vorgehen arretiert die Zellen am Übergang zur G2-Phase (Gimenez-Abian, Clarke et al. 2000).

Durch Nährstoffmangel in der späten G1-Phase synchronisierte Zellen wurden ebenfalls 24-48h vor der Präparation mit frischem Medium versorgt und dann direkt anschließend der unten beschriebenen hypotonen Behandlung unterzogen.

Die Isolierung der Nuklei erfolgte durch kontrollierte hypotone Behandlung der Zellen. Dazu wurde eine frische 1:1 Mischung von KCl (55mM) und Natriumcitrat (1%) hergestellt. Die Zellen wurden durch 500xg für 5min pelletiert. Zum Zellsediment wurden sehr langsam und begleitet durch stetiges Mischen der Zellsuspension 10ml der hypotonen Lösung getropft. Eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich an. In dieser Zeit kommt es zu einem kontrollierten Zerplatzen der Zytoplasmamembran. Das Zellysat wurde bei 1000xg für 5min pelletiert und mit 10ml des Fixans Methanol/Eisessig (3:1, -20°C) gemischt wie bereits zuvor beschrieben. Die fixierten Nuklei wurden erneut abzentrifugiert (1000xg für 5min) und weitere drei- bis viermal mit Methanol/Eisessig versetzt. Diese Suspension von Nuklei kann bei -20°C für Monate aufbewahrt werden.

Zur Durchführung von FISH-Experimenten wurden die fixierten Kernisolate tags zuvor auf Objektträger gebracht. Dazu wurde ein entfetteter Objektträger auf einem Ständer im Wasserbad auf etwa 70-80°C vorgeheizt. Darauf folgend wurden zwei bis drei Tropfen der Methanol/Eisessig-Präparation mit einer Pasteurpipette vorsichtig auf den Objektträger

gebracht. Die fixierten Zellkerne platzen und werden als Körner im Licht sichtbar. Nun wird der Objektträger in den Wasserdampf gehalten und direkt auf den heißen Metalldeckel des Wasserbades zum Trocknen gelegt. Vorhandene Metaphase-Chromosomen verteilen sich auf der Glasoberfläche. Die luftgetrockneten Objektträger wurden dann im Lichtmikroskop auf ihre Qualität überprüft. Störende Zytoplasmareste sind unter dem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung als helle Umrisse um die Zellkerne zu erkennen und würden die Hybridisierung der markierten DNA-Sonden (siehe „nick translation“, 2.2.6) mit der Ziel-DNA behindern. Um Zytoplasmareste nachträglich zu entfernen, kann nach Auftropfen der Zellkerne der Objektträger kurz durch die Flamme eines Bunsenbrenners geführt werden.

Diese Metaphase-Präparationen wurden dann über Nacht in einem Ofen bei 60°C getrocknet. Die Metaphase-Objektträger sollten maximal ein bis zwei Wochen vor der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) präpariert und bei 37°C trocken gelagert werden. Für die FISH mussten diese Metaphase-Präparationen einer in Kapitel 2.2.8 geschilderten RNase-Pepsin-Behandlung unterzogen werden.

2.2.8 RNase-Pepsin-Behandlung von Metaphase-Präparaten für die FISH

2x SSC	3M NaCl; 0,3M Natriumcitrat; pH7,0
RNaseA-Stammlösung	10mg/ml
Pepsin-Stammlösung	100mg/ml
0,01M HCl	
PBS/MgCl ₂	1xPBS, 50mM MgCl ₂ (frisch ansetzen)
Formaldehyd (37 %)	

Die Metaphase-Präparate wurden in 2x SSC für 5min bei Raumtemperatur äquilibriert. Im Anschluss daran wurden 200µl frische RNase-Lösung (100µg/ml RNaseA in 2x SSC) auf die Glasoberfläche gegeben und mit einem Deckglas versehen für 1h bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 100ml 0,01M HCl auf 37°C vorgewärmt. Nach der RNase-Behandlung wurde dreimal für je 5min in 2xSSC bei Raumtemperatur gewaschen. Der Verdau der verbliebenen Proteinanteile erfolgte mit 50µg/ml Pepsin in der vorgewärmten 0,01M HCl-Lösung bei 37°C für 10min. Es folgte zweimaliges Waschen in 1x PBS und einmaliges Waschen in PBS/MgCl₂ für jeweils 5min bei Raumtemperatur. Schließlich wurden die Präparate in 1%iger Formaldehydlösung (in PBS-MgCl₂) für 10min bei Raumtemperatur nachfixiert und 5min in 1xPBS gewaschen. Das Präparat kann bis zur Verwendung in der FISH in 70% Ethanol bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.9 Chromosomale Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Formamid (deionisiert)	deionisiert mit 100g Mixed Bed Resin für 1l Formamid
1M Tris-HCl pH8	
20x SSC	3M NaCl; 0,3M Natriumcitrat; pH7,0
50% Dextransulfat	
1M Natriumphosphatpuffer pH7,0	
Denaturierungslösung:	70% Formamid (deionisiert), 2x SSC
Hybridisierungspuffer:	4xSSC, 20% Dextransulfat, 50mM Na-phosphatpuffer pH7,0
Avidin-FITC	1mg/ml
Anti-Avidin D (biotinyliert) (Ziege)	0,5mg/ml
Anti-Digoxigenin-IgG1 κ (Maus)	100 μ g/ml
Cy3-konjugiertes Anti-Maus IgG (Schaf)	1,3mg/ml
Waschlösung A:	2xSSC
Waschlösung B:	4xSSC, 0,1% Tween-20
Blockierungslösung:	4xSSC, 3% BSA
Detektionslösung:	4xSSC, 1% BSA, 0,1% Tween-20
Anti-Bleich-Medium:	0,233g DAPCO in 800 μ l H ₂ O _{bidest.} lösen, 200 μ l Tris-HCl (1M) zugeben
und mit 9ml Glycerin auffüllen	
Chromosomen-Färbelösung:	200ng/ml Propidiumiodid oder 50ng/ml DAPI

Die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) ermöglicht die zytogenetische Lokalisation spezifischer Sequenzabschnitte in komplexen Genomen. Dazu werden DNA-Sonden eingesetzt, die zuvor durch Einbau von Biotin- oder Digoxigenin-konjugierten Nukleotiden markiert wurden (2.2.6). Die zytogenetische Position der hybridisierten DNA-Sonden wird über ein System Fluoreszenz-markierter Antikörper nachgewiesen, die nach UV-Anregung Licht spezifischer Wellenlänge emittieren.

In der FISH wurden 2 μ g/Objektträger an BAC-DNA oder 2-3 μ g/Objektträger YAC-DNA, (siehe 2.2.3) eingesetzt, die zuvor in der „nick translation“ (2.2.6) markiert wurden.

Da die beschriebenen DNA-Sonden human-genomische DNA-Abschnitte repräsentieren, die hoch- und mittelrepetitive Sequenzen enthalten können, wurde eine Präkompetition dieser Sonden mit C₀t1-DNA durchgeführt. Die C₀t1-DNA beinhaltet *Kpn*- und *Alu*-SINEs, die zur Suppression der komplementären Sequenzen verwendet werden. Dazu wurden zu der jeweiligen Sonden-DNA 15 μ g C₀t1-DNA, 10 μ g Heringssperma-DNA (Träger-DNA zur Unterdrückung unspezifischer DNA-Wechselwirkungen) und optional 15 μ g Hefe-tRNA gegeben. Die tRNA dient zur Unterdrückung der etwa in 1300 Kopien vorliegenden tRNA-Gene im menschlichen Genom. Diese DNA-Mischung wurde in 70% Ethanol ohne Natriumacetat gefällt, getrocknet und in 15 μ l deionisiertem Formamid gelöst. Dann wurden 15 μ l Hybridisierungspuffer zugegeben. Die anschließende Denaturierung erfolgte bei 75°C für 10min, die Hybridisierung durch Herunterkühlen auf 37°C für 20min.

In der Zwischenzeit wurden die Metaphase-Präparate für die Hybridisierung vorbereitet. Dazu wurde der Objektträger bei Raumtemperatur für jeweils 3min in 70%, 90% und 100% Ethanol dehydratisiert und auf 50-60°C in trockener Atmosphäre vorgeheizt. Darauf folgte die Denaturierung für 2min in 70°C warmer Denaturierungslösung. Die Temperatur sollte dabei nicht unter 68°C sinken. Nach der Denaturierung wurde der Objektträger unverzüglich in eiskaltes 70%iges Ethanol getaucht, um die Renaturierung der Chromosomen zu verhindern, und erneut je 3min in eiskaltem 70%igem, 90%igem und 100%igem Ethanol entwässert. Nach Lufttrocknung des Objektträgers konnte dann die DNA-Sonde zugegeben werden. Falls eine Zweifarben-FISH präpariert wurde, wurden die beiden unterschiedlich markierten Proben direkt vor dem Auftropfen gemischt. Danach wurde der Objektträger mit einem Deckglas versehen und die Ränder mit „rubber cement“ (Profi-Shop, Stuttgart) luftdicht abgeschlossen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre.

Nach vorsichtigem Ablösen des Deckgläschens erfolgte ein dreimaliges Waschen in Waschlösung A für 5min bei 60°C. Nach kurzem Abtropfen wurden 200µl Blockierungslösung auf den Objektträger getropft und dieser mit einem Deckglas bedeckt. Eine 30minütige Inkubation bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre schloss sich an. Das in der Blockierungslösung enthaltene BSA sättigt die Glasoberfläche zur Vermeidung unspezifischer Bindungen während der folgenden Detektionsschritte ab. Zur Erkennung der biotinmarkierten DNA-Sonde wurde in 200µl Detektionslösung Avidin-FITC (1mg/ml) 1:100 verdünnt. Wurden DIG-markierte Sonden eingesetzt, so wurde Anti-Digoxigenin-IgG1κ (Maus) (100µg/ml) in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben. Das Präparat wurde mit einem Deckglas versehen und eine Inkubation von nicht länger als 30 min bei 37°C schloss sich an. Daraufhin wurde das Deckglas vorsichtig abgestreift und das Präparat für je 5min in Waschlösung B bei 42°C geschwenkt. Die feuchten Präparate wurden dann mit biotinkonjugiertem, gegen Avidin gerichtetem Antikörper (Anti-Avidin D, Ziege) inkubiert. Dazu wurde Anti-Avidin D (500µg/ml) in einem Verhältnis von 1:100 mit Detektionslösung verdünnt und 200µl mit dem Präparat für 30min bei 37°C inkubiert. Wiederum schloss sich ein dreimaliges Waschen in Waschlösung B bei 42°C an.

Zur Amplifikation des Fluoreszenz-Signals wurde erneut Avidin-FITC eingesetzt. Dieser Schritt wurde mit einer 1:100 Verdünnung von Avidin-FITC in Detektionslösung durch Inkubation bei 37°C für 30min durchgeführt. Bei Durchführung einer Zweifarben-FISH wurde zudem eine 1:200 Verdünnung von Cy3-konjugiertem Anti-Maus IgG (Schaf) (1,3mg/ml) zugegeben, die zur Detektion der DIG-markierten Sonden-DNA benötigt wird.

Nach Entfernung des Deckgläschens wurde dreimal in Waschlösung B je 5min bei 42°C gewaschen. Zur Sichtbarmachung der Chromosomen wurde mit DAPI (50ng/ml) oder Propidiumiodid (200ng/ml) für 2-3 min gegengefärbt. Zur Vermeidung schnellen Ausbleichens wurden zwei Tropfen Anti-Bleich-Medium auf die Glasoberfläche gegeben und anschließend mit einem Deckglas abgedeckt. Die Aufbewahrung der FISH-Präparate erfolgte kühl und dunkel, so dass eine Auswertung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop noch Wochen nach der Präparation möglich war.

2.2.10 Restriktion von *BRCA2*-Mutationsträger DNA mittels häufig restringierender Enzyme

Mittels der in 2.2.1 isolierten genomischen DNA wurde nun die DNA mittels der Enzyme (*EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, etc.) geschnitten, um durch einen anschließenden Southern-Blot (2.2.15) die DNA mittels PCR-amplifizierter Proben auf chromosomale Bruchpunkte zu untersuchen. Für diese Experimente wurden 10-12µg DNA in einem Restriktionsansatz mit dem jeweiligen Puffer und Enzym eingesetzt. Hierbei wurde auch darauf geachtet, dass keine „Star“-Aktivität des Enzyms ausgelöst wird. Nach einer mindestens vierstündigen Inkubation bei 37°C wurde die Restriktion mit Ladepuffer abgestoppt und die DNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte ÜN bei 30V in 1xTBE. Um eine TBE-Gradientenbildung zu verhindern, wurde eine Umwälzpumpe angeschlossen.

2.2.11 Präparation von in Gelblöcken eingebetteter DNA

Häemocytometer (Zählkammer)	Neubauer
InCert Agarose	FMC, Biozym
PBS, autoklaviert	
Lyselösung:	100mM EDTA, 1% sodium lauryl sarcosin, Proteinase K (1mg/ml)
Waschpuffer:	20mM Tris, pH 8.0, 50mM EDTA
PMSF-Stammlsg (100mM):	1mM

Standard-Prozeduren für die DNA-Präparation erzeugen keine hoch-molekulare DNA. Große DNA Moleküle sind so zerbrechlich, dass sie durch mechanische Kräfte während der Isolierung brechen. Um diesen Vorgang zu unterbinden, werden intakte Zellen in Agarose eingebettet, lysiert und von Proteinen befreit. Die Agarose Matrix schützt die eingebettete DNA vor Scheerkräften und stellt eine einfache Handhabung der Proben dar. Die fertigen Proben werden zuletzt direkt in die Probenaschen des Gels geladen.

Es ist wichtig die richtige Zellzahl für die Einbettung zu finden. Variationen in Zellzahl würden dazu führen, dass der DNA-Gehalt pro Block zu stark variiert, was zu einer Über- oder Unterladung der Gelbahnen führt, was wiederum zu einer Verschiebung der DNA (DNA-shift) führen kann. Um diesem Umstand vorzubeugen, wurde ein Hämocytometer für das Ermitteln der Zellzahl benutzt.

Zellen wurden bei 800xg zentrifugiert und mit autoklaviertem PBS aufgenommen. Nach der Resuspendierung wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 10ml PBS aufgenommen. Eine Auszählung mittels Hämocytometer schloss sich an, bei der die Zellendkonzentration auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt wurde und auf Eis gestellt wurde. Für das spätere Gießen wurden nun die Blöckchenkammern vorbereitet. Hierbei wurden spezielle Blockformen 20 Blöckchen/Block (hergestellt von der Werkstatt des DKFZ) benutzt, die 120µl/Blöckchen fassen können. Die Blöcke wurden mittels H₂O zuerst ausgekocht und dann mit 70% EtOH gewaschen und getrocknet. Als nächstes wurde nun die Unterseite mit Klebeband abgeklebt und auf Eis gestellt. Dann wurde die InCert Agarose vorbereitet. Hierzu wurde ein kleiner autoklavierter Erlenmeyerkolben benutzt, um eine 1,7% Agaroselösung anzusetzen. Die nächsten Schritte sollten sehr zügig durchgeführt werden. Die Zellsuspension wurde nun vom Eis genommen und leicht an die Raumtemperatur akklimatisiert. Die Agarose wurde nochmals angewärmt, um ein Aushärten zu vermeiden. Als nächstes wurden die beiden Lösungen 1:1 vereinigt und mittels einer sterilen Pipette in die 20 Löcher/Block pipettiert. Nach dem Pipettieren schloss sich eine Auskühlungsphase an. Nach dem Aushärten wurden die einzelnen Blöckchen aus den Löchern mittels einer sterilen Plastikimpföse in die Lyselösung gestoßen. Für die anschließende Lyse wurde eine sterile 6-Lochplatte benutzt und mit Parafilm abgedichtet. 5-10 Blöckchen pro 5ml wurden hierbei eingesetzt. Die Gelblöckchen wurden dann über Nacht bei 50°C mit Kippbewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lyselösung durch eine frische Lösung ersetzt und erneut bis zum nächsten Tag inkubiert. Nach der vollzogenen Lyse wurden die Blöckchen dann in Waschpuffer überführt und mindestens 1 Stunde inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden noch PMSF (Endkonz.: 1mM) hinzugegeben, um restliche Proteinase K Aktivität zu stoppen. Die so hergestellten Blöckchen sind in diesem Waschpuffer 3 Monate haltbar. Um eine verlängerte Haltbarkeit zu erzielen wurden die Blöckchen auch in 0,5M EDTA Lösung aufbewahrt.

2.2.12 Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Puls-Feld-Gelelektrophorese ist eine Methode durch die hochmolekulare DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt werden können. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich DNA-Fragmente in einem alternierenden elektrischen Feld wie „Schlangen durch die Löcher der Poren“ bewegen. Durch die unterschiedlichen Pulszeiten können dann unterschiedlich lange Fragmente aufgetrennt werden, da die Bewegung der Fragmente und die Neuorientierung bei Änderung der Pulsrichtung Zeit benötigt. Diese Zeit trägt maßgeblich dazu bei, dass unterschiedlich große Fragmente eine unterschiedlich lange Zeit brauchen, um eine bestimmte Strecke im Gel zurückzulegen. Die unterschiedlich langen Fragmente entstehen durch die Restriktion der DNA mit selten schneidenden Enzymen wie: *NotI*, *SalI*, *KspI*, *MluI*, *SfiI* etc.

Um die in den Agaroseblöckchen befindliche DNA zu schneiden, wurden nun Restriktionen mit diesen selten schneidenden Enzymen durchgeführt. Hierzu wurden einzelne Blöckchen in ein 1.5ml Gefäß transferiert und im jeweiligen 1x Restriktionspuffer (1ml) auf Eis für 1 Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Puffer verworfen und durch 0,3ml des neuen 1x Puffers ersetzt. Für die ~ 120 µl Blöckchen wurden zwischen 50-80 Enzymeinheiten benutzt. Nach Zugabe des Enzyms wurden die einzelnen Gefäße kurz auf Eis inkubiert, um das Enzym während der Diffusion zu stabilisieren. Nach ein paar Minuten wurden die Reaktionsgefäße in einem Thermoblock mit der jeweiligen Temperatur über Nacht inkubiert. Nach der Restriktion wurden die Blöckchen mit Laufpuffer äquilibriert. Die Vorbereitungen für den PFGE-Lauf wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, wurden folgende Einstellungen am CHEF-DRIII System vorgenommen:

Größenbereich:	50-1000kb
Agarose:	1.0% molekularbiologisch zertifizierte Agarose
Puffer:	0.5x TBE
Temperatur:	14°C
Änderungszeit:	50-90 Sekunden
Laufzeit:	22 Stunden
Winkel:	120°
Volt Gradient:	6 Volt/cm

Die Blöckchen wurden nach Äquilibrierung in die Ladetaschen des gegossenen Agarosegels eingefügt und mit Agarose luftblasenfrei eingegossen. Nach Erkalten der Agarose wurde das Gel in die vorgekühlte Laufkammer der Apparatur gelegt und der Lauf mit oben genannten

Parametern begonnen. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel wie herkömmliche Agarosegele behandelt. Ein paar Abweichungen sind hier aufgeführt:

- das Gel wurde mindestens 20min depuriniert
- mindestens 40min denaturiert
- die Transferdauer verlängerte sich um von „über Nacht“ auf 2 Tage, um einen guten Transfer zu erzielen

2.2.13 Radioaktive Markierung von DNA

„Random priming“ (nach Feinberg und Vogelstein, 1983)

Stammlösung O:	1,25M Tris-HCl, 0,125M MgCl ₂ (pH8)
Stammlösung B:	2M Hepes, pH6,6 (eingestellt mit 4N NaOH)
Stammlösung C:	Hexadesoxynukleotide-pd(N) ₆ (50A ₂₆₀ units in 500 µl H ₂ O _{bidest.} aufgenommen)
Radioaktives Nukleotid:	P- ³² dCTP (3000µCi/mM)
Lösung OLB:	
	25mM MgCl ₂
	250mM Tris-HCl
	je 0,1mM dATP, dGTP, dTTP
	250mM β-Mercaptoethanol
	1M Hepes (pH6,6)
	15A ₂₆₀ units Hexadesoxynukleotide-pd(N) ₆

Zur Identifizierung spezifischer DNA-Sequenzen durch Southern-Hybridisierung (2.2.16) muss die Sonden-DNA zuvor markiert werden. Dies geschieht im beschriebenen Fall durch Einbau radioaktiv markierten P-³²dCTP.

Hierbei wurden etwa 250-500ng Sonden-DNA benötigt. Diese DNA wurde in 15µl H₂O gelöst und bei 100°C für 10min denaturiert. Um eine Renaturierung auszuschließen, wurde die einzelsträngige DNA auf Eis gestellt. Zu der denaturierten DNA wurden dann 5µl OLB-Puffer und 50µCi P-³²dCTP, sowie 5U DNA-Polymerase-Klenow-Fragment gegeben. Der Ansatz wurde ~ 1 h bei 37°C inkubiert.

Bei der Reaktion hybridisieren die Hexanukleotid-„primer“ in zufälliger („random“) Verteilung an die Ziel-DNA. Diese Hexanukleotide bieten dem Klenow-Fragment die notwendigen 3'-OH-Enden, um einen komplementären Doppelstrang zur Matrizen-DNA herzustellen. Dabei werden die angebotenen radioaktiven Nukleotide in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut.

Nach Ablauf der Reaktion wurde der Reaktionsansatz von den übrigbleibenden radioaktiven Nukleotiden durch Gelfiltration auf einer G50-Sepharose-Säule (Amersham-Pharmacia, nach mitgeliefertem Protokoll behandelt) gereinigt. Bevor die markierte Sonde für die Southern-

Hybridisierung eingesetzt wurde, wurde sie erneut bei 100°C für 10 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach wurde die Sonde zur prähybridisierten Blot-Membran pipettiert.

2.2.14 PCR-Amplifikation von BAC spezifischen DNA-Proben

MgCl (Promega)	1,5mM Endkonz
10x Reaktionspuffer (Promega)	1x Endkonz.
dNTPs [100mM]	0,25mM Endkonz.
BAC-Primer f. Proben	1mM Endkonz.
Taq-Polymerase (Promega)	1U/Reaktion
BAC-DNA (mini-Preparation)	1µl
Wasser, autoklaviert	ad 50µl

Für die Bruchpunktanalyse sollten mittels der bekannten BAC-Sequenz DNA-Proben hergestellt werden, um rearrangierte chromosomale Bereiche als veränderte DNA-Fragmente auf Southern-Filtern der *BRCA2*-Mutationsträger zu identifizieren. Hierzu wurde eine PCR-Reaktion auf Eis mit den nötigen Reagenzien angesetzt. Die Taq-Polymerase wurde erst dann zur Reaktion hinzugefügt, wenn die PCR-Cycler (Perkin&Elmer 9100) die nötige Denaturierungstemperatur von 94°C erreichten. Dann wurde die Maschine auf „Pause“ gesetzt und das Enzym in die Reaktion pipettiert. Die Reaktion(en) wurden in die PCR-Kammern eingesetzt und die Maschine wieder auf „Start“ gestellt. Durch diesen Vorgang sollte eine unspezifische PCR-Amplifikation durch die Taq-Polymerase verhindert werden. Das PCR-Protokoll wurde wie folgt eingestellt:

94°C	3min	} 33x Zyklen
94°C	50sec	
59°C	1min	
72°C	1-2min (je nach Länge des Produktes)	
72°C	10min	
4°C	unendlich	

Nach der PCR-Amplifikation wurde der Ansatz auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das amplifizierte DNA-Produkt wurde nach EtBr-Färbung mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mittels des Gelextraktionskits der Firma Qiagen aus den Agaroseblöckchen extrahiert und nochmals auf einem Agarosegel auf ihre korrekte Größe überprüft.

2.2.15 Southern Blot (Alkali Blot) (Southern, 1975)

Depurinierungslösung:	0,25M HCl
Denaturierungslösung:	0,4N NaOH
Neutralisierungspuffer:	2xSSC
Hybond-N+-Membran	(Amersham-Pharmacia, Freiburg)

Die DNA-Fragmente wurden nach der Gelelektrophorese zunächst in Ethidiumbromid (0,4µg/ml H₂O) gefärbt. Nach Dokumentation des Gels mit angelegtem Lineal wurde dieses zweimal für 15min in Depurinierungslösung geschwenkt, um große DNA-Fragmente durch saure Hydrolyse in kleinere, besser diffundierende Stücke zu zerlegen. Nach der Depurinierung wurde das Gel in Denaturierungspuffer geschwenkt und währenddessen die Blot-Apparatur aufgebaut.

Der Transfer der einzelsträngigen DNA auf die Hybond-N+-Membran erfolgte über Nacht. Nach Beendigung des Transfers wurde der Blot abgebaut und die Effizienz des Transfers durch Illumination der Membran unter der UV-Lampe (254nm) geprüft. Die Membran wurde dann 30min in Denaturierungslösung gewaschen und kurz in H₂O_{bidest.} geschwenkt. Neutralisiert wurde die Membran durch 1minütiges Schwenken in 2xSSC (Sambrook et al., 1989). Nach leichtem Antrocknen zwischen Whatman Papier wurde die Membran im Ofen für eine knappe Stunde gebacken (70°C). Die Aufbewahrung erfolgte bei -4°C oder -20°C bei längerem Nichtgebrauch.

2.2.16 Southern-Hybridisierung

PFGE-Hybridisierungslsg,	
Hybridisierungslösung:	500mM Natriumphosphatpuffer pH7,3; 7% SDS, 10mM EDTA
Waschlösung:	2xSSC pH7,5 + 0,1% SDS; 1xSSC pH 7,5 + 0,1% SDS

Vor Beginn der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung auf 68°C vorgewärmt. Die Membran (2.2.15) wurde zusammengerollt in eine Hybridisierungsröhre gegeben. In diese wurden 10-20ml Hybridisierungslösung gegeben und für mindestens 2 Stunden bei 68°C im Rollinkubator prähybridisiert. Im Anschluss an die Prähybridisierung wurde die Hybridisierungslösung durch frische Lösung ersetzt und die zuvor radioaktiv markierte Sonden-DNA (2.2.13) in die Röhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für mindestens 15 Stunden bei 68°C im Rollinkubator.

Zwei Waschschritte wurden für 15min in der Hybridisierungsröhre bei 68°C durchgeführt. Nach diesen Waschschritten wurde die Membran aus der Röhre entnommen und im Schüttelwasserbad bei 68°C gewaschen. Das Ende des Waschvorgangs wurde durch Ablesen

der radioaktiven Zerfälle ermittelt. Als Richtwert wurden 100-250 counts/min genommen. Zur Autoradiographie wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und in einer lichtdichten Kassette mit Verstärkerfolie fixiert. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C für 12-24 Stunden.

2.2.17 Bioinformatische Programme zur Herstellung von Hybridisierungs sonden

Da durch die BAC Klone eine spezifische Sequenzinformation zur Verfügung stand, wurden durch geeignete Software-Programme Primer hergestellt. Die Vorgehensweise soll hierbei kurz vorgestellt werden:

HUSAR Programm „bl2seq“

Dieses Programm analysiert zwei beliebig lange Sequenzen gegeneinander und stellt mittels einer grafischen Zeichnung eine Sequenzüberlappung dar. Durch diese Methode konnten zum Anfang der Arbeit die noch nicht fertig sequenzierten Contigs innerhalb der BAC Klone zugeordnet werden. Dieses Verfahren sollte die genaue Zuordnung der später hergestellten Sonde ermöglichen, und soweit es möglich war eine durchgängige Restriktionskarte aufzeigen.

HUSAR Programm „map“

Dieses Programm stellt anhand vorgegebener oder selbst zusammengestellter Enzyme eine Restriktionskarte einer beliebigen Sequenz dar. Mit Hilfe dieses Programms wurden die einzelnen Sonden ausgewählt um eine Überlappung der Sonden während der Southern-Hybridisierung zu garantieren.

HUSAR Programm *repeat*

Dieses Programm erkennt in DNA Sequenzen sogenannte *repeat*-Sequenzen (Wiederholungssequenzen) die in den durch die PCR hergestellten Sonden natürlich nicht enthalten sein sollten. Das Programm erkennt durch die Anbindung an die *repeat*-Datenbank alle zur Zeit bekannten *repeats*, wobei in den Standard-Einstellungen des Programms alle *repeats* durch „N“ markiert werden. Durch die Markierung konnten nun überlappende Sequenzen für die anschließenden Primersequenzen herausgesucht werden.

HUSAR Programm „primer“

Nachdem die überlappenden Sequenzen durch das Programm „repeat“ gefunden wurden, konnte nun durch das Programm „primer“ die Primersequenz für die anschließende Synthese ermittelt werden. Das Programm ermittelt anhand vorgegebener Parameter die optimale Zusammensetzung eines for (vorwärts) und rev (rückwärts) Primers, um ein Produkt in der PCR zu erhalten. In dem Programm wurden die Standardparameter belassen und nur die Distanz der Primer, also die Länge der zu amplifizierenden DNA, geändert.

2.2.18 Identifizierung potentiell transkribierter Sequenzen in human-genomischer DNA

Die Identifizierung potentiell transkribierter Bereiche in human-genomischer DNA kann durch bioinformatische Methoden erfolgen. Diese Methoden basieren auf Homologie-Abgleichen zu EST-Datenbanken und auf Algorithmen zur Erkennung bekannter Spleiß-Muster, Transkriptionsstarts und Poly-Adenylierungs-Stellen.

Im Folgenden werden verschiedene Programme zur bioinformatischen Transkript-Vorhersage erläutert.

Eine große Anzahl verschiedener Algorithmen werden von Bioinformatik-Institutionen angeboten, die in genomischer Sequenzinformation putativ transkribierte Sequenzen identifizieren können. Zwei dieser Methoden wurden in dieser Arbeit verwendet:

1. Die Identifizierung von cDNAs durch direkten Vergleich genomischer Sequenzen mit cDNA-Datenbanken. (Programm: ESTCLUSTER, <http://genome.dkfz-heidelberg.de>)
2. Die Identifizierung von cDNAs durch Algorithmen, die die Vorhersage bestimmter Gen-Strukturen innerhalb genomischer Sequenzen erlauben. (Programme: GENSCAN, <http://genome.dkfz-heidelberg.de>; GRAIL, <http://grail.lsd.ornl.gov/grailexp/>)

Die genannten Programmpakete verwenden Sequenzinformationen, die in den GENBANK- und EMBL-Nukleotidsequenz-Datenbanken zu finden sind. Das Programm ESTCLUSTER maskiert zunächst die repetitiven Abschnitte innerhalb der genomischen Sequenz, um solche den darauffolgenden Datenbank-Suchen zu entziehen. Diese Vorgehensweise ist der Prä-Hybridisierung repetitiver DNA bei Southern-Hybridisierungen analog. Die nicht-maskierten Abschnitte gelangen zu einem Nukleotidsequenzabgleich, der ausschließlich gegen humane EST-Datenbanken erfolgt. Diese Funktion wird durch das Programm BLASTN (Basic Local

Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990) erfüllt. Homologe Sequenzen werden nach jeder BLAST-Suche durch das Programm CAP automatisch zu einer Sequenz-Contig angeordnet.

Das Ergebnis dieser Datenbank-Analyse zeigt das BLASTN-Ergebnis mit prozentualem Grad und dem Größenbereich der Homologien an. Ebenso werden Contigs aus den überlappenden homologen DNA-Sequenzen durch das Programm CAP erstellt.

Die Programme GENSCAN und GRAIL berechnen aus genomischen Sequenzabfolgen Wahrscheinlichkeiten für potentielle Genstrukturen. Das Wahrscheinlichkeitsmodell folgt den bekannten strukturellen Eigenschaften human-genomischer DNA. Den Programmen liegen Algorithmen zugrunde, die die Identifizierung von Exon-Intron-Grenzen, Polymerase II-Promotoren und auch Polyadenylierungs-Stellen ermöglichen.

Unterschiede der Programme GENSCAN und GRAIL liegen in der Maskierung bestimmter repetitiver Elemente, dem Vergleich zu bekannten EST-Sequenzinformationen und der Zusammensetzung der Ergebnisse.

GENSCAN unterläßt die Maskierung LINE-repetitiver DNA-Abschnitte und produziert daher eine größere Anzahl potentieller Translationsprodukte. GENSCAN führt keine selbstständigen Datenbank-Vergleiche zu bekannten EST-Sequenzen durch und gibt neben Wahrscheinlichkeitsangaben für die vorhergesagten Transkriptionseinheiten ausschließlich Sequenzinformationen der Translationsprodukte, nicht aber der Transkriptionsprodukte aus.

GRAIL lokalisiert die Abschnitte hoher Homologien zu bekannten repetitiven Sequenzen und führt Datenbank-Vergleiche der identifizierten potentiellen Transkripte zu EST-Datenbanken aus. Diese Zusatzfunktionen erleichtern die Beurteilung der Ergebnisse, da bereits Informationen aus Datenbank-Quellen in die GRAIL-Ergebnisse implementiert sind.

Die durch GENSCAN generierten Translationsprodukte wurden gesonderten Analysen des Programms BLASTP unterzogen. Das Programm BLASTP vergleicht Proteinsequenzen zu denen in Protein-Datenbanken gespeicherten Sequenzinformationen. Zudem wurden die durch GRAIL und GENSCAN vorhergesagten Proteinsequenzen mit dem Programm CD-Search analysiert. Das Programm CD-Search verwendet einen BLAST-Algorithmus, der nach Homologien zu konservierten Proteindomänen sucht. Die dabei verwendete Datenbank CDD (Conserved Domain Database) ist aus den Datenbanken SMART, PFAM inklusive einiger zusätzlicher Informationen des NCBI zusammengesetzt. Weitergehende Informationen zu dieser Funktion sind über den Internet-Zugang des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) erhältlich. Sowohl BLASTP als auch CD-Search wurden mit Standardparametern über die

Internetseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ausgeführt.

3. Ergebnisse

Bei chromosomalen Analysen von drei Familien mit familiärem Brustkrebs konnten Veränderungen des Chromosoms 9p23-24 beobachtet werden. Bei drei männlichen Mitgliedern der Familie 1 zeigte es sich, dass alle drei eine *BRCA2*-Mutation aufwiesen. Bei den *BRCA2*-Mutationsträgern der Familien 2 und 3 konnten ebenfalls Veränderungen des Chromosoms 9 detektiert werden. Durch das Anfertigen einer Karte von überlappenden BAC-Klonen und das Durchführen von FISH und Southern-Hybridisierungen, konnten die Rearrangements klarer definiert und aberrante chromosomale Bruchpunktfragmente identifiziert werden.

3.1 Aufbau einer BAC-Contig zur Charakterisierung der chromosomalen Bruchpunkte in drei Familien mit *BRCA2*-Mutationsträgern

Mit Hilfe der bioinformatischen Software des HUSAR-Programmpakets (Heidelberg Unix Group) wurde eine BAC-Contig erstellt und mit bereits sequenzierter humaner DNA (Sanger Institut) und Sequenzdaten einer PAC-Contig überprüft. Für die Contig wurden BAC-Klone ausgewählt, da diese im Gegensatz zu YAC-Klonen einen wesentlich niedrigeren Prozentsatz von chimären und instabilen Klonen besitzen und zusätzlich eine längere humane DNA-Sequenz als PAC-Klone enthalten. Die BAC-Klone wurden als Einzelklone gepickt und durch eine PCR mit spezifischen Primern auf ihr korrektes DNA-Insert getestet. Durch die Datenbanken des Human Genom Projekt wurde nun mittels Sequenzvergleich der bis dato nicht vollständigen Sequenzen die BAC-Contig erstellt. Zunächst wurden die Sequenzen innerhalb eines BAC-Klons in Sequenzcluster (*sequence-contig*) unterteilt. Hierbei wurden die Teilbereiche jedoch nicht nach ihrer physikalischen Anordnung, sondern vielmehr nach ihrem Sequenzstatus gegliedert. Mit Hilfe des HUSAR Programms *bl2seq* wurden die unvollständigen Sequenz-Cluster eines Klons mit der Sequenz eines anderen Klons verglichen (Abb.6) und so zu einem Sequenzüberlappungsbereich zusammengeführt. Das Programm benutzt hierbei den Algorithmus der bekannten *blast* Suchmaschine (benutzt vom NCBI, HUSAR etc) und verbindet diesen mit einem Programm, das speziell zwei Sequenzen miteinander vergleicht. Bei diesem Algorithmus wird ein Treffer, also eine Übereinstimmung der Nukleotidsequenz (*match*), als 1, keine Übereinstimmung (*mismatch*) als -3, eine Sequenzlücke (*gap*) als -5 und jede weitere Lücke als -2 gewertet. *Bl2seq* ist dabei wesentlich schneller als andere, paarweise-arbeitenden Husar-Programme wie *gap*, *bestfit* oder *similarity*.

Hierdurch war es vor Beendigung der kompletten Sequenzierung durch Celera und des Human Genom Projekts möglich, überlappende Klone zu identifizieren. Diese Methode wurde, kombiniert mit Celera Sequenzen, auf über 40 Klone angewandt und es konnte somit eine zusammenhängende BAC-Karte erstellt werden (Abb.7). Durch die konstruierten Primer für die Herstellung der PCR-Proben war es ebenso möglich, bereits in FISH-Analysen eingesetzte YAC-Klone in die BAC-Contig einzuordnen. Hierzu wurden mittels der Primer die Produkte aus positiv vermuteter YAC-DNA amplifiziert. Nach Erhalt eines spezifischen Produktes konnte der durch den YAC-Klon überlagernde genomische Bereich genauer zugeordnet werden, als es durch STS Marker möglich wäre. Als Ergebnis konnte eine BAC-Karte mit integrierten YAC-Klonen erstellt werden, die eine vollständige genomische Karte der Region 9p23-24 darstellt.

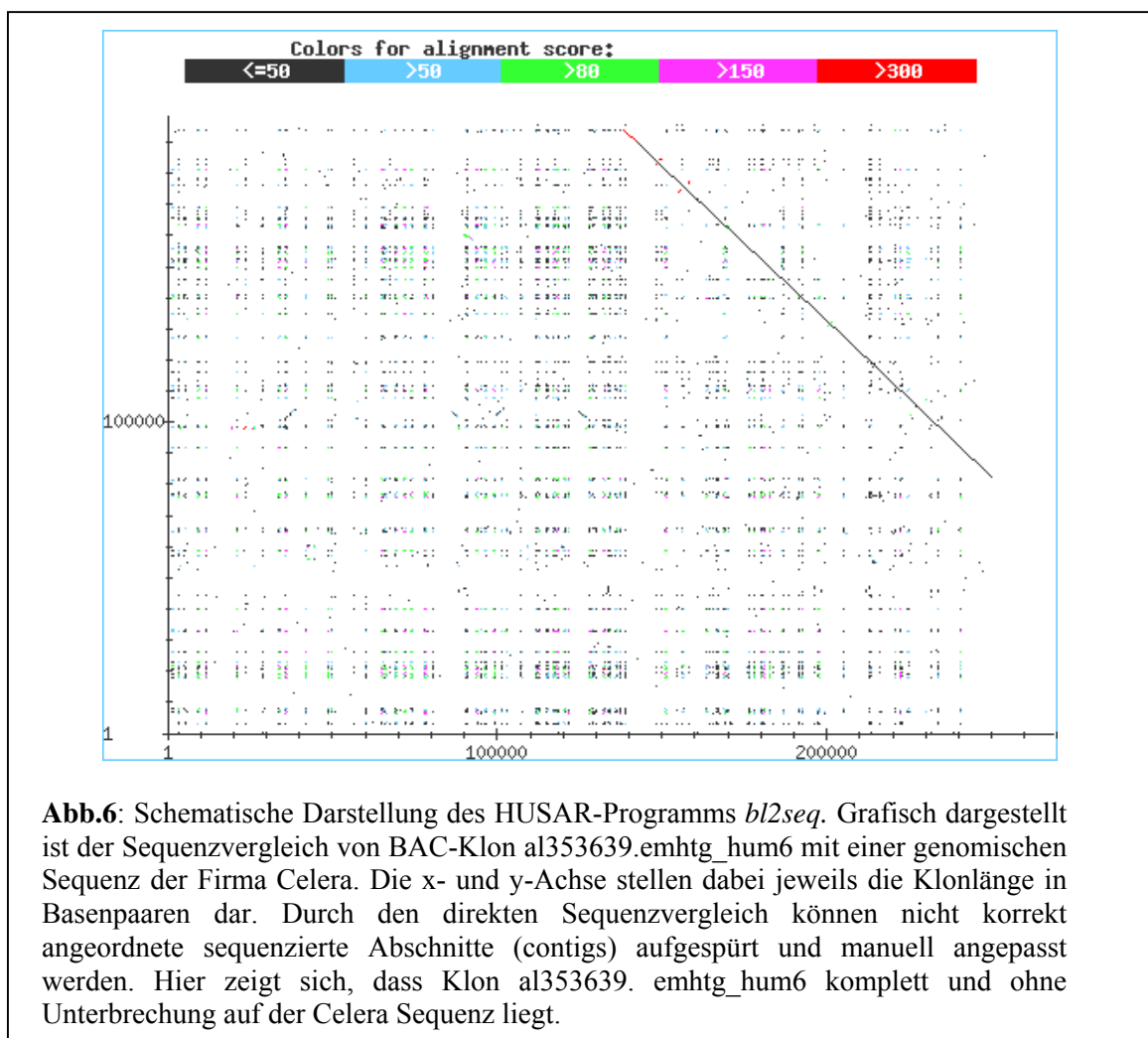


Abb.6: Schematische Darstellung des HUSAR-Programms *bl2seq*. Grafisch dargestellt ist der Sequenzvergleich von BAC-Klon al353639.emhtg_hum6 mit einer genomischen Sequenz der Firma Celera. Die x- und y-Achse stellen dabei jeweils die Klonlänge in Basenpaaren dar. Durch den direkten Sequenzvergleich können nicht korrekt angeordnete sequenzierte Abschnitte (contigs) aufgespürt und manuell angepasst werden. Hier zeigt sich, dass Klon al353639. emhtg_hum6 komplett und ohne Unterbrechung auf der Celera Sequenz liegt.

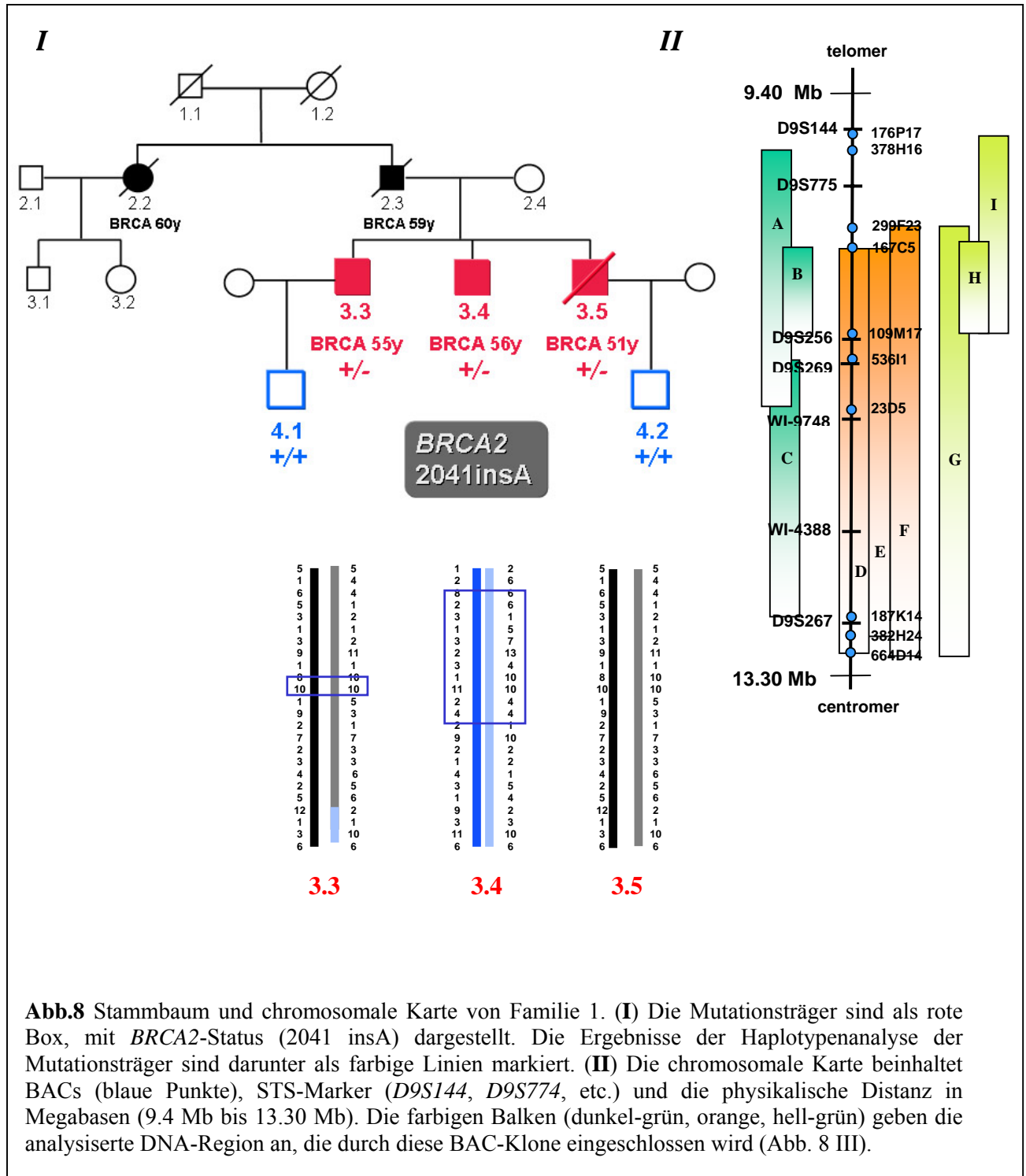
3.2 Analyse der chromosomalen Region 9p23-24 in *BRCA2*-Mutationsträgern

3.2.1 FISH-Analyse der Mutationsträger von Familie 1

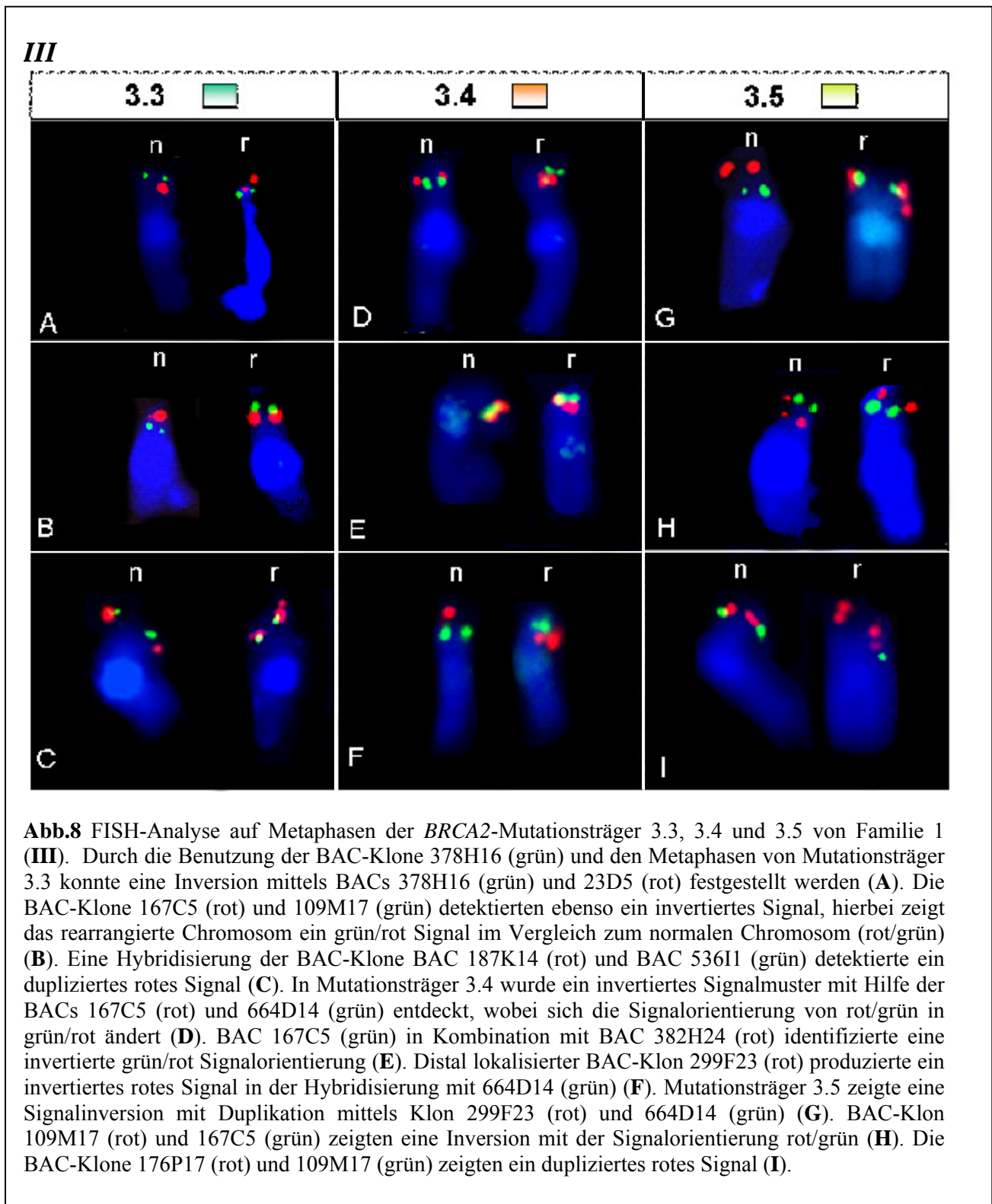
Die Erstellung der durchgängigen BAC-Klonkarte mit dem Abgleich der identifizierten PAC-Klone (Dr. Andreas Claas) ermöglichte nun eine genaue Kartierung der in allen Familien überlappenden Region. Nach der Isolierung der BAC-DNA und der Verifizierung durch die PCR mittels spezifischer Primer, wurde die BAC-DNA markiert und auf vorbereiteten Metaphasen der Mutationsträger hybridisiert. Die Hybridisierung der BAC-Klone 378H16 (grün, proximal *D9S144*) und 23D5 (rot, distal *WI9748*), detektierte hierbei eine Signalinversion von grün/rot (Wildtyp) zu rot/grün in Mutationsträger 3.3 von Familie 1 (Abb.8 III A). Im Weiteren zeigte die Analyse mit den BAC-Klonen 167C5 (rot, distal *D9S928*) und 109M17 (grün, proximal *D9S928*) in diesem Bereich eine Inversion (Abb.8 III B). Die Analyse mit den BAC-Klonen 187K14 (rot, nahe des *TYRP1*- und *mPDZ*-Genes) und 536I1 (grün, distal *D9S269*) konnte ein rotes dupliziertes Signal detektieren, was auf eine Duplikation oder einen Inversionsbruchpunkt proximal hinweist (Abb.8 III C).

Die beiden BAC-Klone 167C5 (rot, proximal *D9S775*) und 664D14 (grün, proximal *D9S267*) konnten in Mutationsträger 3.4 ein invertiertes Signalmuster detektieren (Abb.8 III D). Die FISH- Analyse mit BAC-Klon 382H24 (grün, proximal *D9S267*) und Klon 167C5 (rot, proximal *D9S775*) konnte eine chromosomale Inversion in diesem DNA-Bereich identifizieren (Abb.8 III E). Eine weitere Analyse mit den Klonen 299F23 (rot, proximal *D9S775*) und 664D14 (grün, proximal *D9S267*) vergrößerte die Inversion proximal des STS Marker *D9S775* (Abb.8 III F). Eine anschließende FISH-Analyse mit Klon 378H16 zeigte keine Inversion mehr (Daten nicht gezeigt).

Mutationsträger 3.5 aus dieser Familie wurde anhand der schon erlangten Daten nun mit weiteren BAC-Proben analysiert. Es konnte durch die BAC-Proben 299F23 (rot, proximal *D9S774*) und 664D14 (grün, proximal *D9S267*) eine Inversion des Signalmusters von rot/grün zu grün/rot festgestellt werden (Abb.8 III G). Es zeigte sich weiterhin, dass BAC-Klon 299F23 ein dupliziertes Signal zeigt.



Die Analyse mit BAC-Proben innerhalb dieser Veränderung sollte nun ein Inversionsereignis bestätigen. Hierzu wurden die BAC-Proben 109M17 (rot, distal *D9S256*) und 167C5 (grün, proximal *D9S775*) auf Metaphasen hybridisiert. Hierbei konnte die oben genannte Inversion bestätigt werden (Abb.8 III H). Eine anschließende Hybridisierung mit den BAC-Proben 176P17 (rot, proximal *D9S144*) und 109M17 (grün, distal *D9S256*) konnte eine Inversion mit dupliziertem rotem Signal detektieren (Abb.8 III I).

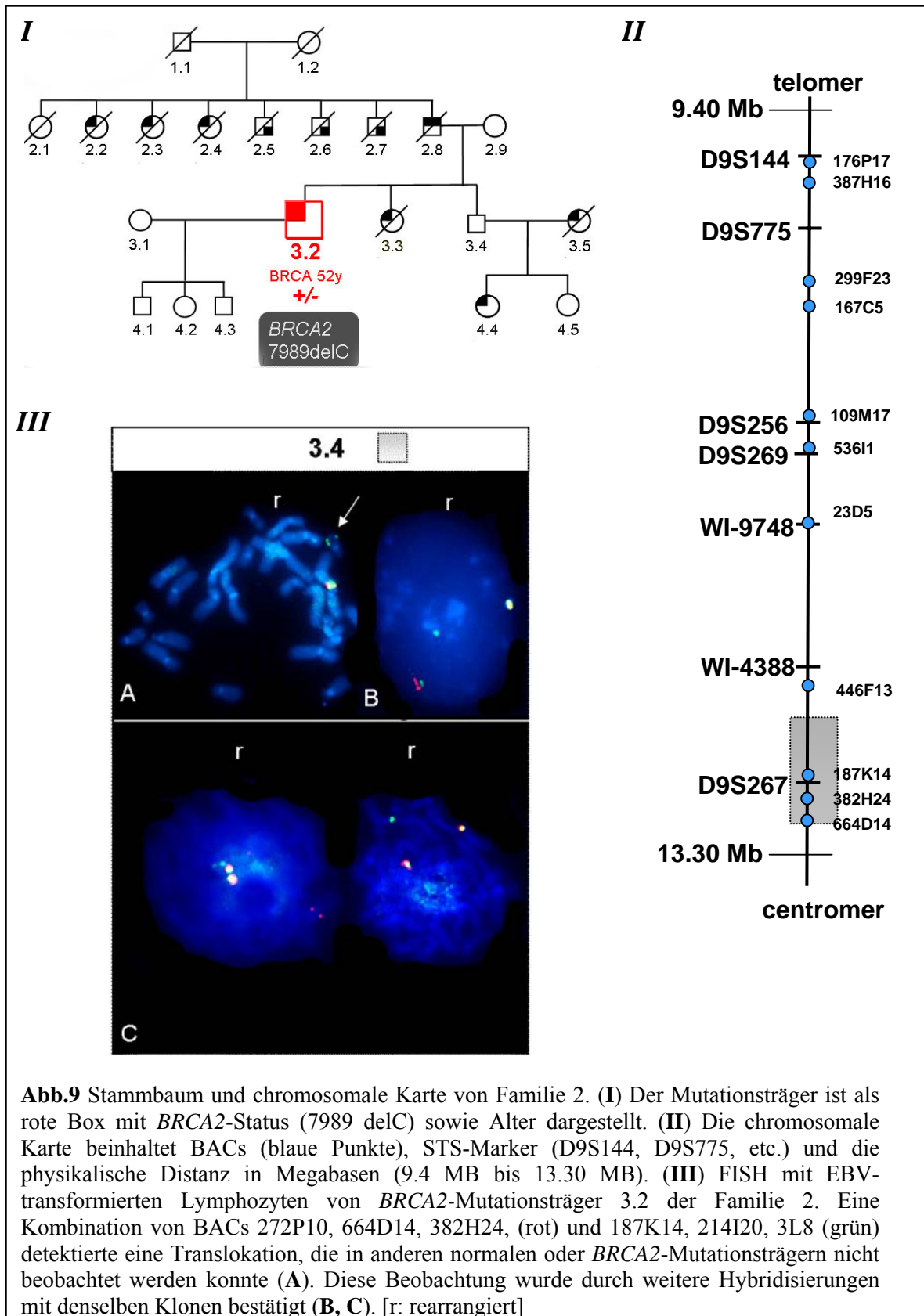


Die FISH-Ergebnisse deuten auf mindestens zwei Bruchpunkte in der Nähe der BAC-Klone 209F23/109M17 und 382H24/664D14 hin. Hierbei handelt es sich um eine Inversion, die sehr wahrscheinlich von BAC 209F23 bis BAC 664D14 verläuft. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen sind in der Abb. 13 zusammengefasst.

3.2.2 Chromosomale Analyse des Mutationsträgers 3.2 von Familie 2

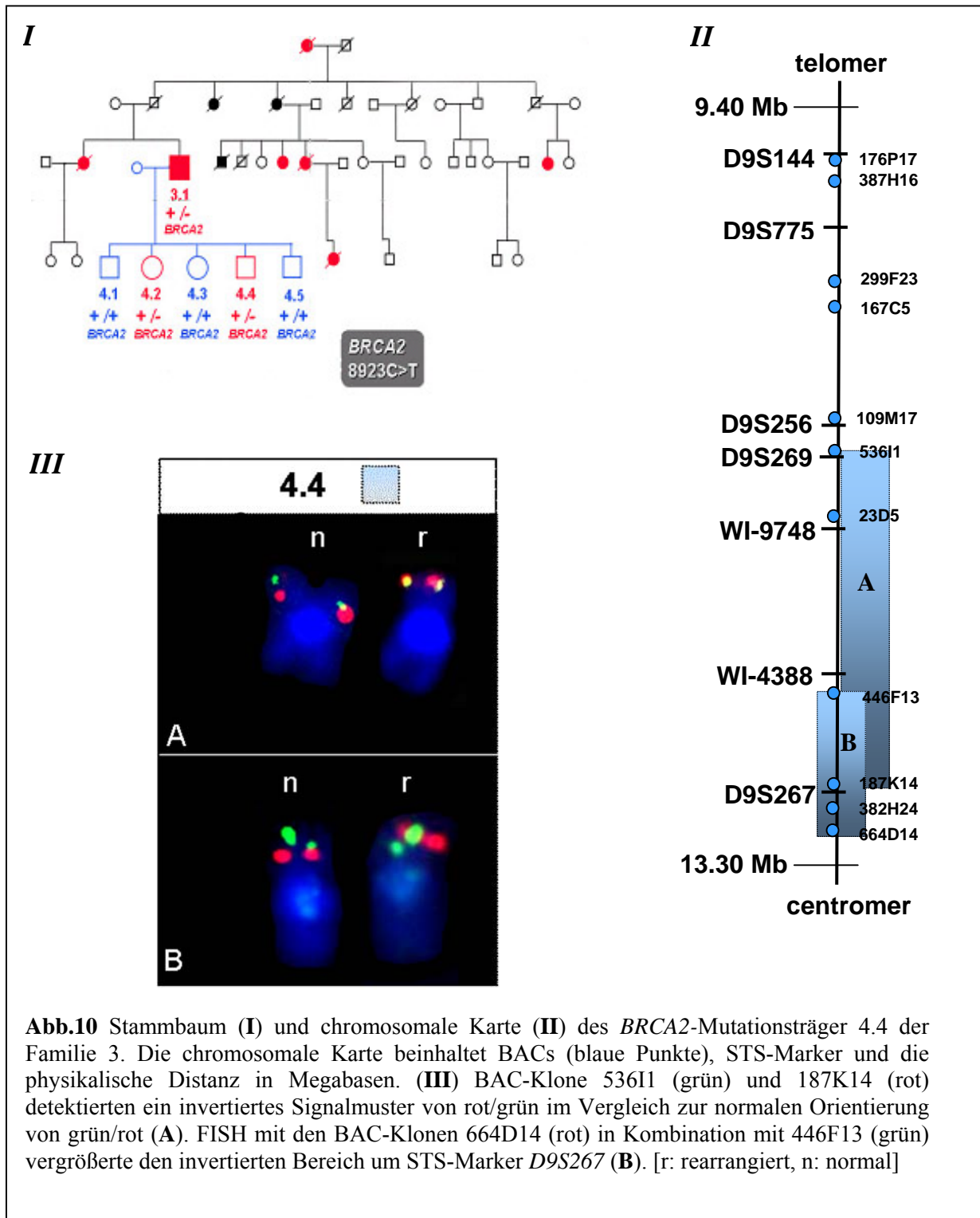
Der Mutationsträger 3.2 aus Familie 2 gehört zu den Hochrisiko-Krebsfamilien mit sechs weiblichen und zwei männlichen Brustkrebsfällen, sowie drei Fällen von Prostatakrebs. Patient 3.2 erkrankte im Alter von 52 Jahren. Eine Sequenzanalyse ergab eine Mutation des *BRCA2*-Gens an Position 7989. Diese Mutation führt durch die Deletion eines Cytosin-Nukleotids (7898delC) zu einem vermuteten Translationsabbruch in Kodon 2647 (Abb.9 I). Zytogenetische Untersuchungen von Giemsa gebänderten Metaphasen EBV-transformierter Lymphozyten zeigten einen normalen 46, XY Karyotyp (A. Claas). Um die chromosomalen Veränderungen in diesem Patient genauer untersuchen zu können, wurde mit denselben BAC-Proben wie in Familie 1 eine FISH-Analyse durchgeführt. Hierbei konnte neben einer großen Inversion (detektiert durch 167C5 und 664D14; Daten nicht gezeigt), auch eine Translokation im Bereich des STS-Markers *D9S268* detektiert werden. Durch die Markierung der BAC-Klone 272P10, 664D14, 382H24 (rot, proximal *D9S267*) und 187K14, 214I20, 3L8 (grün, distal *D9S267*) konnte dieses Rearrangement nachgewiesen werden (Abb.9 B, C).

Wie durch den Vergleich zur Familie 1 auffällt, befindet sich der rearrangierte Bereich ebenfalls im Bereich der STS-Marker *D9S928* und *D9S267*. Auffällig ist jedoch die Translokation, die bei anderen *BRCA2*-Mutationsträgern der Familien 1 und 3, sowie *BRCA2*-Wildtypen nicht beobachtet werden konnte.



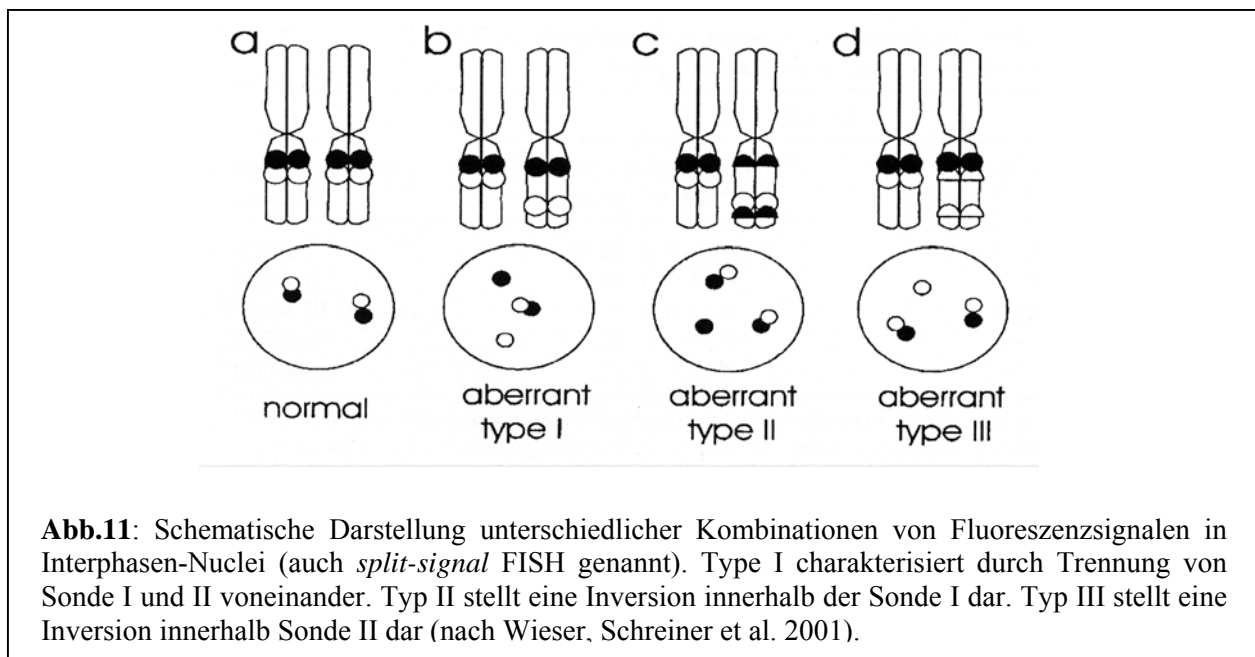
3.2.3 Chromosomale Analyse des *BRCA2*-Mutationsträgers 4.4 der Familie 3

Mutationsträger 4.4 gehört zur dritten Hochrisikofamilie, in der insgesamt 6 Fälle weiblichen und 1 Fall männlichen Brustkrebs aufgetreten sind (Abb.10). Die lymphoblastoiden Zellen, die von Mitgliedern dieser Familie vorhanden sind, stammen von den Individuen 3.1 (Vater, männlicher Brustkrebs) mit den gesunden Kindern 4.1 (Sohn), 4.2 (Tochter), 4.3 (Tochter) und 4.4 (Sohn). In Patient 3.1 wurde im Alter von 69 Jahren Brustkrebs diagnostiziert und eine Mutation des *BRCA2*-Gens im Exon 21 an Position 8923 der cDNA (8923C>T) festgestellt. Durch diese Mutation wird eine Termination der Translation im Kodon 2899 vermutet (Abb.10 I). Mittels FISH mit BAC-Klonen aus der bereits mit YAC-Klonen eingegrenzten Region sollten nun die Rearrangements in Mutationsträger 4.4 analysiert werden. Da der Überlappungsbereich auch für diesen Mutationsträger in Frage kam, wurden auch hier die bereits verwendeten BAC-Klone für weitere Analysen in dieser Familie benutzt. Die Hybridisierung markierter BAC-Klone 536I1 (grün, *D9S269*) und 187K14 (rot, *D9S267*) konnte auf Metaphasen dieses Mutationsträgers eine Inversion identifizieren (Abb.10 III). Um eine gemeinsame, rearrangierte Region für alle Mutationsträger identifizieren zu können, wurden die BAC-Klone 446F13 (grün, proximal *WI-4388*) und 664D14 (rot, proximal *D9S267*) für die FISH eingesetzt. Es konnte, ebenso wie bei den Familien 1 und 2, eine Inversion des Signalmusters von grün/rot nach rot/grün identifiziert werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Familie 1 konnte bei diesem Mutationsträger kein dupliziertes Signal identifiziert werden.



3.3 Untersuchung von Mutationsträgern der drei Familien mit Hilfe der Interphasen-FISH

Um den Bereich zwischen *D9S267* und *D9S268* genauer zu untersuchen, wurde eine Interphasen-FISH durchgeführt (Mancini, Cedrone et al. 2000; van der Burg, Smit et al. 2002). Durch die Auswahl von überlappenden Klonen und deren Markierung mit demselben Fluoreszenzfarbstoff können hierbei Inversionen leicht detektiert werden, wenn die BAC-Klone auf einen physikalisch voneinander getrennten genomischen Bereich hybridisieren. Eine normale Orientierung bei der *split-signal* FISH, in der pro Farbe mindestens zwei BAC-Klone verwendet werden, ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Beim veränderten Typ I (Abb.11 b) wird eine Inversion genau zwischen schwarz und weiß detektiert. Der Typ II zeigt eine Inversion, die innerhalb des schwarzen Bereichs liegt (11 c). Typ III stellt die Möglichkeit dar, bei der der Inversionsbruchpunkt im weiß markierten Bereich liegt (11 d).



Mittels dieser Methode wurden die BAC-Klone distal *D9S267* (3L8, 214I20 und 187K14: Sonde 1) grün und proximal *D9S267* (382H24, 664D14 und 272P10: Sonde 2) rot detektiert. Als zweite Methode wurden die Proben gelb (187K14, Sonde 1), grün (382H21, Sonde 2) und rot (664D14, Sonde 3) in der FISH detektiert. Der Vorteil der zweiten Methode besteht in der Differenzierung der drei Signale gelb/grün/rot voneinander und der damit differenzierten Analyse der Inversion. Wie in Abb.11 dargestellt ist, konnten verschiedene Inversionsbruchpunktbereiche festgestellt werden. In Mutationsträger 3.3 aus Familie 1,

konnte die Inversion im Bereich des D9S267 Markers festgestellt werden. Die Pfeile markieren in der Abbildung die Trennung des Fluoreszenzsignals rot(664D14) von gelb(187K14) / grün(382H21) (Abb.12A). Neben einem invertierten Signalmuster (mittlere Zelle, Abb.12A), konnte auch ein amplifiziertes Signal identifiziert werden (rechts, untere Zelle, Abb.12A). Bei 3.4 (Abb.12B) der Familie 1 konnte ebenso die Inversion detektiert werden. Auch hier sind die roten Signale (664D14) deutlich von gelb/grün (187K14/382H21) getrennt. Die Proben konnten in Mutationsträger 3.5 derselben Familie (Abb.12C) die Inversion detektieren, wobei auch hier das rote Signal (664D14) dupliziert bzw. amplifiziert war. Bei 3.2 von Familie 2 konnte eine Inversion detektiert werden, die zwischen dem grünem Signal (382H21) und rotem Signal (664D14) liegt (Abb.12D, obere Zelle). Weiterhin konnte ein rotes, amplifiziertes Signal detektiert werden (Abb.12D, untere Zelle). Die Analyse des Mutationsträgers 4.4 von Familie 3 ließ sowohl eine Inversion durch ein rotes Signal (664D14) getrennt von gelb/grün (187K14/382H21) als auch eine Inversion zwischen grün getrennt von gelb/rot erkennen (Abb.12E). Die Negativ-Kontrollen stellten der *BRCA2*-Wildtypträger 4.1 (Sohn von 3.3) und eine unabhängige etablierte lymphoblastoide Zelllinie (WD) dar. Die Analysen in diesen Wildtypen konnten keine eindeutig getrennten Signale erkennen lassen. Nach Auszählen von 100 Interphasen konnten die Inversionsereignisse in Tabelle 1 zusammengefasst werden.

Interphasen-Nuclei	Inversion	Duplikation
3.3 (F1) +/-	18 %	3 %
3.4 (F1) +/-	33 %	4 %
3.5 (F1) +/-	25 %	5 %
4.1 (F1) +/+	2 %	-
3.2 (F2) +/-	40 %	5 %
4.4 (F3) +/-	42 %	1 %
WD +/+	1 %	-

Tab.1: Interphasen-FISH-Analyse nach dem *split-signal* Verfahren. Die Prozentangaben geben die positiv aufgefallenen Interphasenkerne der Mutationsträger nach Auszählen von 100 willkürlich ausgesuchten Kernen wider.

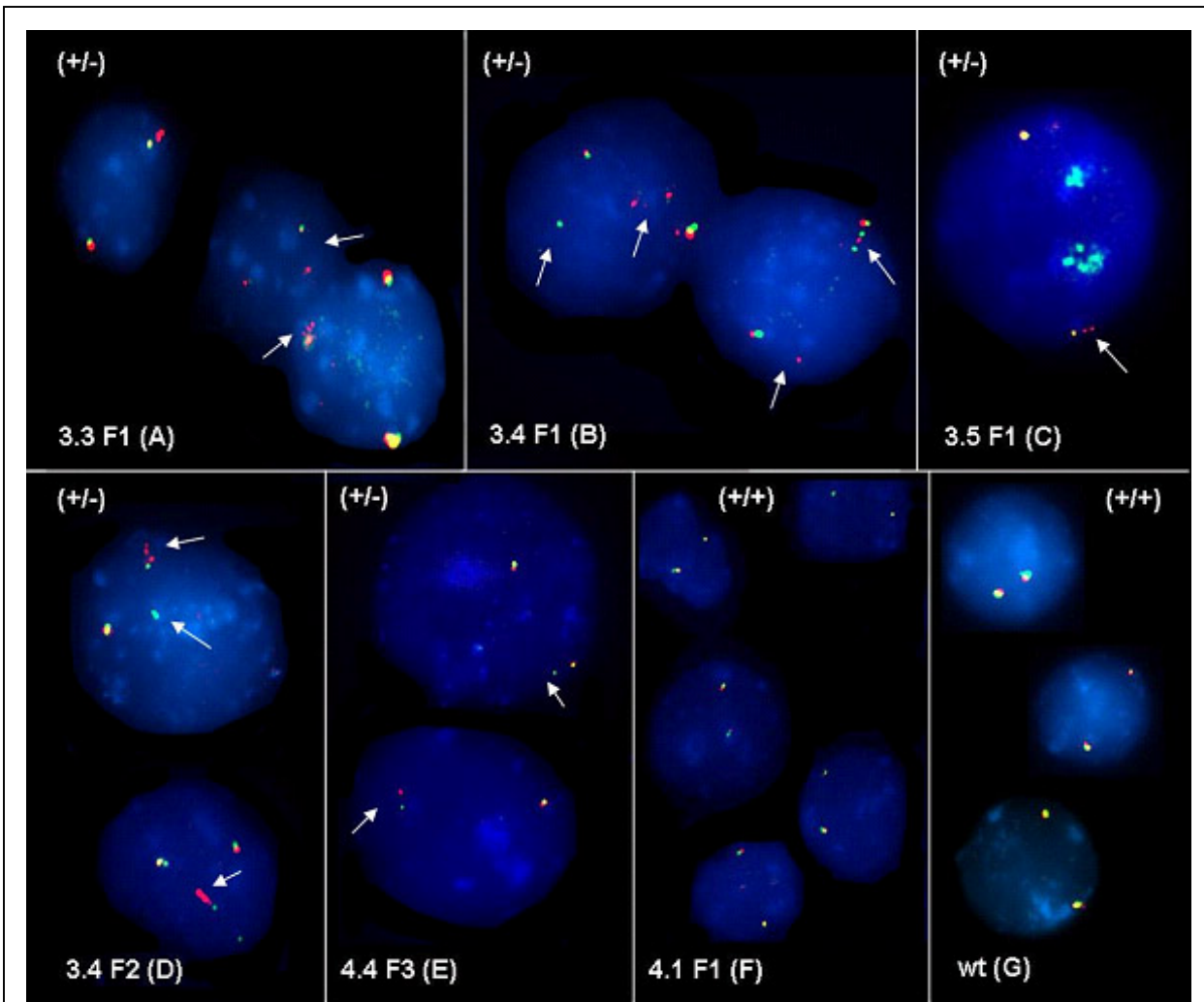


Abb.12 *Split-signal* FISH mit überlappenden BAC-Klonen von EBV-transformierten Lymphozyten aus Wildtyp und *BRCA2*-Mutationsträgern der Familien 1, 2 und 3. BAC-Klone wurden nach Standardmethoden markiert und hybridisiert. In allen *BRCA2*-Mutationsträgern ist eine Inversion, erkennbar durch ein getrenntes rot/grün Signal, detektierbar. Obwohl die BAC-Klone durch eine Inversion getrennt sind, scheinen die Bruchpunktbereiche zu variieren. Mutationsträger 3.3 F1 (A) zeigte eine Inversion vom Typ III, während Mutationsträger 3.3 F1 (B) eine Aberration vom Typ I als auch III zeigte. 3.5 F1 (C) wiederum zeigte eine Aberration vom Typ III. Mutationsträger 3.4 F2 (D) zeigte eine klare Typ III Aberration. In 4.4 F3 (E) konnte eine Veränderung des Typs I und II festgestellt werden. Wildtypen 4.1 F1 (F) und ein unabhängiger Wildtyp wt (G) zeigten keine Aberrationen in diesem Bereich. [F1:Familie 1, F2:Familie 2, F3: Familie 3; +/+ : *BRCA2*-Wildtyp, +/-: *BRCA2*-Mutationsträger]

Die Ergebnisse der FISH sind im Folgenden zusammengefasst (Abb.13). Wie gezeigt werden konnte, befindet sich ein invertierter Bereich in der Nähe der Marker *D9S267* und *D9S268* Marker. Die Interphasen-FISH konnte ebenso zeigen, dass der chromosomale Bereich des BAC-Klons 664D14 invertiert ist. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich eine weitere Inversion in der unmittelbaren Nähe des *D9S775* Marker befindet. Durch die FISH-Ergebnisse konnten nun die positiv identifizierten BAC-Klone ausgewählt werden und durch DNA-Filterhybridisierungen sollen nun die chromosomalen Bruchpunkte in den einzelnen *BRCA2*-Mutationsträgern identifiziert werden.

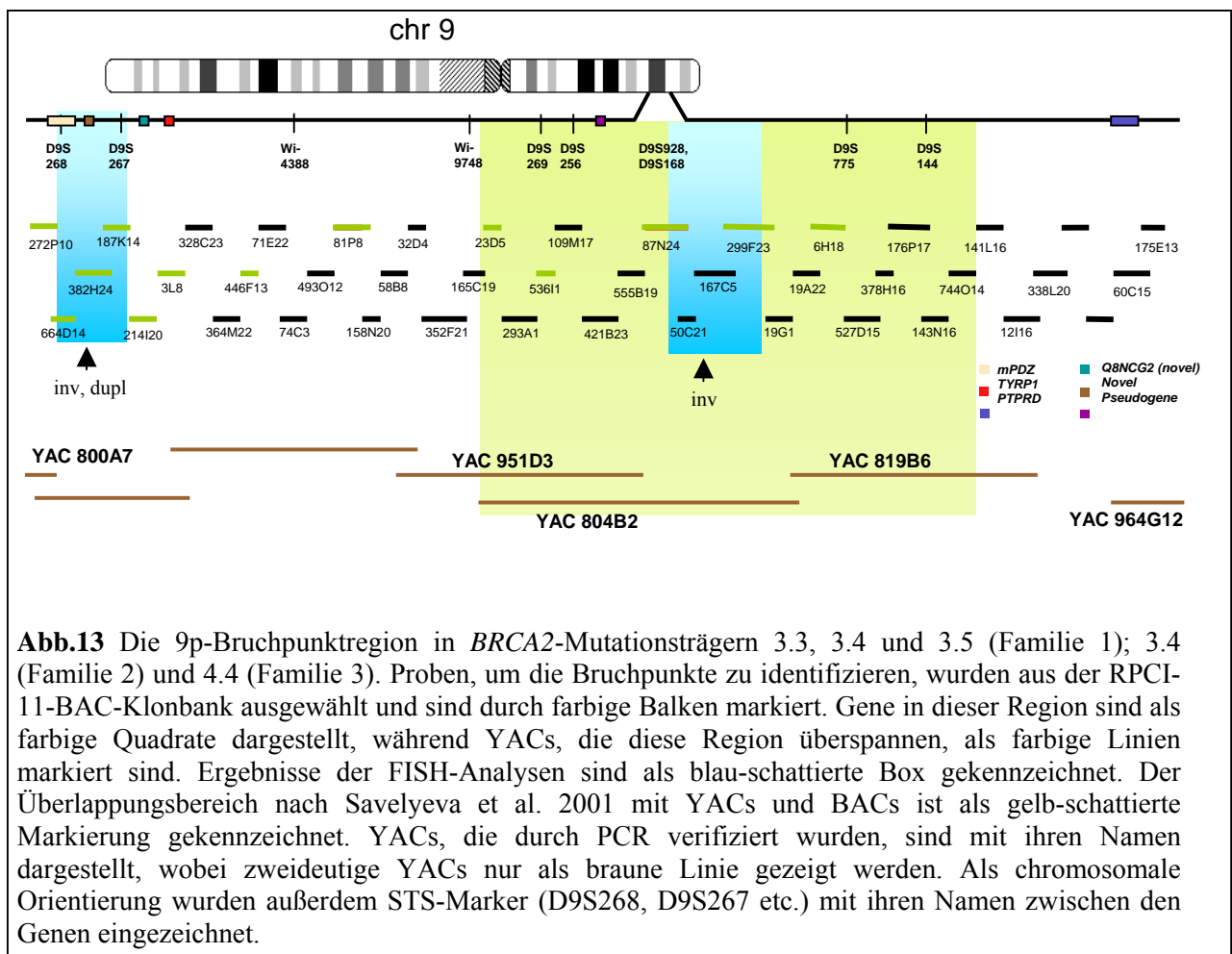


Abb.13 Die 9p-Bruchpunktregion in *BRCA2*-Mutationsträgern 3.3, 3.4 und 3.5 (Familie 1); 3.4 (Familie 2) und 4.4 (Familie 3). Proben, um die Bruchpunkte zu identifizieren, wurden aus der RPCI-11-BAC-Klonbank ausgewählt und sind durch farbige Balken markiert. Gene in dieser Region sind als farbige Quadrate dargestellt, während YACs, die diese Region überspannen, als farbige Linien markiert sind. Ergebnisse der FISH-Analysen sind als blau-schattierte Box gekennzeichnet. Der Überlappungsbereich nach Savelyeva et al. 2001 mit YACs und BACs ist als gelb-schattierte Markierung gekennzeichnet. YACs, die durch PCR verifiziert wurden, sind mit ihren Namen dargestellt, wobei zweideutige YACs nur als braune Linie gezeigt werden. Als chromosomale Orientierung wurden außerdem STS-Marker (*D9S268*, *D9S267* etc.) mit ihren Namen zwischen den Genen eingezeichnet.

3.4 Chromosomale Analyse mittels Southern-Hybridisierungen

Um die Ergebnisse der FISH detaillierter zu analysieren wurden Southern-Hybridisierungen durchgeführt. Als Hybridisierungsproben wurden entweder aus PCR amplifizierte *single-copy* DNA-Proben hergestellt oder es wurden *Expressed Sequence Tags* (ESTs) über das Ressourcenzentrum in Berlin bestellt. Mit Hilfe der HUSAR Programme *repmask*, *map* und *primer* konnten nun geeignete Proben ausgewählt werden (Abb.14). Durch die automatische Suche der Restriktionsschnittstellen mittels *map* konnten Enzyme so ausgewählt werden, dass durch 6 Enzyme eine gute Überlappung der DNA-Proben zur humanen genomischen Ziel-DNA erreicht werden konnte. Dies ist wichtig, da sonst eine viel größere Anzahl an Enzymen hätte verwendet werden müssen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der Verifizierung der bestellten Klone. Obwohl Einzelkolonien gepickt wurden, bestand die Gefahr, falsche Klone erhalten zu haben. Durch die PCR wurde die isolierte DNA nun auf Richtigkeit getestet. Ein anderer Vorteil ist die selektive Amplifizierung eines kurzen genomischen Bereiches (1-2.8 kb), der keine Wiederholungssequenzen (*repeat-elements*) enthält. Durch diese Methode konnten mit Hilfe von 6 Enzymen (z.B. *EcoRI*, *SacI*, *HindIII*, *PstI*, *BamHI* und *XbaI*) auf einem DNA-Filter mit 13-17 PCR-Proben ein BAC-Klon charakterisiert werden. Mittels der PFGE sollte der bereits in der FISH analysierte genomische Bereich weiter eingegrenzt werden. Hierzu wurden dieselben Proben benutzt, nur die DNA-Auftrennung befindet sich jetzt in einem Bereich von 100-1.000 kb. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der PFGE und der Southern-Hybridisierung aufgezeigt.

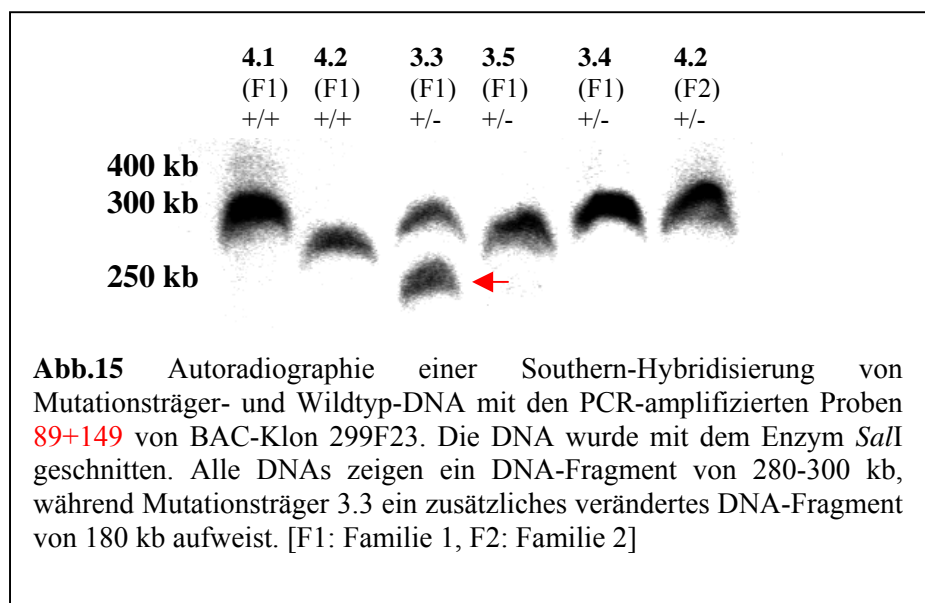
87801	CTGCCATTTT TGTTTTAAA TAGCCAGATA CCTACAGCAC TGTGAAGGA	88951	AGCATCCCA CCTAGACTGT GTTTAAACC TAAGGCCTCT GTGTGCGTT
87851	ACTGAAGATT TTTGGAGTGT CACTGAATAA ACGGAGCTCA CTTAATTGCC	89001	GGGCTGGGAT GAAGGAGATA GAGTAGGATC TAGTAAGAA GTACAGACTT
87901	TGAGATGTTA TGTAAAACCT CXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	89051	GCAGATTACC CATGAGAGGT CGAGAGTTAA ATAAGTACT ACGATGGAA
87951	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	89101	CAGAGTAATT GTCAAAAGCC AACACAATGT AAAGCCGGGG GTGGGAGGCA
88001	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	89151	ACCAACACCT TTGACTATTG GCAGTATTTT GTCAGCCGAT ACAGCAATCA
88051	XXXXXXXXXXXX GXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	89201	GGTTGTTCC CAGTTTTAAA ATGTCAGAT ACAGTETTTT TGAATGCATT
88101	GTTACATTTT ATCACTACAT TCCTTCCTTT AAAAAATCTT ATAGACACAG	89251	CAAAAAGATT CTTTTACAGA TGCCAAATAC CTGTTACAGA ATTTCTTTGT
88151	ACCAACAACT TAGTGGTTTC AATAGGAGGA CACTCATGCT ACTTAGATCA	89301	AAGATTCTAT TAGCACTTCT TCTTGTACCA AAGTTCCTCC TATTTTGGCT
88201	AAATGTTTTT TGCACATTC AAATGACTGT GCTCTCAAT TGGGTAGAT	89351	AACACGTATG GTATCTGAAA AGAGTTTTAG GAAAGCAAT GAATATTCA
88251	TTACATAGGA AGACCAGAGA CATTGAACCT GGTCTTTTAT ATCCCTCACT	89401	GATACAAAAA GTAAATATAT TTTAACTAC TTTAATAAT AAATACTTG
88301	AGCTTCCAAA TCCTAACCCT GCTCTCAGAT TATGAAAACA CATGCTTGG	89451	GCACCTCATAT GGGCACTGAC GAGGAAAAA TGCNNNNNNN NNNNNNNNN
88351	AAGGAATAGC TCAACTAGAG AGAGATAACC ACTTTCTATG GATCTCAGTA	89501	NNNNNGGAAA CATAGAAATCA CATGCTTTGT TAGATGCTCC GAACACGTT
88401	GACAAAATA AGCTTAGCCT GAARCAATG TTAATGAGGA TTTCAAAATC	89551	CCATTATAC TGTAAAGTG ATCAACTATT GCTGTGCTCA AAGTAAAGC
88451	ACAAGAGCAA AACGTTACAA TAGGGACCTG TGAGCTTACA CTTATGATTC	89601	AAGAACAAAT AAAGTAAAAA TTCTCCCGTT CACCTATTTA TGTTCACCTC
88501	TAAAGAGGAT AACAGCCTAA AECTTCCTAA GCAGGGAGAC ATCTACCTTA	89651	TTTCTCCAAA GTACTTCTAA AATAAATGAT AACACCCAAA TACCTACTCA

Abb.14: Amplifikation von spezifischen, genomischen Proben aus BAC-DNA mittels PCR am Beispiel der 299F23_89 Probe (s. Anhang für PCR-Primer). Primer wurden mit Hilfe der Programme *repmask*, *map* und *primer* ausgewählt und synthetisiert. Das berechnete Primerpaar ist Schwarz unterlegt (links: *forward*; rechts: *reverse*); der orange Kasten markiert einen *repeat*-Bereich, der durch das Programm *repmask* durch fortlaufende „NNNN“ markiert ist.

3.4.1 PCR-Proben detektieren aberrante DNA-Fragmente im Bereich *D9S775* und *D9S267* der *BRCA2*-Mutationsträger

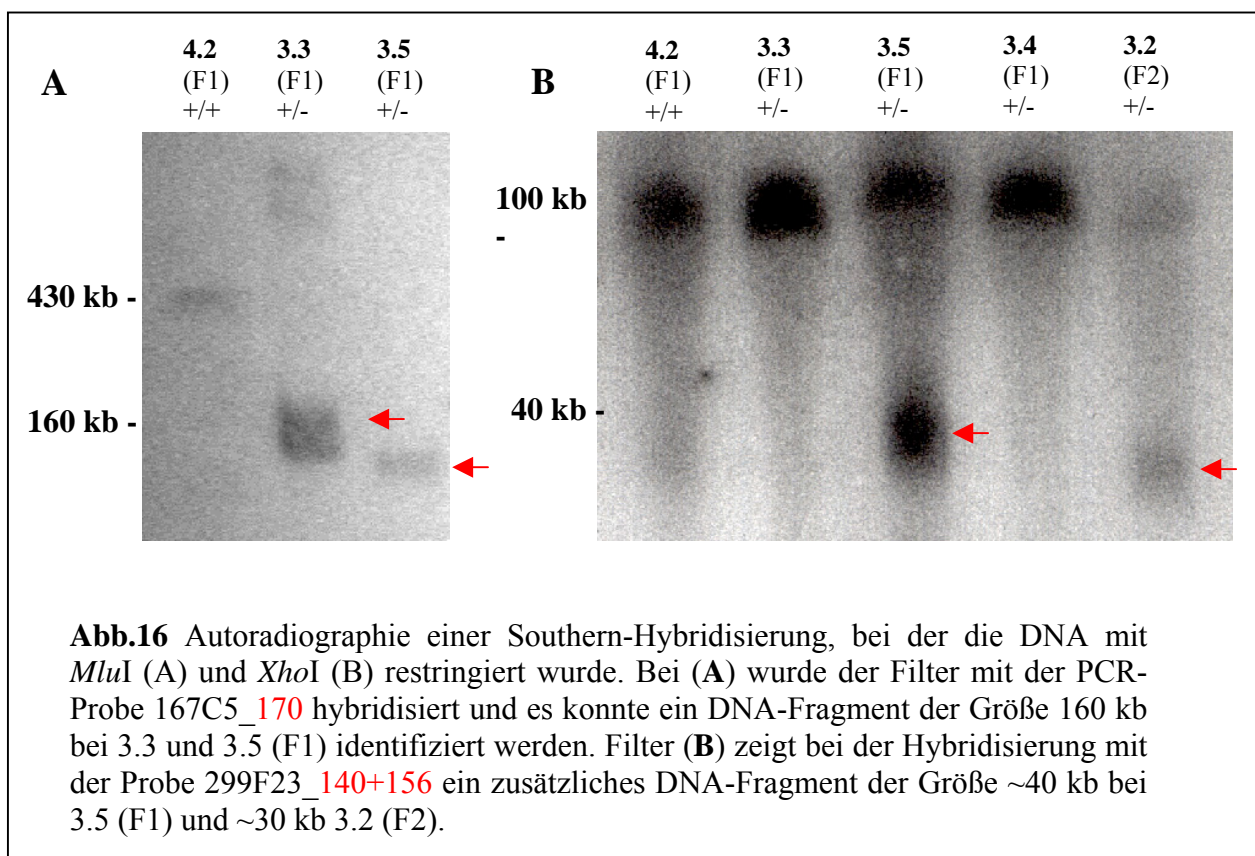
Durch die FISH und *split-signal* FISH konnten die Bruchpunktbereiche eingegrenzt werden. Für die PFGE wurde die hochmolekulare DNA mit Hilfe verschiedener Enzyme (*SalI*, *KspI*, *XhoI*) restringiert und in einem 1%igen Agarosegel in 0.5xTBE aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde die DNA durch einen Kapillartransfer (nach Southern) an eine N⁺-Membran gebunden.

Die Analysen der BAC-Klone innerhalb des identifizierten Bereichs konnten durch die Probe 299F23_89+149 auf einem *SalI*-Filter ein zusätzliches DNA-Fragment von 180 kb in Mutationsträger 3.3 detektieren. In den übrigen Mutationsträgern sowie Wildtypenträgern von *BRCA2* konnte nur ein Fragmentgröße von 280-300 kb nachgewiesen werden (Abb.15). Dies lässt auf eine neu entstandene Restriktionsschnittstelle schließen, die durch eine Inversion entstanden sein kann. Ein Rearrangement wird dadurch wahrscheinlicher, da Mutationsträger 3.3 und 3.5 in der Haplotypenanalyse die gleichen Chromosomen vererbt bekommen haben und somit identische chromosomale Merkmale zeigen müssen. Bei Patient 3.5 wird in diesem Bereich aber nur ein DNA-Fragment detektiert.



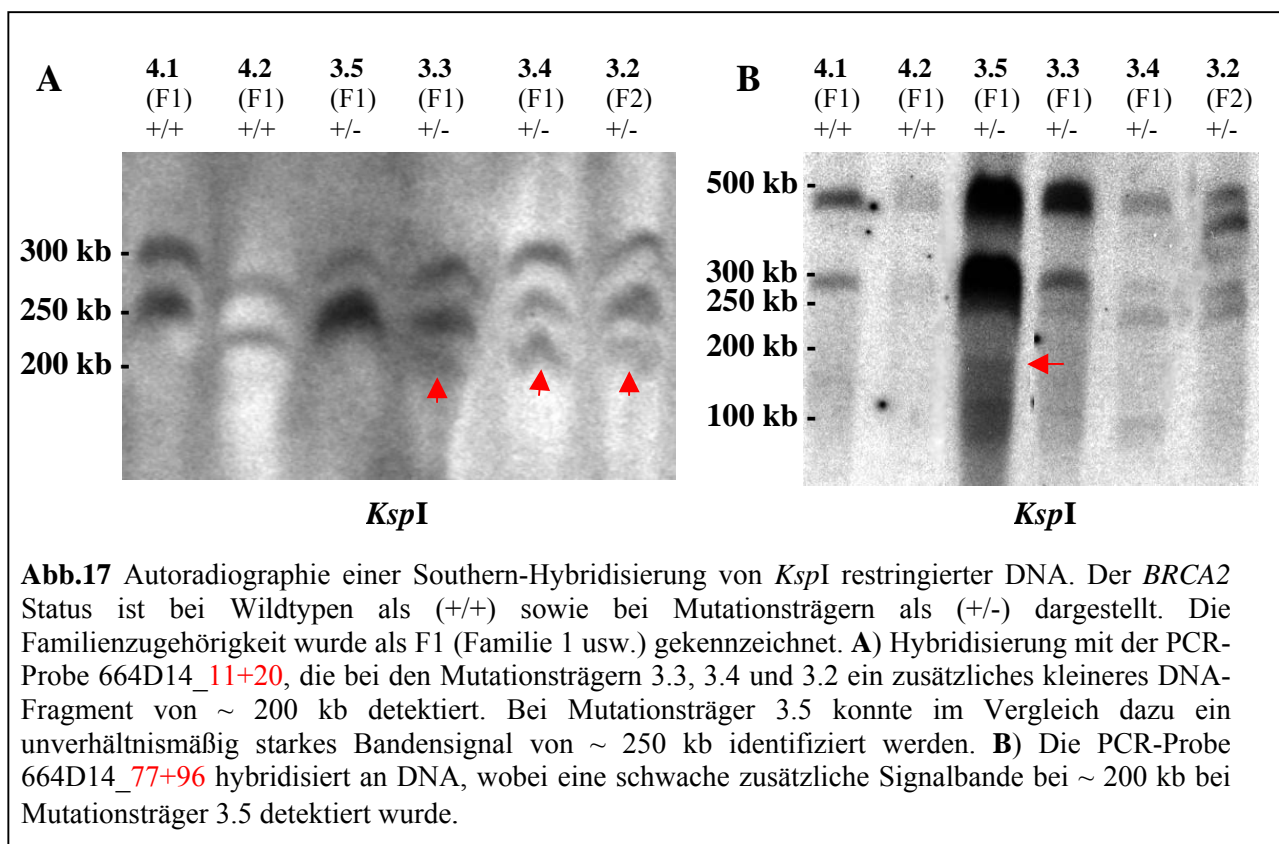
Da sich mit den BAC-Proben 299F23_89+149 ein zusätzliches Restriktionsfragment bei Mutationsträger 3.3 gezeigt hat, wurden nun benachbarte PCR-Proben und weitere DNA-Filter mit unterschiedlichen Enzymen analysiert. Durch eine Hybridisierung mit der 299F23 überlappenden PCR-Probe 167C5_170 (Abb.16A) konnte bei den Mutationsträgern 3.3 und 3.5 ein unterschiedliches DNA-Fragment von 160kb im Vergleich zum Wildtyp-Träger 4.2

(~ 430 kb) identifiziert werden. Um den Bruchpunktbereich auf dem BAC-Klon 299F23 genauer einzugrenzen, wurde eine Hybridisierung auf einem *XhoI* restringierten DNA-Filter mit den Proben 299F23_140+156 durchgeführt. Hierbei konnte bei den Mutationsträgern 3.5 (F1) und 3.2 (F2) ein zweites, kleineres DNA-Fragment (~ 40 kb und ~30 kb) detektiert werden (Abb.16B). Das unveränderte Restriktionsfragment der Mutationsträger als auch Wildtypen beträgt ~ 100 kb. Es konnte in dem Hybridisierungsexperiment aus Abb.16B kein verändertes DNA-Fragment für Mutationsträger 3.3 (F1) nachgewiesen werden. Da die beiden BAC-Klone überlappende chromosomale Sequenz enthalten, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Bruchpunkte für die Mutationsträger 3.3 und 3.5 (Brüder mit demselben Haplotyp) in diesem Bereich (proximal zu *D9S775*) unterscheiden. Mutationsträger 3.2 aus Familie 2 scheint einen Inversionsbruchpunkt in der unmittelbaren Nähe zu dem von Mutationsträger 3.5 zu besitzen, obgleich die detektierte Größe unterschiedlich ist.



Die Southern-Analyse im Bereich des STS-Markers *D9S267* sollte den Inversionsbruchpunktbereich in den Mutationsträgern identifizieren. Es konnten auf einem mit *KspI* restringierten DNA-Filter mit PCR-Proben aus BAC-Klon 664D14_11+20 bei den Mutationsträgern 3.3, 3.4 und 3.2 ein zusätzliches DNA-Fragment detektiert werden

(Abb.17A). Obwohl nach der genomischen Voranalyse durch das HUSAR-Programm *map* nur ein chromosomales Fragment hätte detektiert werden sollen, wurden bei allen DNAs zwei Fragmente detektiert (~ 300 kb und ~ 250 kb). Das kleinere Fragment der Mutationsträger konnte leicht schwächer detektiert werden, was in Einklang mit den aus Kapitel 3.3 gewonnenen Ergebnissen steht. Die nachfolgende Analyse mit den PCR-Proben 664D14_77+96 zeigte daraufhin, ebenfalls auf einem mit *KspI* restringierten DNA-Filter, dass zusätzliche Fragmente in den Mutationsträgern detektierbar sind. Hierbei befinden sich die Größenfragmente aber in einem kleineren Bereich von ~ 150 -100 kb (Abb.17B).

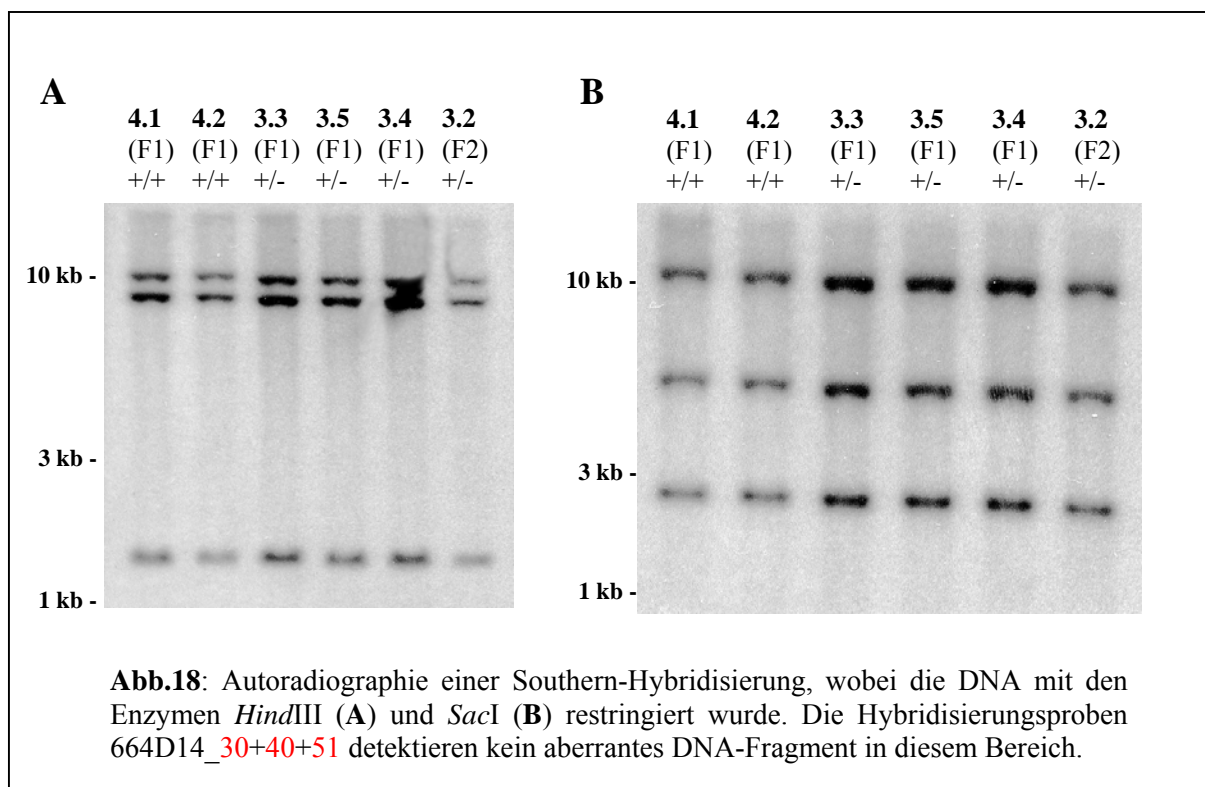


3.4.2 PCR-Proben detektieren Bruchpunkte im DNA-Bereich proximal *D9S775* und proximal *D9S267* in *BRCA2*-Mutationsträgern

Durch die PFGE-Analysen konnten die Inversionsbruchpunktbereiche bereits gut eingegrenzt werden, so dass mit Hilfe sogenannter *frequent-cutter* Enzyme wie *EcoRI*, *HindIII* etc. eine genauere Analyse in diesem Bereich möglich war. Hierzu wurden die gleichen PCR-Proben verwendet, die auch schon in der PGFE eingesetzt wurden. Durch Computer gestützte Analysen, wurden die verschiedenen humanen genomischen DNAs nun mit solchen Enzymen restringiert, die eine möglichst gute Probenüberlappung zuließen. Ein wesentlicher Teil der

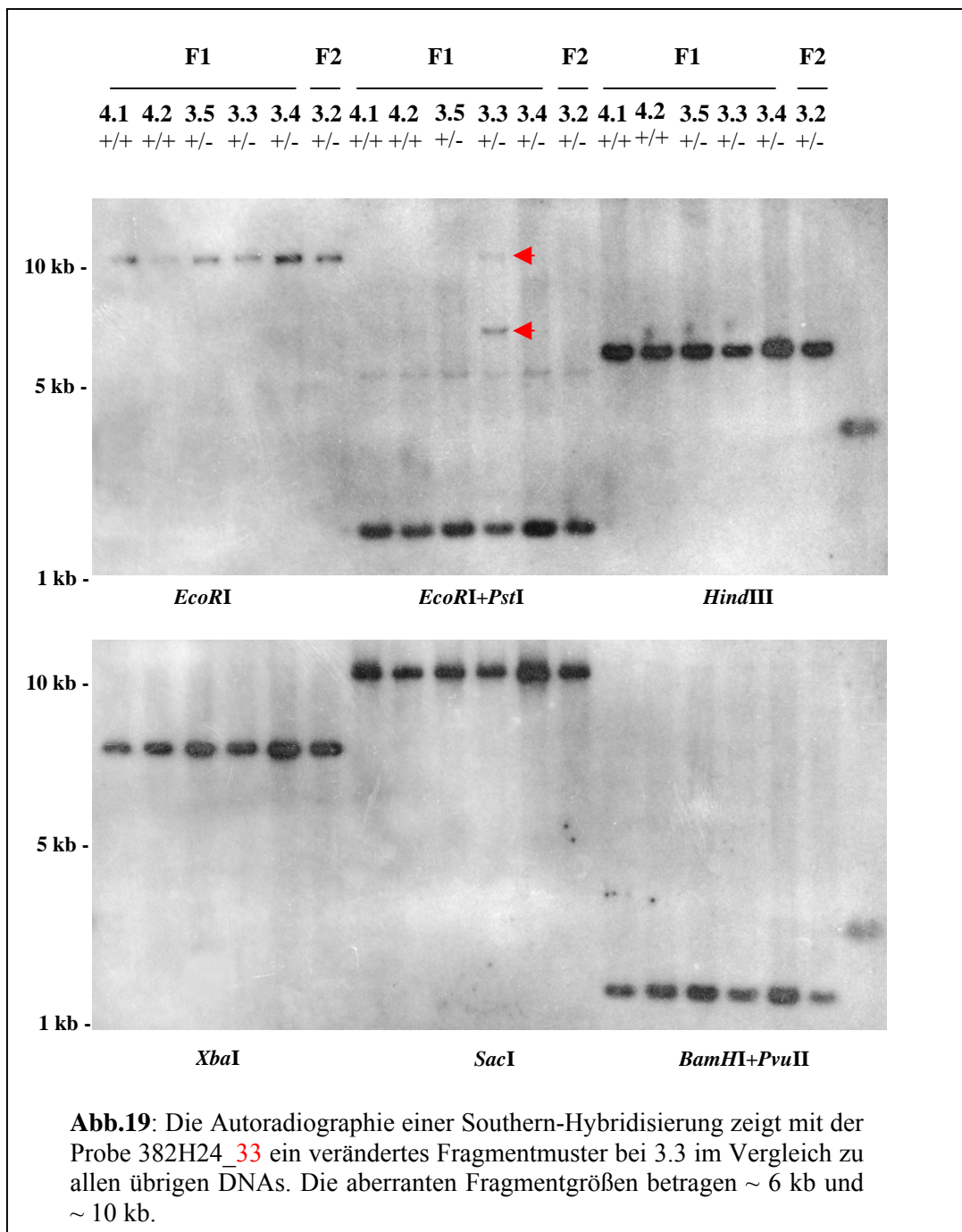
Auswahl der PCR-Proben bestand darin, keine *repeat*-Sequenzen und möglichst weit voneinander entfernte Proben einzusetzen, ohne den Überlappungsbereich der DNA-Fragmente zu verlassen. Durch die Auswahl der Enzyme *EcoRI* und *HindIII* wurde die DNA so restringiert, dass Fragmente im Bereich von 4-18 kb entstanden. Die Enzyme *XbaI* und *PstI* restringierten die humane DNA so, dass in einem Bereich von 2-12 kb Fragmente entstanden. Die Enzyme *XhoI* und *BamHI* wurden nur für sehr große Auftrennungen oder in einer Doppelrestriktion benutzt, da die Größenbereiche doch stark unterschiedlich von 3-100 kb schwanken.

Die Proben um den Bereich des STS-Markers *D9S267* wurden auf DNA-Filter hybridisiert (Abb.18 A, B). Dargestellt sind die Restriktionen für *HindIII* und *SacI* mit den Proben 664D14_30+40+51. Wie deutlich zu erkennen ist, befinden sich alle drei DNA-Fragmente auf gleicher Höhe, was auf keine Veränderung in diesem ~ 30 kb großen Bereich hindeutet. Zusätzliche Proben aus diesem BAC-Klon konnten keine rearrangierten Fragmente in diesen Mutationsträgern detektieren. Eine Liste aller getesteten Proben befindet sich im Anhang dieser Arbeit.



Durch die Auswahl von Proben aus benachbarten BAC-Klonen 82H24_83+90+109+133 sollte der Bruchpunktbereich identifiziert werden. Es konnten durch diese Proben keine eindeutigen aberranten DNA-Fragmente detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Durch eine Hybridisierung mit der Probe 382H24_33 auf einen weiteren DNA-Filter konnte ein verändertes DNA-Fragmentmuster bei Mutationsträger 3.3 (F1) detektiert werden (Abb.19). Hierbei wurde bei einer *PstI* Restriktion Fragmentgrößen von ~ 10 kb und ~ 6 kb identifiziert. Die Bande von ~ 5 kb Größe kann auf eine partielle DNA-Restriktion zurückgeführt werden, wobei die beiden zusätzlichen Fragmente bei 3.3 nur schwer durch einen partiellen Verdau erklärbar sind. Durch eine benachbarte Probe (187K14_21+30+39) wurde erneut hybridisiert, woraufhin keine partiell restringierte DNA detektiert werden konnte.



Als zweiter Bereich des Inversionsbruchpunkts kam die Region innerhalb des *D9S1701* in Betracht, da dieser bereits in der *split-signal* FISH ein invertiertes Signalmuster erkennen ließ. Hierzu wurden die Proben 3L8_15+26+39 auf einen Filter hybridisiert und kein verändertes Signalmuster detektiert (Abb.20). Bei Mutationsträger 3.5 wurde ein schwaches Signal von ~ 11 kb identifiziert, dass sich jedoch bei weiteren Analysen nicht reproduzieren ließ. Weitere PCR-amplifizierte Proben aus dem BAC-Klon 3L8, detektierten keine veränderten DNA-Fragmente in diesem Bereich.

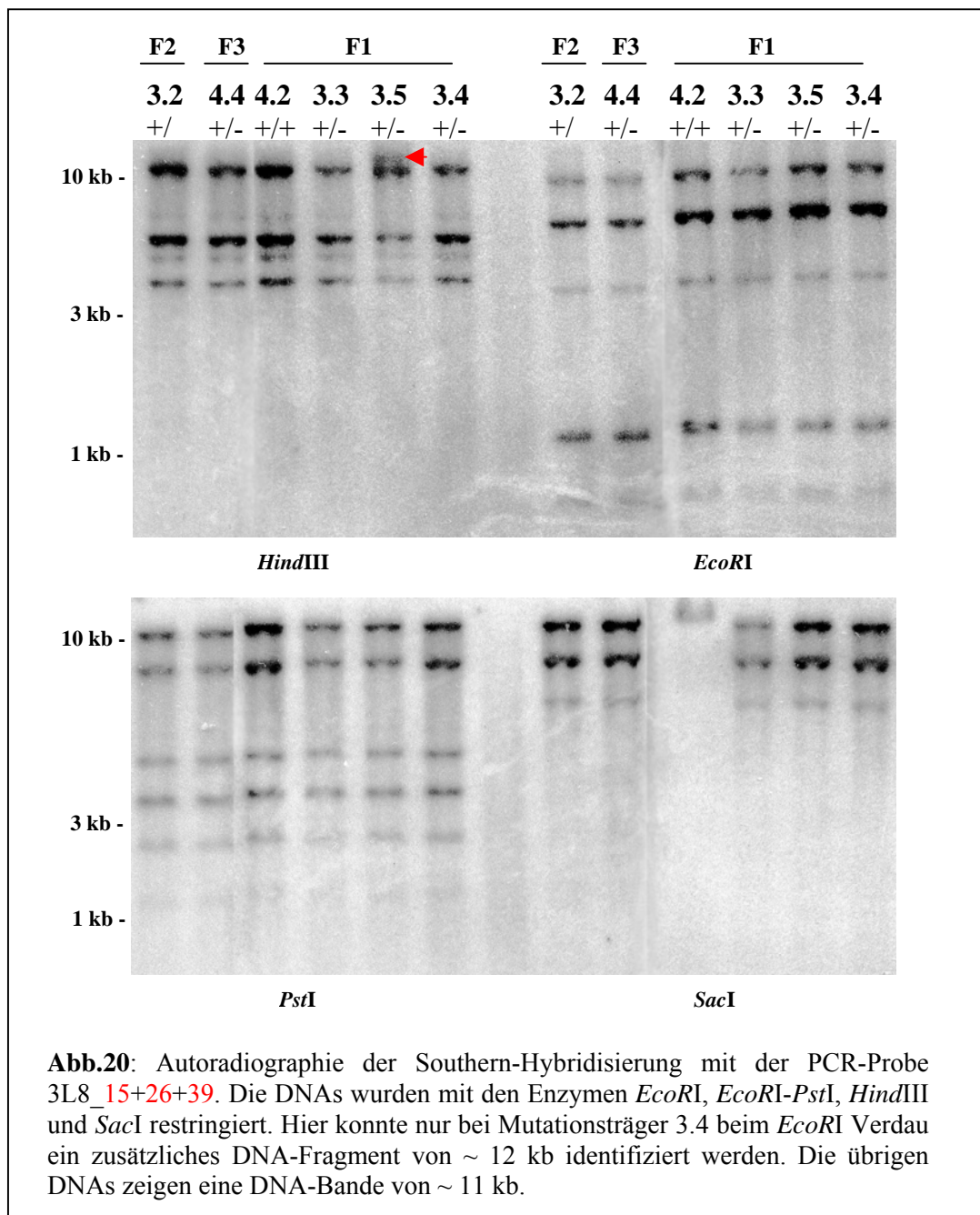
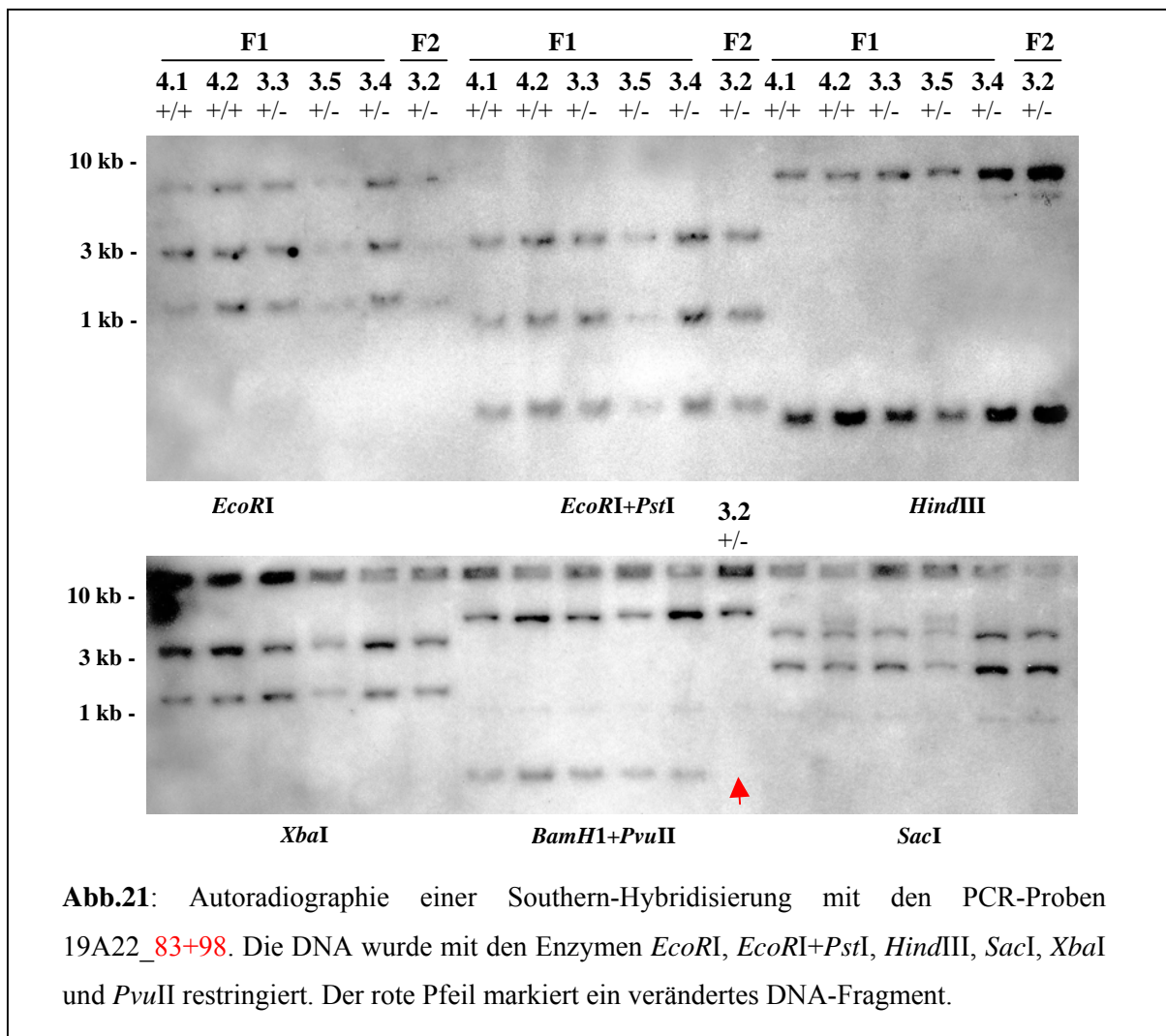


Abb.20: Autoradiographie der Southern-Hybridisierung mit der PCR-Probe 3L8_15+26+39. Die DNAs wurden mit den Enzymen *EcoRI*, *EcoRI-PstI*, *HindIII* und *SacI* restringiert. Hier konnte nur bei Mutationsträger 3.4 beim *EcoRI* Verdau ein zusätzliches DNA-Fragment von ~ 12 kb identifiziert werden. Die übrigen DNAs zeigen eine DNA-Bande von ~ 11 kb.

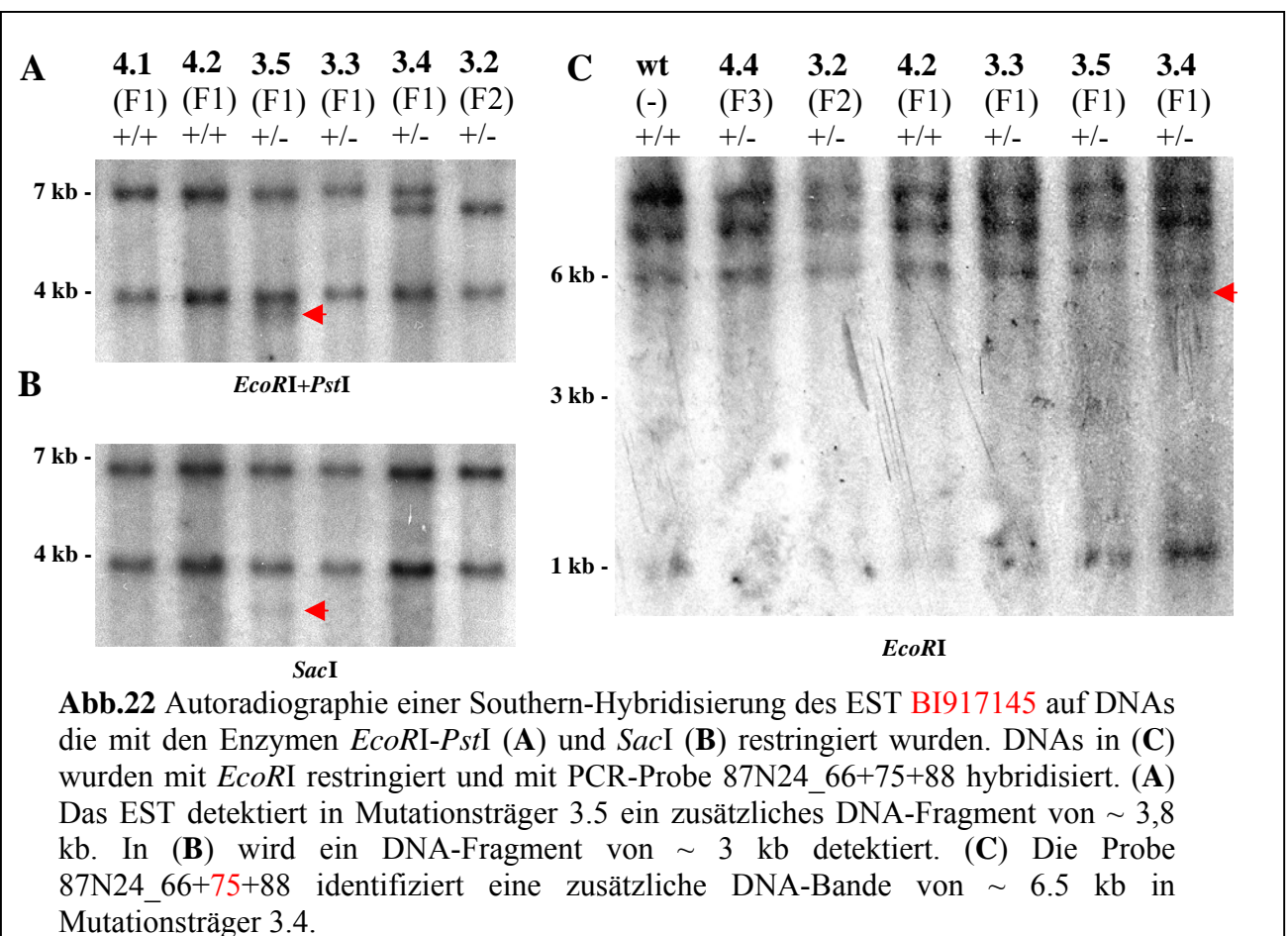
Der Bereich des zweiten chromosomalen Bruchpunkts wurde bereits durch die PFGE um den BAC-Klon 299F23 und 167C5 bestimmt. Dargestellt sind die Proben 19A22_83+98 (Abb.21), die kein zusätzliches DNA-Fragment in Mutationsträgern detektieren konnten. Nur Mutationsträger 3.2 (F2) ließ ein Fehlen eines DNA-Fragments erkennen, was auf einen deletierten Chromosomenbereich hinweisen könnte.



Weitere Analysen mit Proben aus diesen BAC-Klonen ergaben keine weiteren Hinweise auf potentielle Bruchpunkte, so dass der potentielle Bruchpunktbereich weiter ausgedehnt wurde.

Für den Bereich mit den BAC-Klonen 3L8, 299F23 und 167C5 stand ebenfalls ein EST (BI917145, *Homo sapiens*, Ähnlichkeit zur Protein Tyrosin Phosphatase, Rezeptor Typ D, Klon IMAGE:5247444, mRNA) zur Verfügung, der mittels Sequenzanalyse durch Dr. An getestet wurde. Hierbei wurde nach Sequenzierung der DNA ein BlastN2 Suchvorgang in

öffentlichen Datenbanken durchgeführt, um Anhaltspunkte zu erlangen, welche chromosomale Region mit diesem EST abgedeckt wird. Die Analyse ergab bei drei BAC-Klonen einen Homologiebereich von 304 Basenpaaren (87N24: Position 135814bp – 135509bp), 107 Basenpaaren (19A22: 66464bp – 66358bp) und 74 Basenpaaren (19G1: 23960bp – 23901bp). Die Hybridisierung detektierte bei Mutationsträger 3.5 mit einer Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* + *PstI* ein zusätzliches Signal von ~ 3.5 kb, welches kleiner als das Wildtyp-Fragment von ~ 4 kb ist (Abb.22A). Auf demselben Filter konnte mit einer Restriktion des Enzyms *SacI* auch ein zusätzliches DNA-Fragment detektiert werden (Abb.22B). Da 3.3 und 3.5 denselben Haplotyp besitzen und da bei 3.3, wie auch bei den anderen DNAs, kein solches DNA-Fragment detektiert werden konnte, wird durch diesen EST eine rearrangierte chromosomale Region detektiert. Durch die Auswahl von Proben aus dem BAC-Klon 87N24_66+75+88 proximal zu 167C5 konnte ein zusätzliches DNA-Fragment in Mutationsträger 3.4 (F1) identifiziert werden (Abb.22C). Hierbei kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass kein Polymorphismus vorliegt, da eine PCR-Analyse in diesem Bereich kein DNA-Fragment mit polymorpher Restriktionsschnittstelle detektieren konnte.



3.5 Bioinformatische Analyse der genomischen Sequenz im Bereich der chromosomalen Bruchpunkte

Durch bioinformatische Methoden konnten die Sequenzen um die eingesetzten PCR-Proben näher untersucht werden. Wie bereits aus Kapitel 3.4 erkennbar wurde, konnten durch Hybridisierungen nicht alle Bruchpunktbereiche der Mutationsträger identifiziert werden. Da aber durch den Einsatz dieser BAC-PCR-Proben die Sequenz der humanen DNA bekannt war, konnte im Anschluß an die Southern-Hybridisierungsanalysen eine bioinformatische Analyse angeschlossen werden. Hierbei wurde versucht, die chromosomalen Lücken, also die genomischen Bereiche, die nicht durch PCR-Proben abgedeckt werden konnten, auf bestimmte Sequenzfolgen zu untersuchen. Da durch das Humangenomprojekt zum Ende dieser Arbeit die komplette Sequenz zur Verfügung stand, konnten detaillierte Sequenzinformationen zu den „chromosomalen Lücken“ ermittelt werden. Diese „chromosomalen Lücken“ stellen dabei große *repeat-cluster* (Sequenzwiederholungsbereiche) dar, die natürlich durch die Vorgehensweise der PCR-Amplifikation ausgeschlossen wurden. Im Folgenden sollen diese *repeat-cluster* mit den erbrachten FISH und Autoradiographie-Ergebnissen zusammengeführt werden. Hierbei wurden hauptsächlich das HUSAR-Programm *repmask* und öffentliche Datenbanken (Sanger Institut, NCBI) benutzt. Um die chromosomale Topografie zu verdeutlichen, wurden hierzu Bilder aus Datenbanken angefertigt (Abb.23).

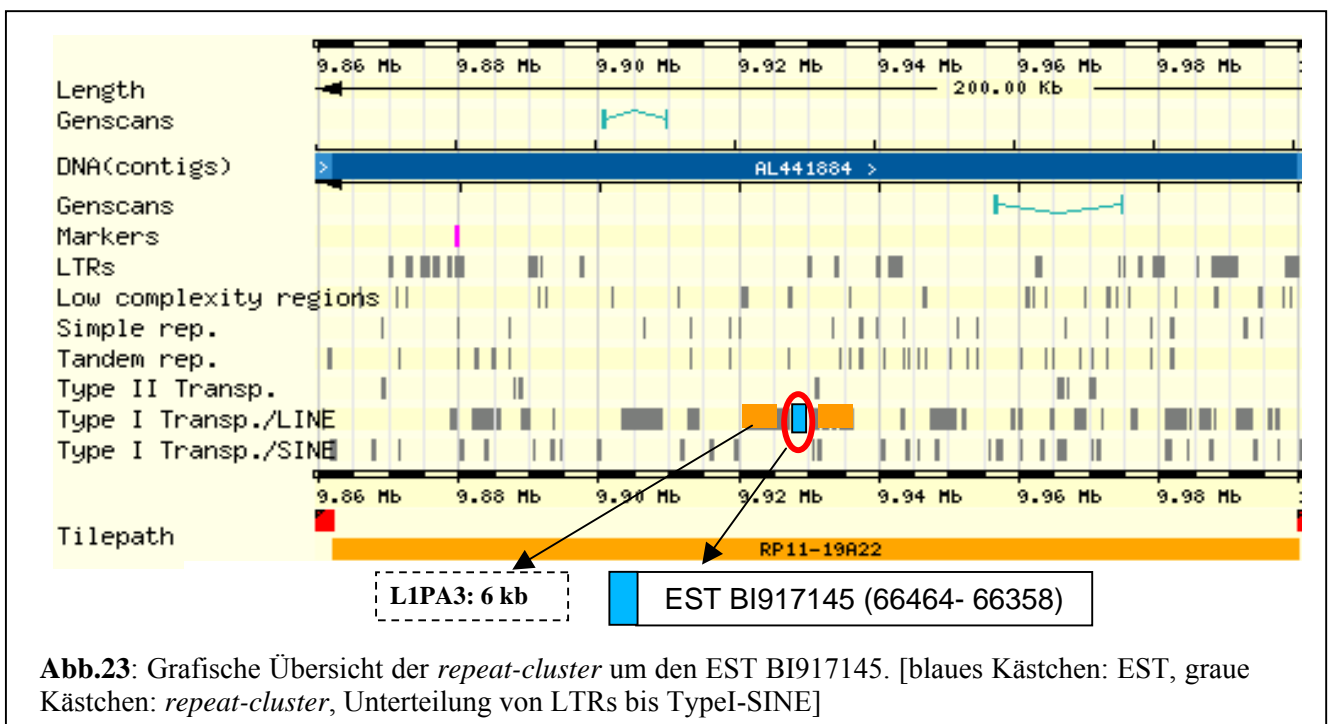
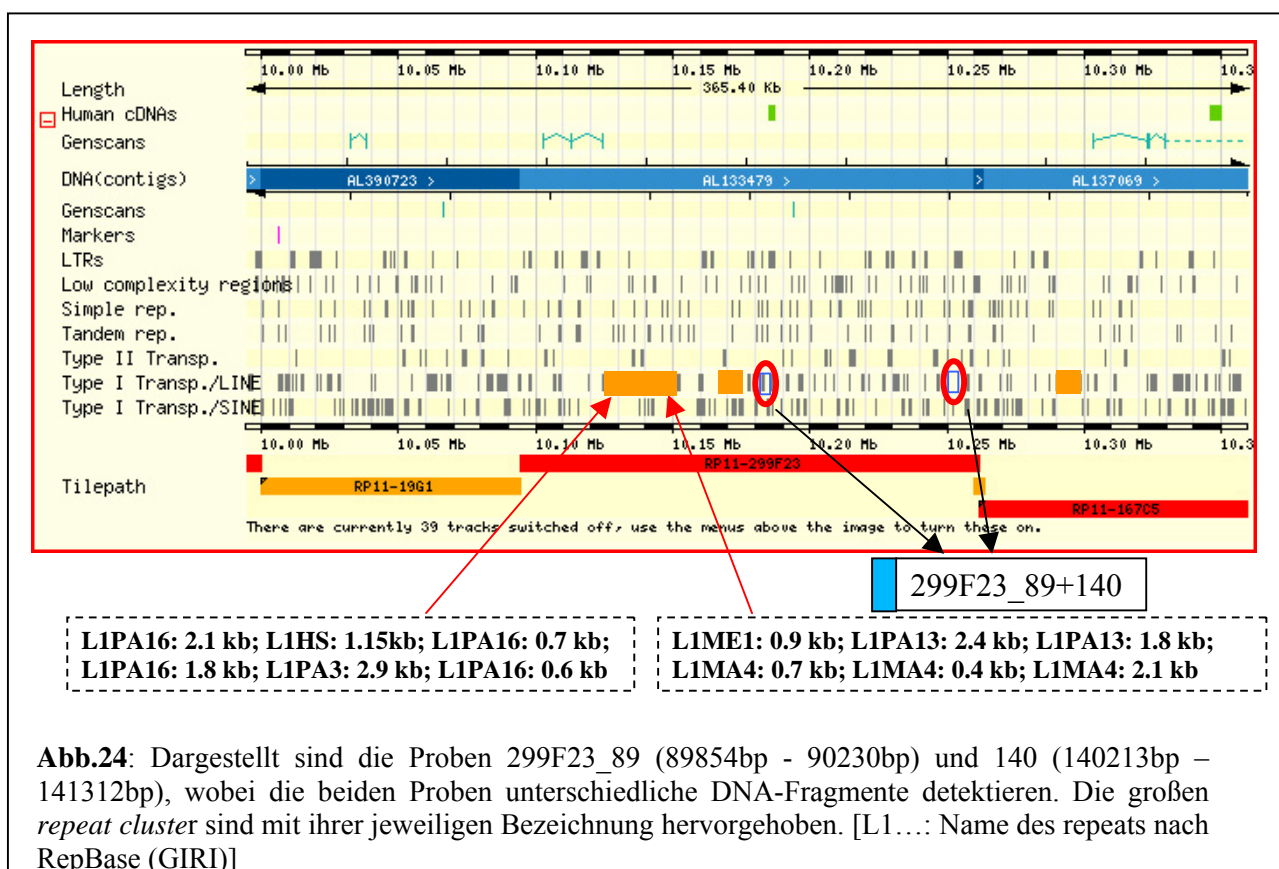


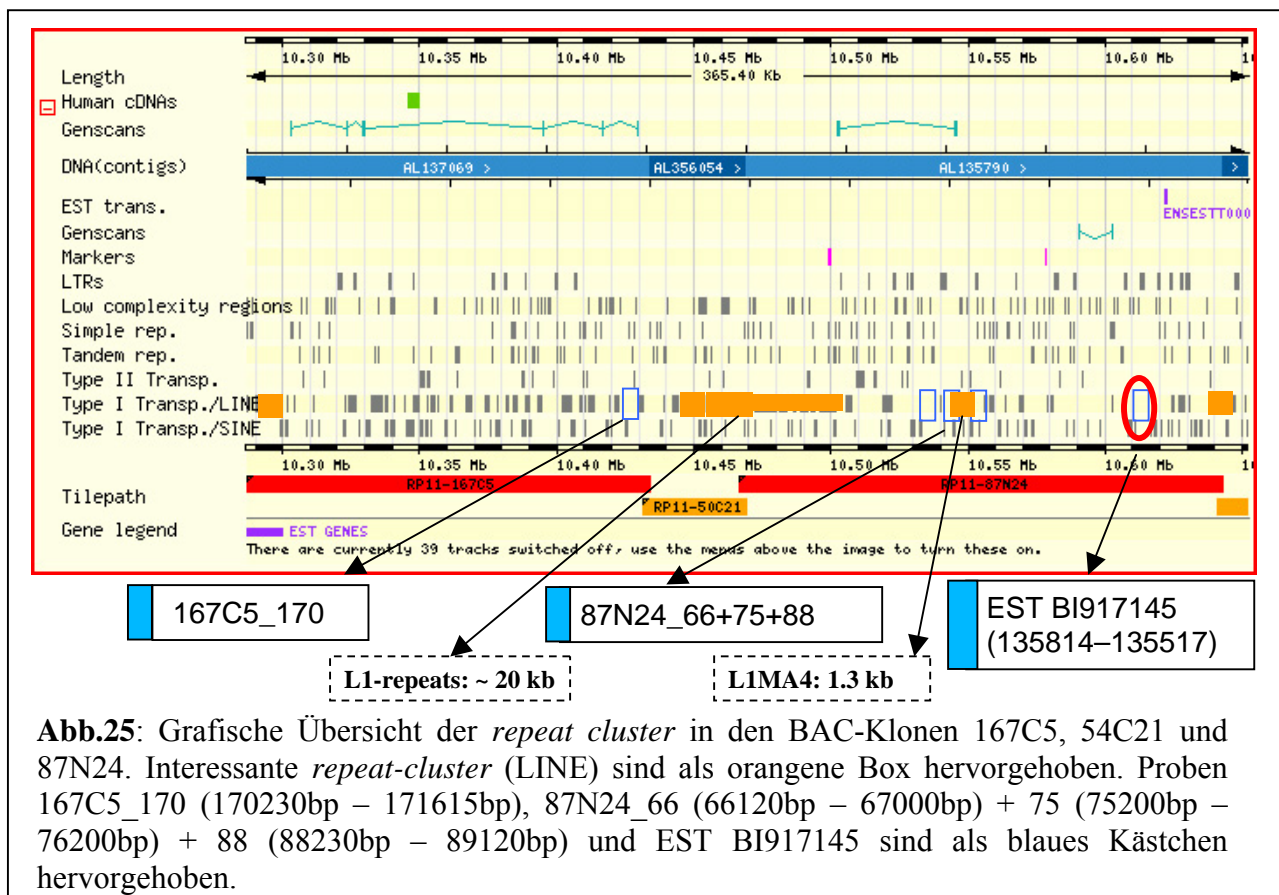
Abb.23: Grafische Übersicht der *repeat-cluster* um den EST BI917145. [blaues Kästchen: EST, graue Kästchen: *repeat-cluster*, Unterteilung von LTRs bis TypeI-SINE]

Durch die Analyse des chromosomalen Bereiches, der durch das EST BI917145 (19A22) hybridisiert (vgl. Abb.22), konnte ein großes *repeat-cluster* identifiziert werden (Abb.23). Hierbei liegt der homologe Bereich des ESTs direkt zwischen Typ I Transposons/LINE *repeats*. Die in Abb.22 zusätzlich detektierten Banden weisen daraufhin, dass der Inversionsbruchpunkt von Mutationsträger 3.5 (F1) zwischen einem *repeat-cluster* lokalisiert.

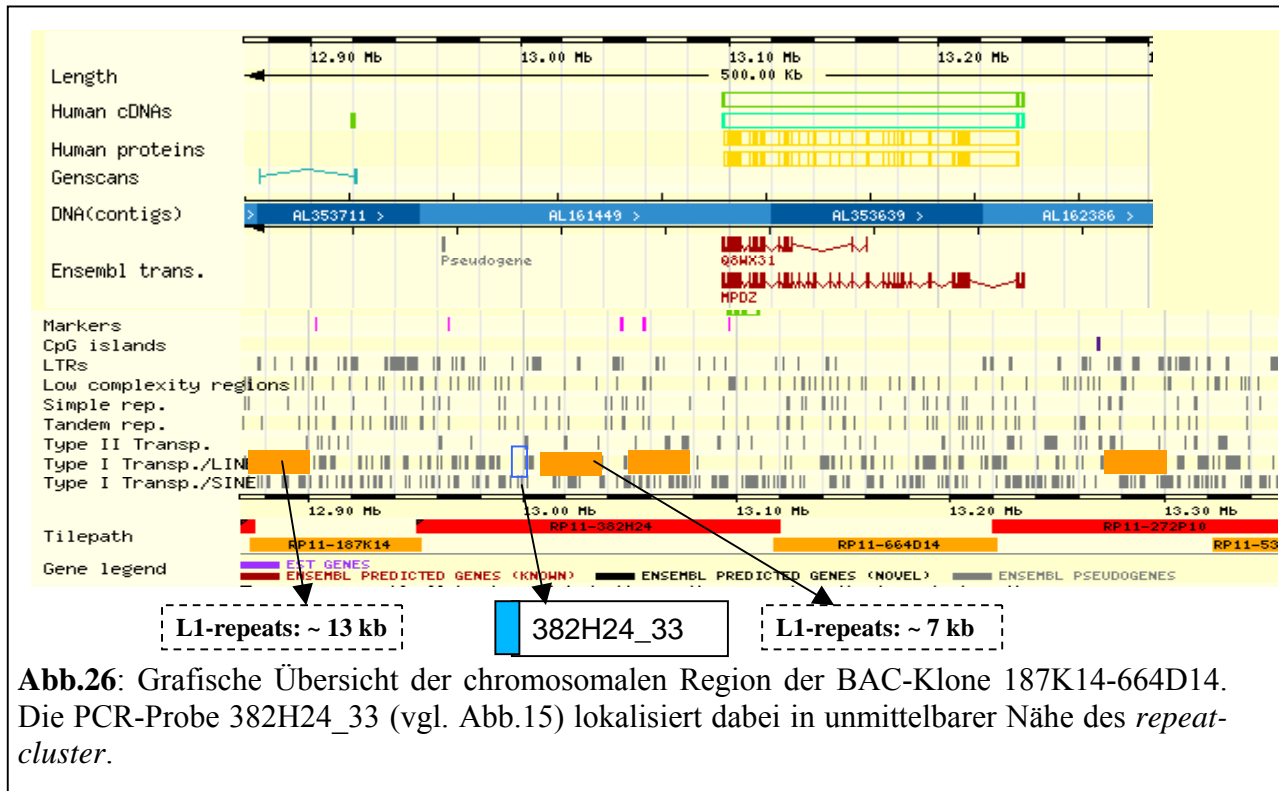
Für die DNA-Fragmente, die in der Southern-Analyse identifiziert wurden, wurden die benachbarten *repeat-cluster* der BAC-Klone 299F23 und 167C5 grafisch markiert (Abb.24, orange unterlegt) sowie deren genaue Bezeichnung ermittelt. Da PCR-Probe 299F23_89+149 in der PFGE ein aberrantes DNA-Fragment erkannt hat (Abb.15), wurde die unmittelbare Region mittels *frequent-cutter* Enzymen und weiterer PCR-Proben auf Bruchpunkte untersucht. Die Southern-Analyse konnte innerhalb der durch die Fragmentgrößen begrenzten Region keinen Bruchpunkt für 3.3 detektieren. Die unmittelbare Region dieser Probe ist durch ein *repeat-cluster* besetzt, was durch vorhandene PCR-Proben nicht weiter untersucht werden konnte, da Restriktionsschnittstellen für vorhandene PCR-Proben direkt zu Beginn dieses *repeat-Bereiches* lokalisieren.



Die Probe 167C5_170 des an 299F23 angrenzenden BAC-Klons, detektierte in der PFGE-Hybridisierung ein verändertes Fragmentmuster für die Mutationsträger 3.3. und 3.5 (vgl. Abb.16A). Die bioinformatische Analyse nach Abschätzung der Fragmentgröße ergab ebenfalls, dass der Bruchpunkt in einem repeat-cluster liegen könnte (Abb.25). Dieser Umstand wird weiterhin dadurch bestätigt, dass die Hybridisierung mit der Probe 299F23_140+156 ein zusätzliches DNA-Fragment von 40 kb (Mutationsträger 3.5) bzw. 30 kb (Mutationsträger 3.2) aufweist (vgl. Abb. 16B).



Der zweite Bruchpunktbereich wurde durch Ergebnisse der FISH und PFGE bereits eingegrenzt, konnte aber durch weitere Southern-Analysen mit Enzymen wie *EcoRI*, *HindIII* etc. nur bei Mutationsträger 3.3 ein verändertes DNA-Fragment detektieren (vgl. Abb.19). Eine Sequenzanalyse in diesem chromosomalen Bereich (187K14-664D14) ergab, dass auch hier *repeat-cluster* lokalisieren. Da die PCR-Probe 382H24_33 ebenfalls innerhalb dieses Clusters liegt (Abb.26) und die *split-signal* FISH eine Inversion detektierte, die wiederum durch eine PFGE-Analyse bestätigt wurde, erhält diese Hypothese an Gewicht.



Eine detaillierte Analyse der *repeats* ergab dabei ein zusammenhängendes *repeat-cluster* von 13 kb und 7 kb. Wie in Abb. 26 zu erkennen ist befindet sich das Gen *mPDZ* und *Q8WX31*, vermutlich eine Spleißvariante des kompletten *mPDZ*-Gens, innerhalb dieses *repeat-clusters*.

3.6 Das *mPDZ* und *TYRPI* Gen innerhalb der Inversion in *BRCA2*-Mutationsträgern

Das *mPDZ*-Gen, welches auf dem invertierten Chromosombereich zwischen *D9S267* und *D9S1808* liegt, ist durch die Interphasen-FISH und PFGE-Analysen als betroffenes Gen innerhalb der Inversion identifiziert worden. Das Gen gehört zur humanen Familie von bekannten *mPDZ*-Genen die in Abb.27 dargestellt sind. Hierbei besteht eine Homologie zu dem INAD-ähnlichen Gen auf Chromosom 1. Das *mPDZ*-Gen besteht aus einer 6.5kb großen cDNA, deren Exon-Bereich sich über 163,86kb der BAC Klone 387H24 bis 272P10 erstreckt (Abb.29). Das Protein enthält die Protein-Domänen PDZ und L27 (Abb.28), wobei PDZ-Domänen in verschiedenen Signal-Proteinen in Bakterien, Hefen, Insekten und Vertebraten gefunden wurden (Ponting 1997; Ponting, Phillips et al. 1997). In Genen können PDZ-Domänen einzeln oder in mehrfacher Kopienzahl auftreten, wobei sie fast immer in

cytoplasmatischen Proteinen gefunden werden (Ponting 1997). PDZ-Domänen-Proteine sind oft mit der Plasmamembran assoziiert, in der hohe Konzentrationen von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) gefunden werden. Eine direkte Interaktion zwischen PIP₂- und PDZ-Domänen (Syntenin, CASK, Tiam-1) konnte bereits gezeigt werden (Zimmermann, Meerschaert et al. 2002). Die PDZ-Domänen bestehen aus 80-90 Aminosäuren die zusammenfassend aus sechs Beta-Strängen (betaA und betaF) und zwei Alpha-Helices, A und B in einer globulären Struktur zusammengefasst werden.

Das *mPDZ*-Gen, welches zwischen den STS-Markern *D9S267* und *D9S1808* liegt, lokalisiert in einem chromosomalen Bereich, in dem durch die Interphasen-FISH und PFGE-Analysen Veränderungen nachgewiesen wurden.

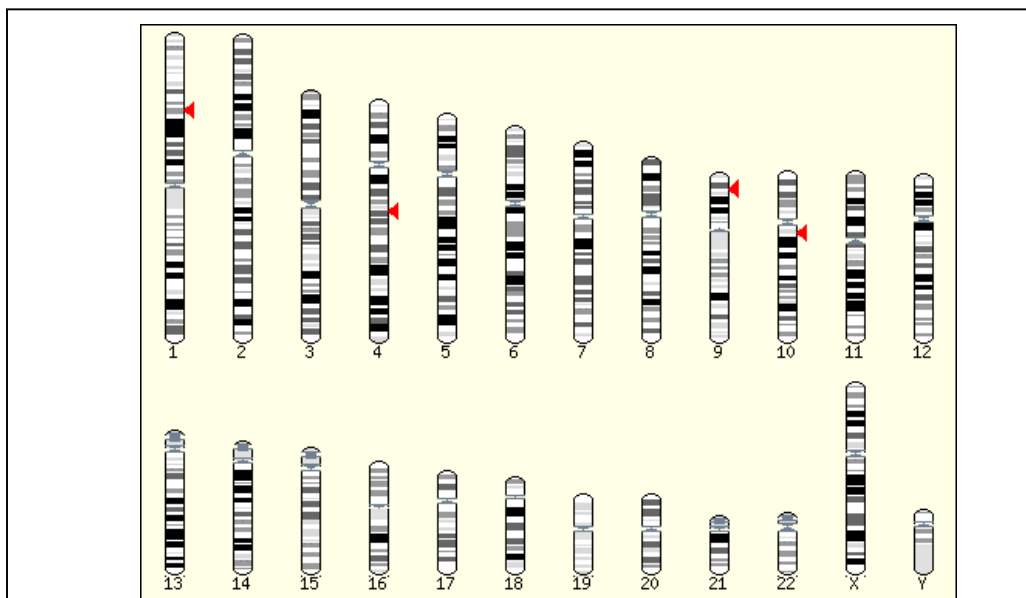


Abb.27: Familie der *mPDZ*-Gene im humanen Genom. Bei Chromosom 1 handelt es sich um das INAD-ähnliche Gen Isoform 3 (Acc: NM_005799); PDZ-Domäne-Protein (Drosophila INAD-ähnlich). Auf Chromosom 9 ist das multiple-PDZ-Domäne-Protein bekannt (Acc: NM_003829). Auf Chromosom 4 und 10 standen keine weiteren Informationen zur Verfügung.

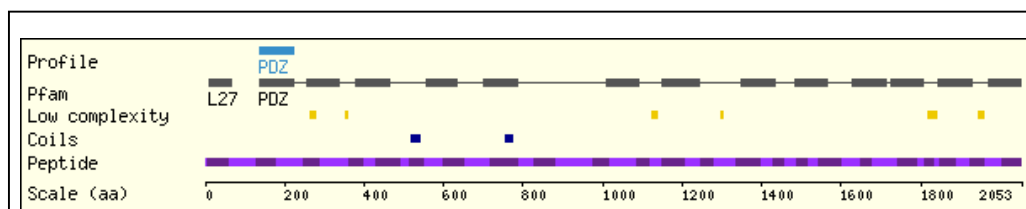
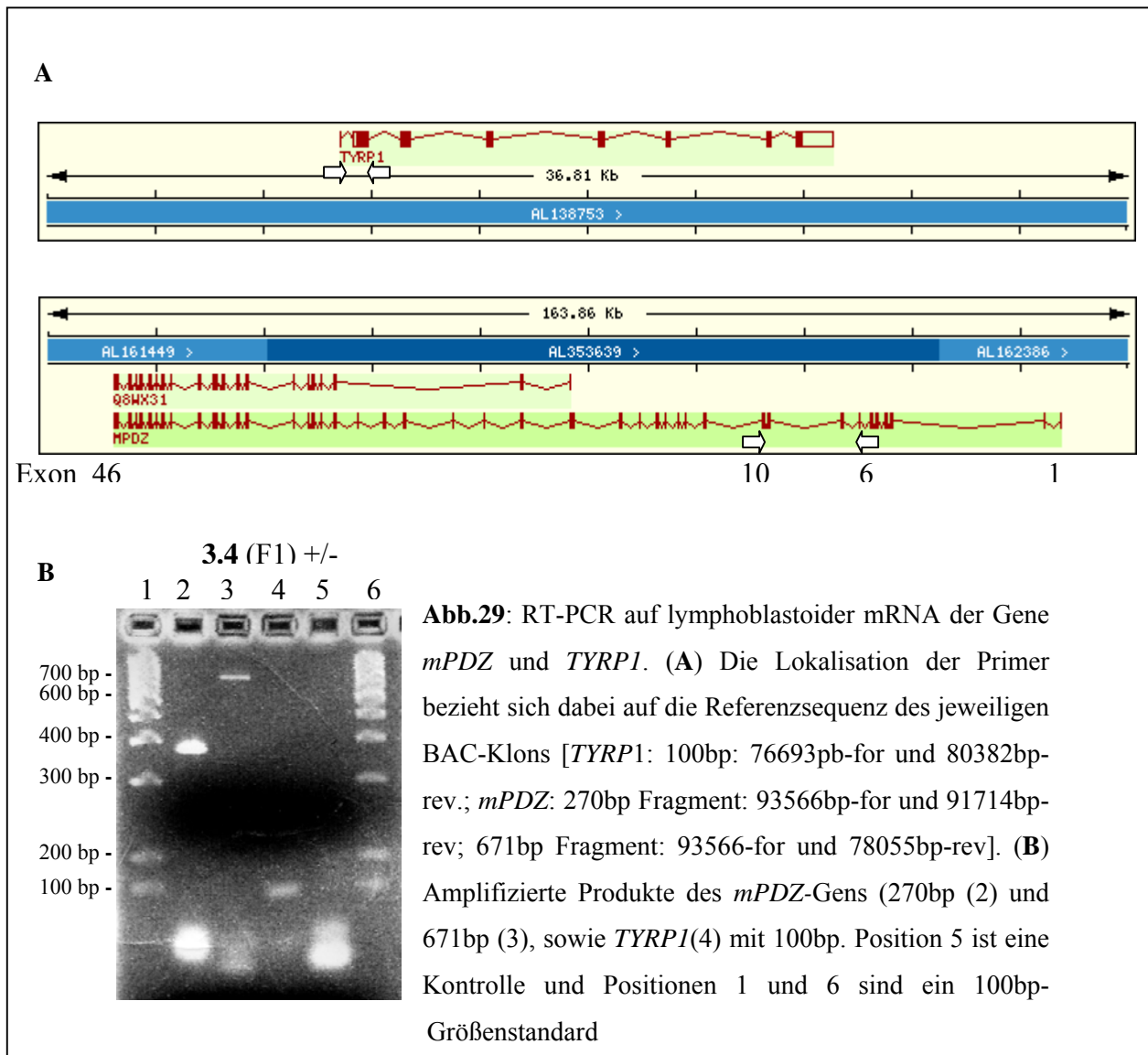


Abb.28: Domänen des *mPDZ*-Proteins nach Analyse durch SwissProt. Das *mPDZ*-Protein enthält mehrere PDZ-Domänen, sowie eine L27-Domäne. (<http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/genecards/carddisp?MPDZ>)

Um die Expression der beiden Kandidatengene *mPDZ* und *TYRP1* zu testen, wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Die Exon-Struktur der Gene ist in Abb.24 dargestellt. Hierbei wurden von dem Gen *mPDZ* aus Exon 6-8 und 6-10 (270bp Fragment von 664D14: 93566bp-for und 91714bp-rev; 671bp Fragment: 93566-for und 78055bp-rev) Primer (HUSAR-Programm: *primer*) erstellt und eine RT-PCR auf isolierter mRNA durchgeführt. Die Analyse ergab, dass in Lymphozyten der Mutationsträger (Abb.25) *mPDZ* exprimiert wird. Auf gleiche Weise wurde die Expression des *TYRP1*-Gens nachgewiesen (100bp: 76693pb-for und 80382bp-rev) (Abb.25). Eine anschließende Sequenzierung ergab, dass die amplifizierten Produkte den cDNAs entsprachen (*mPDZ*: NM_003829; *TYRP1*: NM_000550), so dass ein PCR-Artefakt ausgeschlossen werden kann.



Eine weitere Analyse mittels einer semiquantitativen PCR von mRNA ergab weiterhin, dass sowohl *mPDZ* (MUPP1) als auch *TYRP1* im Vergleich zu β -Aktin und GAPDH Expression quantitativ geringer exprimiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse können nun in dieser Tabelle zusammengefasst werden. Es werden die Ergebnisse der FISH-Analysen, der Southern-Analysen und die repeat-cluster, die die Bruchpunkte eingrenzen, aufgeführt.

	FISH (positive BAC Klone in konvent. FISH)	split-signal FISH (Inv, Dup)	PFGE (seldom cutter), positive PCR-Proben	EcoRI, HindIII etc. (frequent cutter), positive PCR-Proben	repeats
3.3 (+/-) F1	378H16, 299F23, 167C5, 664D14	187K14, 382H24, 664D14 (dup)	299F23_89+149, 167C5_170, 664D14_11+20	382H24_33	L1
3.4 (+/-) F1	299F23, 664D14	187K14, 382H24, 664D14 (dup)	167C5_170, 664D14_11+20	87N24_75	L1
3.5 (+/-) F1	378H16, 299F23, 109M17, 664D14	187K14, 382H24, 664D14 (dup)	299F23_140+156, 664D14_11+20	EST BI917145	L1
3.2 (+/-) F2	299F23, 664D14	187K14, 382H24, 664D14 (dup)	299F23_140+156, 664D14_11+20	19A22_83+98	L1
4.4 (+/-) F3	536I1, 664D14	187K14, 382H24, 664D14 (dup)	-	-	

Tab.2: Übersicht über die genomischen Veränderungen in lymphoblastoiden Zelllinien von BRCA2-Mutationsträgern der Familien 1-3 im Bereich 9p23-24 [Inv = Inversion, Dup = Duplikation]

4. Diskussion

Die Basis dieser Arbeit beruht auf der Beobachtung, dass *BRCA2*-Mutationsträger von 3 verschiedenen Familien mit hereditärem Brustkrebs auffällige chromosomale Veränderungen der Region 9p23-24 aufweisen. Vorarbeiten ließen einen kausalen Zusammenhang zwischen *BRCA2*-Mutation und 9p-Veränderung möglich erscheinen. Durch Ausweitung der Analysen in diesen drei unabhängigen Familien sollten die Veränderungen nun näher charakterisiert werden. In dieser Arbeit konnten mittels FISH, PFGE und mit Hilfe bioinformatischer Techniken sowohl Inversionen als auch Duplikationen festgestellt werden. Eine überlappende Inversion zeigte sich hierbei deutlich bei allen untersuchten Mutationsträgern. Diese Inversion überspannt im Wesentlichen die Gene *TYRP1* und *mPDZ*. Die hier vorgestellten Daten zeigen eine nicht-zufällige Koexistenz von 9p-Anomalie und *BRCA2*-Mutation. Obwohl ein überlappender Bereich bei allen Mutationsträgern vorhanden ist, scheinen sich die Bruchpunkte innerhalb der Mutationsträger zu unterscheiden. Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse diskutiert werden und bekannte Fälle chromosomaler Veränderungen und Theorien besprochen werden. Weiter soll die Funktion von *BRCA2* und der Zusammenhang mit der 9p23-24 Instabilität beleuchtet werden. Die Diskussion soll ebenfalls neue Erkenntnisse, die im Bereich der chromosomalen Instabilität gewonnen wurden, einbeziehen und die Erkenntnisse über die bereits vorgestellten Gene *TYRP1* und *mPDZ* (auch bekannt als *MUPP1*) berücksichtigen.

4.1 Kartierung der Inversion/Duplikation des Bereiches 9p23-24 in BRCA2-Mutationsträgern

Wie bereits gezeigt wurde, befand sich ein großer veränderter chromosomaler Bereich zwischen den STS-Markern *D9S775* bis *D9S267*. Durch Hybridisierungen mit YAC-Klonen als auch wenigen PAC-Klonen wurden erste Hinweise auf die Art dieser Rearrangements gewonnen. Die Verwendung von sehr großen YAC-Proben in der FISH-Analyse, kann aber auch zu Schwierigkeiten bei der Auswertung von Ergebnissen führen. YAC-Klone besitzen die negative Eigenschaft, dass sie chromosomale Bereiche der Inserts verlieren können (Green, Riethman et al. 1991; Larionov, Kouprina et al. 1994). Durch die Größe der humanen Sequenz besteht überdies die Möglichkeit, dass identifizierte Signale nicht immer eine Aussage darüber zulassen, ob es sich bei einem doppelten Signal um eine Duplikation oder

um eine Inversion handelt. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass ein als Duplikation interpretiertes Signal auch eine Inversion darstellen kann. Ein ähnliches Problem ergibt sich bei PAC-Klonen, die ebenso wie YAC-Klone durch eine gewisse Instabilität der klonierten humanen Sequenz zu falschen Rückschlüssen führen können. Um diese negativen Eigenschaften der Klone zu umgehen, wurde für diese Arbeit eine BAC-Contig erstellt. Dadurch ergaben sich mehrere Vorteile. BAC-Klone zeichnen sich durch eine hohe Stabilität der klonierten humanen Chromosomenabschnitte aus (Kim, Birren et al. 1996). Durch das Human Genom Projekt standen erste Sequenzinformationen zur Verfügung, die genutzt wurden, um Hybridisierungsproben für eine anschließende Identifikation der Bruchpunkte herzustellen. Ein weiterer Vorteil besteht in der Größe der klonierten humanen DNA-Fragmente. Diese liegen zwischen 120-180 kb, entsprechen also etwa 1/10 der Größe eines YAC-Klons. Durch BAC-Klone kann überprüft werden, ob ein dupliziertes Signal mit YAC-Proben tatsächlich eine Duplikation darstellt.

4.1.1 Die BAC-Contig des genetisch instabilen Bereiches 9p23-24

Die auf dem BAC-Vektorsystem pBeloBAC (Shizuya, Birren et al. 1992) beruhenden RPCI-11-BACs, welche alternativ zur YAC- und PAC-Feinkartierung benutzt wurden, konnten durch Einsatz der HUSAR Programme zu einer BAC-Contig zusammengefasst werden, bevor das Human Genom Projekt beendet wurde. Diese Anordnung war sehr wichtig, da anhand der angeordneten BAC-Klone die PCR-Proben amplifiziert werden sollten. Wie bereits in Abb.6 beispielhaft dargestellt, wurden insgesamt 40 BAC-Klone miteinander verglichen. Die benutzte Methode erwies sich als sehr genau, da nach Beendigung des Human-Genom-Projekts nur wenige Fehler enthalten waren. Durch die computergestützte Auswertung konnten die Primer durch die HUSAR-Programme „repmask“ und „primer“ angefertigt werden. Dem Programm „repmask“ kann eine ganz entscheidende Funktion zugesprochen werden. Repmask untersucht anhand einer vorgegebenen DNA-Sequenz diese auf *repeat*-Elemente, wobei *repeats* in der Zielsequenz maskiert werden. Das Programm benutzt die „RepBase Update Datenbank“ des Genetischen Informationsforschungszentrum (GIRI: <http://www.girinst.org>) und untersucht die DNA hierbei auf schwach komplexe DNA-Sequenzen und zwischengelagerte *repeats* (Jurka 2000). Die so maskierten *repeat*-Elemente wurden dann in der Primerkonstruktion ausgelassen. Diese Vorgehensweise hatte entscheidende Vorteile, da zum einen der chromosomale Bereich in der unmittelbaren Sequenznachbarschaft eines

potentiellen Bruchpunktes bekannt wurde und zum anderen die PCR-Proben keine *repeats* enthielten, was eine spätere Southern-Analyse erleichterte. Zur Anordnung der BAC-Klone wurden auch die PAC-Contig-Endsequenzen von Andreas Claas, sowie STS-Marker zur physikalischen Orientierung benutzt. Durch diese Zusatzinformationen konnte die Contig von 3,5 Mb Größe ohne weitere Fehler für die Arbeit benutzt werden.

4.1.2 Inversion und Duplikation

Da durch Savelyeva et al. 2001 bereits ein vorläufiger Überlappungsbereich der Rearrangements kartiert wurde, sollten aus der BAC-Contig Klone isoliert werden und die Region genauer kartiert werden. Hierbei wurden BAC-Klone im Bereich der YAC-Klone 819B6, 804B2 und 800A7 für FISH-Analysen ausgewählt. Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, konnten jedoch keine Duplikation in dem von Savelyeva et al. 2001 postulierten Bereich innerhalb des YAC 804B2 detektieren. Hierbei liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Duplikation vermutlich um eine Inversion handelt. Ein großer duplizierter Bereich würde in einer FISH-Analyse mit BAC-Klonen aus diesem Bereich ein klares dupliziertes Signal erwarten lassen. Dies konnte jedoch durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Vielmehr konnte ein invertiertes Signalmuster durch markierte BAC-Klone detektiert werden. Signale, die auf eine Duplikation hinweisen würden, wurden nur durch die BACs 187K14 (Mutationsträger 3.3, Familie 1) sowie 299F23 und 176P17 (Mutationsträger 3.5, Familie 1) detektiert. Hierbei überspannen die BAC-Proben den Bruchpunkt der Inversion. Wie durch die FISH-Analysen gezeigt werden konnte, besitzen alle *BRCA2*-Mutationsträger der verschiedenen Familien eine Inversion im Bereich der STS-Marker *D9S775* und *D9S267/D9S268*. Um auszuschließen, dass es sich dabei um FISH-Artefakte handelt, wurden alle BACs durch eine sequenzspezifische PCR-Reaktion getestet. Diese PCR wurde erst durch die veröffentlichten Sequenzdaten in den Datenbanken des NCBI- und Sanger-Institutes ermöglicht. Tests konnten keine Instabilitäten in den benutzten BAC-Klonen feststellen. Somit kann durch die vorliegenden Ergebnisse ausgeschlossen werden, dass es sich bei den detektierten Signalen um Artefakte der FISH handelt, die durch chimäre oder veränderte DNA-Fragmente innerhalb des BAC-Klons ausgelöst werden könnten. Um den proximalen Bereich der Rearrangements zu identifizieren, wurde der Bereich auf die STS-Marker *D9S267* bzw. *D9S268* ausgeweitet. Wie die FISH-Analysen mit den BAC-Klonen 382H24 und 664D14 zeigten, ist auch dieser Bereich invertiert. Dies ist besonders interessant, da in diesem Bereich der Inversion mehrere Gene lokalisieren (*TYRPI*,

mPDZ, *Q8WX31*, Pseudogene: *Q8NCG2*, *Q8IV03*). Um diesen Bereich detaillierter untersuchen zu können, wurde eine Interphasen-FISH-Analyse durchgeführt. Die Interphasen-FISH besitzt einen höheren Auflösungsbereich als die konventionelle Metaphasen-FISH, so dass Signale noch getrennt detektiert werden können, auch wenn sie nah aneinander grenzen. Interphasen-FISH wird in der heutigen Diagnostik vor allem in der Trisomie-Detektion, der Translokation von Chromosomenabschnitten bei der CML oder Chromosomen-Deletionen verwendet. Mancini et al. konnten durch diese Art der FISH-Analyse die *inv(16)* mittels 2 kleiner Cosmid-Contigs aus Proben des Bruchpunktbereiches 16p in 23 Fällen von Akuter Myeloischer Leukämie (AML) in verschiedenen Phasen der Erkrankung detektieren. Sie stellten weiterhin fest, dass diese Methode eine effektivere Technik darstellt, um diese *inv(16)* zu identifizieren, als es durch die klassische FISH-Analyse möglich wäre (Mancini, Cedrone et al. 2000). Diese Methode der FISH-Technik wurde durch Wieser et al. auch *split-signal* FISH genannt (Wieser, Schreiner et al. 2001). Da sich die detektierte Inversion innerhalb eines Gen-Bereiches befand, wurde die von Mancini et al. angewendete Methode in dieser Arbeit leicht verändert. Durch die Markierung der BAC-Klone 187K14, 382H24 und 664D14 mit drei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konnte nicht nur eine Inversion detektiert werden, sondern auch der Bruchpunkt genauer bestimmt werden. In Mutationsträger 3.3 der Familie 1 konnte die Inversion auf den Bereich zwischen 382H24 und 664D14 eingegrenzt werden. Es konnten zusätzlich noch Interphasen mit Duplikationen des Bereiches um 664D14 detektiert werden. Diese Beobachtung ließ sich auch auf Mutationsträger 3.4 und 3.5 der Familie 1 sowie 3.2 der Familie 2 übertragen. Hierbei scheint es sich um eine Duplikation des *mPDZ*-Gens zu handeln. Diese Duplikation konnte aber wesentlich weniger häufig in Interphasen beobachtet werden als die Inversion. Hier stehen zwei Möglichkeiten der Interpretation zur Verfügung. Auf der einen Seite wäre es möglich, dass dieses duplizierte Signal ein FISH-Artefakt darstellt, wobei die benutzte BAC-DNA durch eine unzureichende Konkurrenz mit Cot-1 an homologe DNA-Bereiche bindet. Dagegen spricht jedoch, dass *BRCA2*-Wildtypen keine solchen Duplikationen aufweisen. Es könnte auch der Fall sein, dass bestimmte *repeat*-Sequenzen in einem angrenzenden Bereich diese Veränderung hervorrufen, indem sie durch Rekombination eine Mikroduplikation auslösen (Esenauer, Adeyinka et al. 2003). Solche interstitiellen Duplikationen sind beschrieben beim Prader-Willi-Syndrom, Angelman-Syndrom, bei der vererbten motorischen und sensorischen Neuropathie 1 sowie bei 22q11-Deletions-Syndromen (Malcolm 1996).

Die relative Inzidenz der Inversion wurde durch Auszählen von 100 Interphasen in zwei unabhängigen FISH-Analysen bestimmt. Hierbei können die genannten Prozentwerte nur als

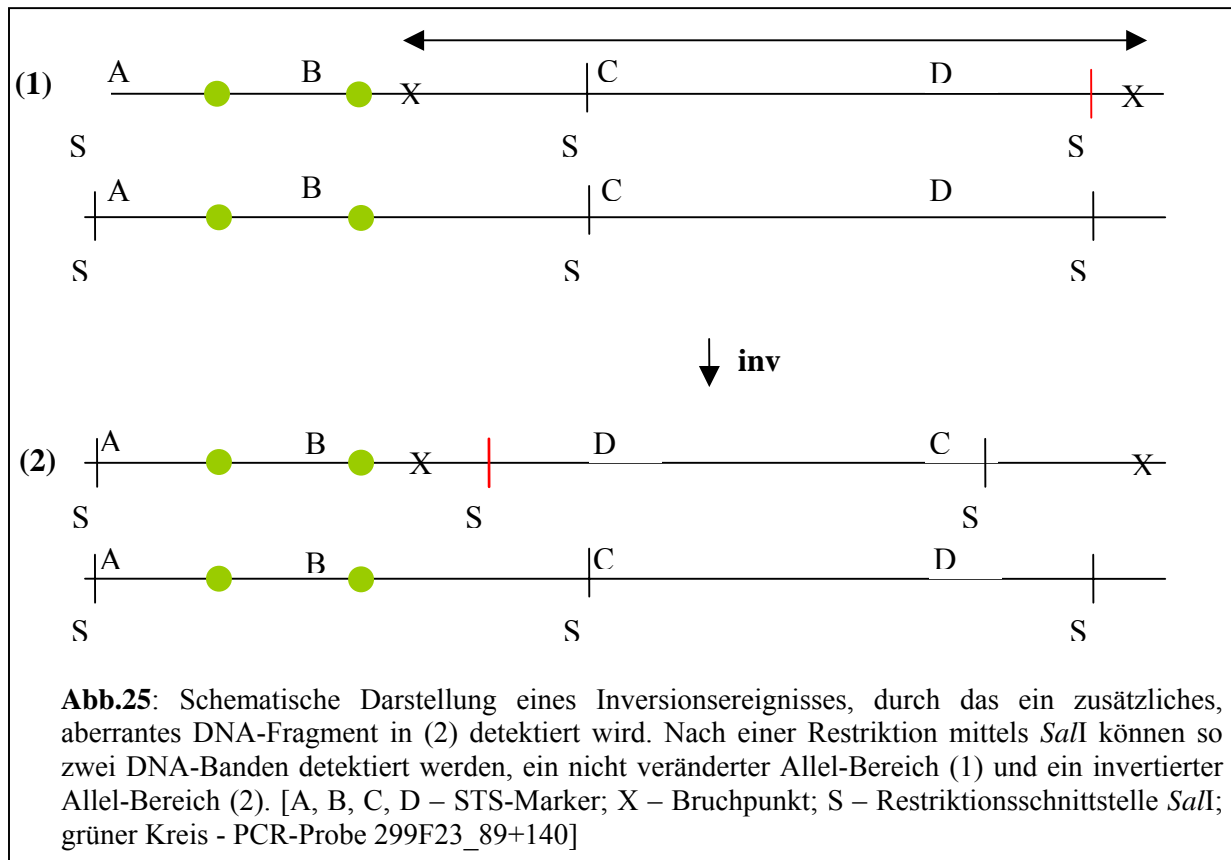
Richtwert gesehen werden. Der Nachteil einer solchen FISH-Untersuchung besteht in der häufigen Fehlinterpretation durch co-lokalisierte Signale in den Interphase-Kernen. Ein Zwischenraum von mehr als einem BAC-Signal wurde als getrennt bewertet. Dieses Vorgehen wurde in Anlehnung an Wieser et al. durchgeführt. Durch die Struktur der Interphasen-Chromosomen können die Signalmuster nicht selten auch als falsch-negativ bewertet werden, wenn die eigentlich getrennten Signale durch z.B. Schleifenbildung co-lokalisieren und somit als negativ bewertet werden (Mancini, Cedrone et al. 2000; Wieser, Schreiner et al. 2001). Somit ist es durchaus möglich, dass die Inzidenz der Inversion durchaus größer ist.

4.1.3 Southern-Analysen der Inversion 9p23-24

Da der Inversionsbereich der Mutationsträger bereits durch FISH-Analysen gut charakterisiert werden konnte, sollten nun durch Southern-Analysen die Bruchpunkte genauer eingegrenzt werden. Hierzu wurde neben der klassischen Restriktionsanalyse durch Enzyme wie *EcoRI*, *HindIII* und *SacI* auch eine Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) benutzt. Diese Methode wurde erstmals 1984 beschrieben (Schwartz and Cantor 1984). Durch die PFGE konnte humane DNA mittels selten schneidender Enzyme aufgetrennt und analysiert werden. Die Detektion mittels der PCR-amplifizierten BAC-Probe 299F23 (Abb.15) konnte in Mutationsträger 3.3 der Familie 1 ein zusätzliches DNA-Fragment detektieren. Ein zusätzliches DNA-Fragment kann nur dann durch eine PCR-Probe erkannt werden, wenn durch ein Rearrangement eine andere DNA-Sequenz in den unmittelbaren Bereich der Probe gelangt. Dieses zusätzliche DNA-Fragment beinhaltet demnach einen Bruchpunkt (Abb.25). Die Möglichkeit, dass es sich um einen Restriktionspolymorphismus handeln könnte wird zum einen durch die FISH-Ergebnisse als auch den gleichen Haplotypen von 3.3 und 3.5 von Familie 1 in dieser Region ausgeschlossen (Abb.13A).

Die weiteren Analysen detektierten durch benachbarte Proben von 299F23 mittels PFGE ebenso aberrante DNA-Fragmente für Mutationsträger 3.5 von Familie 1 sowie 3.2 von Familie 2 (Abb.13B). Diese PCR-Proben detektieren kein aberrantes Fragment für 3.3 von Familie 1, da diese Proben einen etwas proximalen Bereich abdecken. Dies lässt ferner die Aussage zu, dass die Bruchpunkte zwar in einer ähnlichen Region lokalisieren, aber doch unterschiedlich sind. Dies könnte auf einen Mechanismus durch *repeats* hinweisen, die in allen Bruchpunktfragmenten detektiert wurden. Die detaillierten Analysen mit den Proben 87N24 und EST917145 bestätigen diese Hypothese (Abb.19). Die Bruchpunkt-enthaltenen

Fragmente konnten auf 3-6 kb eingegrenzt werden. Da die Bruchpunkte für die übrigen Mutationsträger mit den übrigen PCR-Proben nicht detektiert werden konnten, aber die FISH als auch PFGE auf ein Rearrangement hindeuten, besteht die Möglichkeit, dass die *repeat-cluster* in diesen Bereichen für ein Bruchpunktereignis verantwortlich gewesen sind. Diese Southern-Analysen bestätigen, dass obwohl die Inversion den gleichen chromosomalen Bereich überspannt, die Bruchpunkte der einzelnen Mutationsträger unterschiedlich sind.



Der zweite Bruchpunkt wurde durch PFGE inmitten des *mPDZ*-Gens identifiziert. Die PCR-Probe aus 664D14 konnte bei Mutationsträgern 3.3, 3.4 (Familie 1) und 3.2 (Familie 2) eine zusätzliche DNA-Bande identifizieren (Abb.17). Durch die Detektion von zwei DNA-Fragmenten, anstatt einem DNA-Fragment, scheint hier ein Restriktionspolymorphismus aufzutreten. Abb. 26 verdeutlicht schematisch die Entstehung dieses Inversionsereignisses. Weiterführende Southern-Analysen konnten jedoch nur bei Mutationsträger 3.3 (Familie 1) im distalen-Bereich des *mPDZ*-Gens einen Bruchpunkt detektieren. Da weitere Southern-Analysen durch Proben aus den BAC-Klonen 387K14, 382H24 und 664D14 kein aberrantes DNA-Fragment detektieren konnten, liegt die Vermutung nahe, dass der Bruchpunkt sich innerhalb von *low-copy-repeats* befindet, die in diesen Klonen vorhanden sind und in Größen

von 5 kb bis 8 kb auftreten. Es besteht die Möglichkeit, dass die Anordnung dieser *repeats* ein *hot-spot* für Rekombinationen sein könnte.

4.2 Repeats als hot-spots genetischer Instabilität?

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Inversionsbruchpunkt des Mutationsträgers 3.3, sowie 3.4 und 3.5 von Familie 1 in der unmittelbaren Nähe von *low-copy-repeats* befindet. Solche Wiederholungssequenzen begünstigen im humanen Genom ungleiche *crossing-over* Ereignisse und fördern somit das Auftreten von Deletionen, Duplikationen oder Inversionen, die im Zusammenhang mit einer Erkrankung stehen können (Lupski 1998; Mazzarella and Schlessinger 1998). Regionsspezifische Rekombinationen zwischen *low-copy* Wiederholungssequenzen können dazu führen, dass ein krankheitsverursachendes Gen in vielen Fällen nahezu auf die gleiche Weise verändert wird. Es gibt Erkrankungen, die vorwiegend dadurch entstehen, dass die Anzahl der Genkopien von dosisabhängigen Genen verändert wird, oder dadurch, dass ein Gen unterbrochen wird. Sie werden als genomische Erkrankungen bezeichnet, da die Genomstruktur in diesen Fällen zur Entstehung der Krankheit beiträgt. Dieser Mechanismus steht in scharfem Kontrast zum klassischen Entstehungsmechanismus von genetischen Erkrankungen, bei denen ein abnormer Phänotyp vorwiegend aufgrund von Punktmutationen entsteht (Lupski 1998). Welche Veränderung durch eine Rekombination zwischen duplizierten Regionen entsteht, ist abhängig von der Orientierung der *repeats* zueinander (Shaffer and Lupski 2000). Befinden sich diese in derselben Orientierung, so kann es aufgrund einer Rekombination zu einer Deletion oder Duplikation des zwischen den *repeats* lokalisierten genetischen Materials kommen. Dagegen resultiert eine Rekombination zwischen entgegengesetzt orientierten homologen Bereichen in einer Inversion des zwischen den *repeats* lokalisierten Bereiches (s. Abb. 26). Bei den duplizierten Bereichen kann es sich um Gene, aber auch um andere relativ seltene Sequenzen handeln, wie z.B. Tigger-Elemente (Smit and Riggs 1996). Im Folgenden soll die Bedeutung von duplizierten Regionen des Genoms für genetisch bedingte Erkrankungen anhand einiger Beispiele verdeutlicht werden.

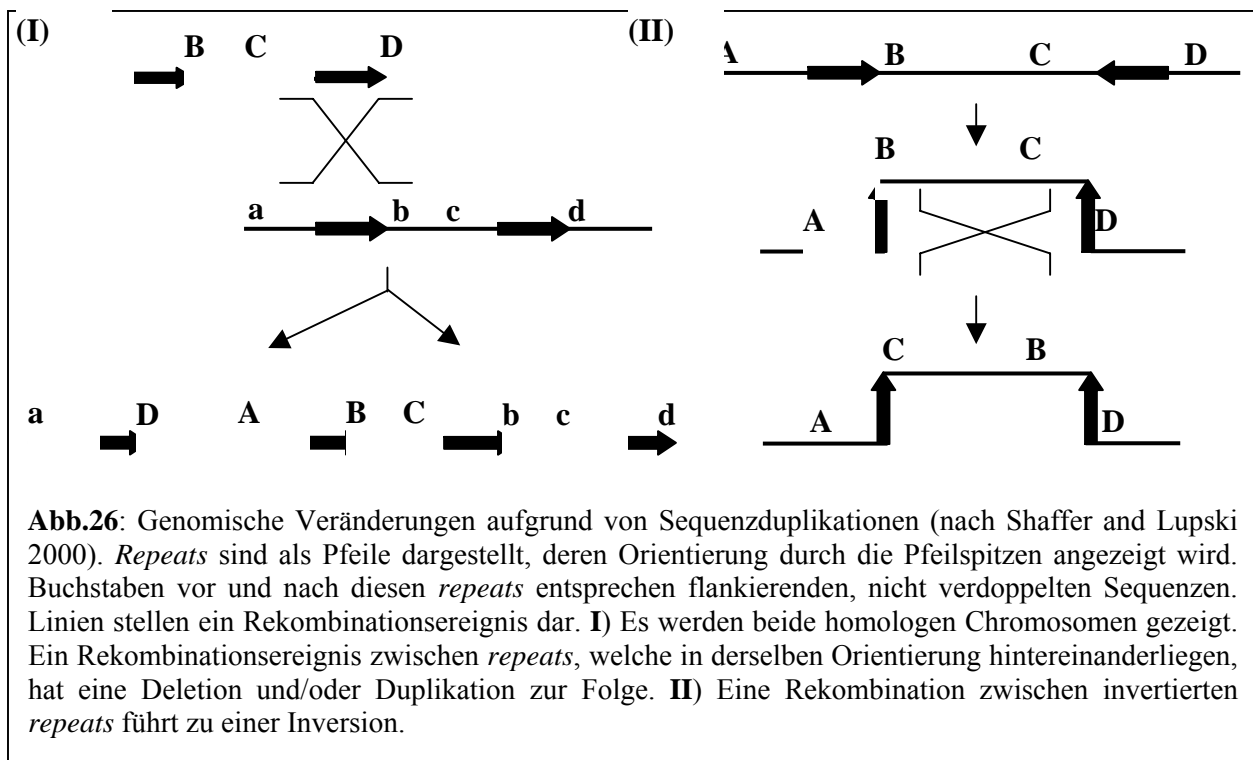


Abb.26: Genomische Veränderungen aufgrund von Sequenzduplikationen (nach Shaffer and Lupski 2000). *Repeats* sind als Pfeile dargestellt, deren Orientierung durch die Pfeilspitzen angezeigt wird. Buchstaben vor und nach diesen *repeats* entsprechen flankierenden, nicht verdoppelten Sequenzen. Linien stellen ein Rekombinationsereignis dar. **I)** Es werden beide homologen Chromosomen gezeigt. Ein Rekombinationsereignis zwischen *repeats*, welche in derselben Orientierung hintereinanderliegen, hat eine Deletion und/oder Duplikation zur Folge. **II)** Eine Rekombination zwischen invertierten *repeats* führt zu einer Inversion.

Klassische Beispiele für autosomale Erkrankungen, die aufgrund von Rekombinationen zwischen tandemartig hintereinanderliegenden duplizierten Genen entstehen, sind die Hämoglobinopathien (Maniatis, Fritsch et al. 1980; Collins and Weissman 1984; Orkin and Kazazian 1984; Antonarakis, Kazazian et al. 1985; Higgs, Vickers et al. 1989). Die Mehrzahl der α -Thalassämien entsteht durch Deletionen im α -Globin-Gencluster in 16p13.3 (Higgs, Old et al. 1980; Lauer, Shen et al. 1980). Dieses ist zusammengesetzt aus zwei aktiven α -Genen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$), zwei Pseudogenen ($ya 1$ und $ya 2$), dem im Embryo exprimierten α -ähnlichem $z 2$ -Gen und seinem Pseudogen ($yz 1$). Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Gene kodieren für identische Proteine und sind auch auf der Nukleotidebene fast identisch. Zudem verlängert sich die Homologie zwischen den zwei Genen in Richtung 5'-flankierende Region um 1 kb, so dass die zwei Gene in einem Bereich von mehr als 4 kb sehr homolog zueinander sind. Dadurch scheint ungleiches *crossing-over* begünstigt zu werden, was zu Chromosomen mit zusätzlichen Globin-Genen oder zu Chromosomen mit weniger oder keinem Globin-Gen führen kann (Weatherall et al., 1995). Individuen, die insgesamt zwei Globin-Gene besitzen, zeigen eine milde Form der α -Thalassämie (OMIM-Nr. 141850), während solche mit insgesamt nur einem Gen schwer betroffen sind. Auch bei anderen Erkrankungen dienen tandemartig hintereinanderliegende Gene, oder zu diesen benachbarte Sequenzen, als Substrate für homologe Rekombinationen. Die Rekombination zwischen diesen *repeats* führt entweder zum Verlust einer Genkopie, was zu einer Haploinsuffizienz führt, oder es entstehen rekombinante

Hybridgene mit veränderten Eigenschaften. Zu den Erkrankungen, die aufgrund dieses Mutations-Mechanismus entstehen, gehören neben der α -Thalassämie auch die β -Thalassämie (OMIM-Nr. 141900; Weatherall, 1995), das isolierte Fehlen von Wachstumshormon (GH1; OMIM-Nr. 139250; Vnencak-Jones, Phillips et al. 1988; Vnencak-Jones and Phillips 1990), Rot-Grün-Blindheit (OMIM-Nr. 303800 und 303900; Nathans, Merbs et al. 1992; Neitz and Neitz 1995) Glucocorticoid-heilbarer Aldosteronismus (GRA; OMIM-Nr. 103900; Lifton, Dluhy et al. 1992), kongenitale adrenale Hyperplasie (CAH; OMIM-Nr. 20191 Donohoue, Jospe et al. 1989), Bartter-Syndrom Typ III (BS; OMIM-Nr. 241200; Simon, Bindra et al. 1997) und Gaucher-Krankheit (OMIM-Nr. 230800; Zimran, Sorge et al. 1990). Duplizierte *repeats* können jedoch auch dann zu genetisch bedingten Erkrankungen führen, wenn die *repeats* in einiger Entfernung von dem für die Erkrankung verantwortlichen Gen lokalisiert sind. In diesem Fall flankieren die duplizierten Sequenzen eine genomische Region, die ein oder mehrere Gene beinhalten kann. Die für den Phänotyp verantwortliche Wirkung des Gens ist dosisabhängig, aber es wirkt nicht als Auslöser für die Rekombination, welche zu einer DNA-Umordnung führt. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist die X-gekoppelte Ichthyosis (OMIM-Nr. 308100), welche durch ein Fehlen der Steroid-Sulfatase (STS) verursacht wird. Bei ungefähr 90 % der Patienten mit dieser Erkrankung ist das gesamte in der Region Xp22.3 lokalisierte STS-Gen deletiert (Ballabio, Carozzo et al. 1989; Shapiro, Yen et al. 1989). Bei der Mehrzahl der Patienten liegen die Bruchpunkte der Deletion innerhalb eines *low-copy repeats*, welches mit S232 bezeichnet wird (Yen, Li et al. 1990). Die S232-*repeats* sind 1,9 Mb voneinander entfernt und 5 kb lang. Zudem sind zwei Elemente wiederholt, die aus VNTRs (*variable number of tandem repeats*) bestehen (Li, Yen et al. 1992). Eine weitere Erkrankung, die aufgrund von Rekombinationen zwischen tandemartig angeordneten *repeats* entsteht, ist die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 1A (CMT1A; OMIM-Nr. 118220). Diese Erkrankung ist assoziiert mit 1,5 Mb großen Duplikationen in 17p12 (Lupski 1997; Lupski 1998; Lupski 1998) die aufgrund von Rekombinationen zwischen 24 kb großen, zu 98,7 % identischen *repeats* (CMT1A-REP) entstehen (Pentao, Wise et al. 1992). Schiavon et al. (Schiavon, Mostacciuolo et al. 1994) zeigten, dass von 56 nicht verwandten Patienten 76 % die CMT1A-Duplikation aufwiesen. Das für die Erkrankung verantwortliche dosisabhängige Myeligen PMP22 ist 0,5 Mb von der proximalen Kopie des *repeats* und 1,0 Mb von der distalen Kopie entfernt lokalisiert (Reiter, Murakami et al. 1997). Auch das Smith-Magenis-Syndrom (SMS; OMIM-Nr. 182290) entsteht aufgrund von Rekombinationen zwischen *repeats*. Bei der Mehrzahl der Patienten ist eine ungefähr 5 Mb große Region in 17p11.2 deletiert (Greenberg, Guzzetta et al. 1991; Guzzetta, Franco et al.

1992; Juyal, Figuera et al. 1996). Diese deletierte Region wird von einem ungefähr 200 kb langen *repeat* Gen-Cluster flankiert. Mehr als 90 % der Patienten zeigen nach PFGE ein verändertes Fragment anscheinend gleicher Größe, was auf ein präzises Rekombinationsereignis schließen läßt (Chen, Manian et al. 1997). Die Unterbrechung eines Gens als Folge einer Rekombination zwischen entgegengesetzt orientierten *repeats* spielt beispielsweise bei der Hämophilie A eine Rolle. Hier wird diese Krankheit bei ungefähr 45 % der schwer betroffenen Patienten durch eine Inversion von einem Teil des Faktor VIII-Gens verursacht (Lakich, Kazazian et al. 1993; Naylor, Brinke et al. 1993; Tuddenham, Schwaab et al. 1994; Antonarakis, Kazazian et al. 1995). Diese Veränderung wird durch Rekombinationen zwischen *repeats*, die innerhalb und im 5'-Bereich zum Gen liegen, hervorgerufen. Die *repeat*-Sequenz ist in diesem Fall ein intronloses Gen (Gen A), welches im Intron 22 des Faktor VIII-Gens lokalisiert ist. Zwei weitere Kopien dieses Gens sind in entgegengesetzter Orientierung ungefähr 500 kb oberhalb lokalisiert (Freije and Schlessinger 1992). Eine Rekombination zwischen der Kopie im Intron und einer der weiter oberhalb gelegenen Kopien führt zu einer Inversion der Exons 1 bis 22 des Faktor VIII-Gens. Interessanterweise entsteht eine Rekombination häufiger mit der weiter proximal lokalisierten Kopie, was auf ein spezifisches Rekombinationsereignis hindeutet (Naylor, Buck et al. 1995). Auch beim Hunter-Syndrom (MPS II; OMIM-Nr. 309900) wird das verantwortliche Gen Iduronat-2-Sulfatase (IDS) bei ungefähr 13% der Patienten aufgrund von Rekombinationen mit entgegengesetzt orientierten IDS-ähnlichen Sequenzen durch eine Inversion unterbrochen (Bondeson, Dahl et al. 1995).

Diese Erkenntnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass *repeat*-Sequenzen in der Umgebung eines Bruchpunktes bei der Entstehung von Rearrangements auch in diesen *BRCA2*-Mutationsträgern eine große Rolle spielen könnten, da die Bruchpunktfragmente in der unmittelbaren Umgebung von *L1-repeats* lokalisieren. Die genannten Beispiele und die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse werfen folgende Fragen auf:

1. Ist *BRCA2* verantwortlich für die 9p23-24 Instabilität?
2. Ist die 9p Instabilität verbunden mit hereditärem männlichen Mammakarzinom?

4.3 Zusammenhang zwischen der *BRCA2*-Mutation und der instabilen Region 9p23-24

Wie bereits beschrieben, zeigen alle *BRCA2*-Mutationsträger im Bereich 9p23-24 chromosomale Veränderungen. In Familie 1 konnte nicht ermittelt werden, ob diese Veränderungen paternalen oder maternalen Ursprungs sind, da keine DNA der Eltern zur Verfügung stand. Obwohl ein überlappender genomischer Bereich für alle Mutationsträger der Familie 1 identifiziert wurde, kann der Inversionsbereich nicht einem 9p-Homolog zugeordnet werden. Diese Konstellation deutet auf eine individuelle *de-novo* Mutation des kurzen 9p-Arms hin.

Bei Mutationsträger 3.2 der Familie 2 konnte aufgrund mangelnder DNA von Familienangehörigen keine Haplotypenanalyse durchgeführt werden, so dass in diesem Fall keine Aussage darüber getroffen werden kann, inwiefern bereits Eltern und Großeltern Veränderungen in 9p23-24 zeigen.

Im Vergleich zu den Familien 1 und 2 ist die 9p-Anomalie in der Familie 3 mit einem bestimmten paternalen Chromosom 9 verknüpft. Mutationsträger 3.1 dieser Familie besitzt 3 verschiedene Lymphozyten-Populationen mit unterschiedlichen chromosomalen Veränderungen. Etwa 20% der Veränderungen von 3.1 konnten auch bei den Nachkommen 4.1 (Wildtyp-*BRCA2*) und Mutationsträger 4.2 beobachtet werden (Savelyeva, Claas et al. 2001). Nachkomme 4.3 (Wildtyp-*BRCA2*) zeigte keine besonderen Auffälligkeiten. Eine anschließende Haplotypenanalyse zeigte, dass nur eines der paternalen 9p-Homologen mit der Duplikation segregierte, wobei 4.3 eine „normale“ 9p-Kopie vererbt bekommen hat. Eine genauere Analyse der Nachkommen 4.1 und 4.2 konnte aber neben der gemeinsamen Duplikation noch individuelle Rearrangements in Mutationsträger 4.2 entdecken. Die strukturellen Veränderungen lassen sich somit als individuelle chromosomale Rearrangements zusammenfassen und deuten auf genetische Faktoren hin, die die Stabilität im chromosomalen Bereich 9p23-24 der Zellen beeinflussen. Für diese Annahme spricht weiterhin, dass die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse nur in *BRCA2*-Mutationsträgern nachweisbar sind.

In 20 zufällig ausgewählten, nicht miteinander verwandten Lymphozytenlinien konnten keine 9p-Veränderungen festgestellt werden. Veränderungen des kurzen Arms 9p sind in der Literatur beschrieben und beziehen sich auf Genotypen mit auffälligem Phänotyp (9p-Syndrome), wie mentale Retardierung und genitale Missbildungen (Veitia, Nunes et al. 1997;

Christ, Crowe et al. 1999; Guanciali Franchi, Calabrese et al. 2000). Maligne Prozesse sind bei 9p-Syndromen nicht beschrieben. Die identifizierten, individuellen chromosomalen Unterschiede in den untersuchten Mutationsträgern der Familien sind ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei diesen chromosomalen Veränderungen nicht um seltene Polymorphismen handelt.

4.3.1 Haploinsuffizienz von BRCA2 als Faktor der genetischen Instabilität?

Wie bereits in der Einleitung aufgezeigt, konnte in Mäusen keine Veränderung genetischer Stabilität nachgewiesen werden. Sharan und Kollegen konnten in diesen *Brca2*^{+/-}-Mäusen weder eine genomische Instabilität noch eine Prädisposition für Tumore beobachten (Sharan, Morimatsu et al. 1997). Die Bedeutung der Haploinsuffizienz scheint aber durch neue Ergebnisse bei BLM oder auch p53 und ATM an Bedeutung zu gewinnen. In Kreuzungsexperimenten von Mäusen sollte die Funktion einer heterozygoten *Blm*-Mutation untersucht werden. Es konnte festgestellt werden, dass heterozygote *Apc*^{+/-}/*Blm*^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu *Apc*^{+/-}-Mäusen eine doppelt so hohe Darmtumor-Inzidenz besitzen (Goss, Risinger et al. 2002). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass eine *Blm*-Haploinsuffizienz einen Modifikator des Darmkrebsrisikos darstellt. Ebenso könnte dieser Effekt auch für p53 (Venkatachalam, Shi et al. 1998) und ATM (Swift, Morrell et al. 1991) eine Rolle spielen. *ATM* kodiert für eine Serin-Threonin-Kinase, die in der Zellantwort auf DNA-Schädigung durch Doppelstrangbrüche involviert ist. Der Verlust von ATM-Aktivität durch Genabbrüche oder Nullmutationen führt zu lymphoiden Erkrankungen in homozygoten Mutationsträgern. Im Gegensatz dazu zeigen heterozygote Mutationsträger für andere Mutationstypen wie *mis-sense* Substitutionen oder *in-frame* Deletionen des *ATM*-Gens, ein erhöhtes Brustkrebsrisiko. Spring und Kollegen konnten dieses mutationsspezifische Tumorspektrum in einem Mausmodell bestätigen (Spring, Ahangari et al. 2002). Obwohl die Tumorraten in dieser dominant-negativen Mutation des *ATM*-Gens nicht vollständig auf Haploinsuffizienz zurückzuführen ist, so kann doch eine dosisabhängige Modulation des Phänotyps gezeigt werden. Eine ähnliche Korrelation zwischen Genotyp und Tumorphänotyp konnte für *BRCA2* gezeigt werden. Individuen mit einer homozygot schwachen Mutation (milde Gendefekte mit noch vorhandener Proteinaktivität) entwickeln Fanconi-Anämie. Heterozygote Mutationsträger mit einer Abbruchmutation, zeigen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko (Howlett, Taniguchi et al. 2002). Dosisvariationen von solchen *caretakern* könnten ein Krebsrisiko modulieren, indem die genetische Instabilität erhöht wird oder die

Signalantwort auf DNA-Schädigung verändert wird (Fodde and Smits 2002). Hierbei sei noch darauf hinzuweisen, dass Mutationen in *BRCA2* eine fehlerträchtige Homologie-vermittelte DNA-Reparatur durchführen, wenn DNA-Doppelstrangbrüche zwischen *repeat*-Sequenzen auftreten. Hierbei handelt es sich um eine *Brca2Tr2014*-Abbruchmutation, die jedoch noch sieben *BRC repeats* enthält und somit die Fähigkeit besitzt Rad51 zu binden (Tutt, Bertwistle et al. 2001). Bekannte Gene, bei denen eine Haploinsuffizienz gezeigt wurde, sind in Abb.27 aufgelistet.

Gen	Funktion	experimenteller Nachweis
<i>AML1/CBFA2</i>	Transkriptionsfaktor	Spontane Tumorbildung beim Menschen (Song, Sullivan et al. 1999)
<i>Cdh1</i>	Zell-Zell-Adhäsion	Tumorbildung in Kombination mit <i>Apc^{+/1638N}</i> (Smits, Ruiz et al. 2000)
<i>Dmp1</i>	Zellzyklus-Kontrolle	Spontane und induzierte Tumorbildung in <i>Dpm1^{+/-}</i> (Inoue, Zindy et al. 2001)
<i>Lkb1</i>	Kinase mit unbekannter Funktion	Spontane Tumorbildung in <i>Lkb1^{+/-}</i> (Miyoshi, Nakau et al. 2002)
<i>NF1</i>	Signaltransduktion	Spontane Tumorbildung in <i>Nf1^{Lox}</i> (Zhu, Ghosh et al. 2002)
<i>p27^{Kip1}</i>	Zellzyklus-Kontrolle	Induzierte Tumorbildung (Fero, Randel et al. 1998)
<i>Ptch</i>	Signaltransduktion	Spontane Tumorbildung in <i>Ptch^{+/-}</i> (Wetmore, Eberhart et al. 2000; Zurawel, Allen et al. 2000)
<i>Pten</i>	Signaltransduktion	Tumorbildung in Kombination mit TRAMP (Kwabi-Addo, Giri et al. 2001)
<i>Atm</i>	Antwort bei DNA-Schädigung	Spontane Tumorbildung in <i>ATM^{+/-}</i> (Spring, Ahangari et al. 2002)
<i>Blm</i>	DNA-Reparatur	Tumorbildung in Kombination mit <i>Apc^{+/Min}</i> induzierter Tumorbildung (Goss, Risinger et al. 2002)
<i>Fen1</i>	DNA-Reparatur	Tumorbildung in Kombination mit <i>Apc^{+/1638N}</i> (Kucherlapati, Yang et al. 2002)
<i>p53</i>	Antwort bei zellulärem Stress	Spontane Tumorbildung in <i>p53^{+/-}</i> (Venkatachalam, Shi et al. 1998)

Abb.27: Tabellarische Übersicht über Gene bei denen eine Haploinsuffizienz nachgewiesen wurde.

Zusammenfassend ließe sich folgendes Szenario vorstellen: *BRCA2* wirkt als haploinsuffizientes Gen in den Mutationsträgern der untersuchten Familien. Die Dosiswirkung scheint im fortgeschrittenen Alter nicht mehr ausreichend zu sein (s. Kap.3.2 für Alter der Mutationsträger), um den Bereich um 9p zu reparieren. Es kommt zu intrachromosomalen Rekombinationen, die durch *repeats* verursacht werden und nicht durch

BRCA2/RAD51 korrigiert werden. Hierbei werden die Gene *TYRP1* und *mPDZ* durch eine Inversion im Bereich *D9S775* und *D9S268* beeinträchtigt.

4.3.2 *mPDZ* und *TYRP1* als Modifikatoren des männlichen Brustkrebs?

Da die Inversion bei allen Mutationsträgern in dem Bereich der Gene *TYRP1* und *mPDZ* (auch als *MUPP1* bezeichnet) lokalisiert sind, könnte es sich bei diesen beiden Genen um Modifikatoren bei männlichen Mammakarzinomen handeln. Wie in den Ergebnissen gezeigt, sind beide Gene als mRNA in lymphoblastoiden Zelllinien nachweisbar. Bei den beiden Genen scheint es sich, zumindest in Lymphozyten, um schwach exprimierte Gene zu handeln. Dies konnte durch vorläufige semiquantitative *Realtime*-PCR-Ergebnisse ermittelt werden.

Bei dem durch die Inversion direkt betroffenen Gen handelt es sich um das *mPDZ*-Gen (*Gene-Card: multiple-PDZ containing gene* GC09M013086). Obwohl keine genauen Kenntnisse über die Funktion bekannt sind, kennt man Interaktionspartner die auf eine mögliche Funktion schließen lassen. Das Gen enthält neben den multiplen PDZ-Domänen offensichtlich keine katalytischen Motive (Ullmer, Schmuck et al. 1998). Die PDZ-Domänen ermöglichen jedoch eine große Vielfalt von potentiellen Bindungspartnern, wobei bisher einige bekannt sind. So konnte gezeigt werden, dass zwei Onkoproteine, die von den DNA-Viren Adenovirus Typ9 und humanes Papillomavirus kodiert werden, an MUPP1 binden. Die Expression von E4-ORF1 und E6 fördert die Zellteilung, was auf eine Interaktion mit MUPP1 zurückgeführt wurde (Lee, Glaunsinger et al. 2000). Die gewonnenen Resultate implizieren, dass MUPP1 vielleicht als eine Art negativer Regulator der Zellteilung fungiert und an der Plasmamembran lokalisiert ist, um das Zellwachstum zu stoppen. Zu den weiteren Interaktionspartnern zählen neben dem Membran-überspannenden Proteoglykan G2 (Barritt, Pearn et al. 2000) und TAPP1, ein Tandem-PH-Domänen enthaltene Protein (Kimber, Trinkle-Mulcahy et al. 2002), auch das Protein des Proto-Onkogens *c-kit* (Mancini, Koch et al. 2000). Dieses bindet spezifisch an die zehnte PDZ-Domäne des *MUPP1* und kodiert für SCF (*stem cell factor*). Bei allen Bindungspartnern stellen die PDZ-Domänen 10 und 13 die spezifischen Interaktionsregionen dar. Neben einem gemeinsamen C-terminalen Valinrest, scheint es keinen besonderen Grund zu geben, warum alle Interaktionspartner hauptsächlich an die zehnte Domäne binden. Beim *c-kit* gehen Mancini et al. davon aus, dass MUPP1 vielleicht Signalmoleküle unterstützt, die in nur sehr geringen Mengen exprimiert werden, um an der Signalkaskade teilzunehmen, die von SCF ausgelöst wird (Mancini, Koch et al. 2000). Durch Sasaki et al. konnte 2003 gezeigt werden, dass ein neues Gen *PCDI*, welches eine

PDZ-Domäne und eine LIM-Domäne besitzt, im menschlichem Brustkrebs erhöht exprimiert ist und in Verbindung mit Lymphknoten-Metastasen gebracht wird (Sasaki, Tsuji et al. 2003).

Das *TYRP1*-Gen (*GeneCard: tyrosinase-related protein 1* GC09P012674), welches in der Inversion der Mutationsträger der Familien 1-3 enthalten ist, ist beim Menschen im Melaninstoffwechsel involviert. Mutationen des *TYRP1*-Gens sind vor allem beim Albinismus bekannt. Man unterscheidet Formen mit generalisierter (OCA: okulokutaner Albinismus) von rein okulärer Beteiligung (OA: okulärer Albinismus) sowie okulokutane Formen mit weiteren systemischen Auffälligkeiten (Hermansky-Pudlak-Syndrom, Chediak-Higashi-Syndrom).

Eine 1-bp-Deletion im *TYRP1*-Gen wurde bei der OCA3 nachgewiesen. Das 7 Exons umspannende Gen ist auf Chromosom 9p23 lokalisiert (Box, Wyeth et al. 1998). Diese Form des Albinismus wurde bislang nur in Afrika beschrieben (Boissy, Zhao et al. 1996). Anhand von Proteinexpressionsstudien wird davon ausgegangen, dass Variationen des TYRP1 Proteins eine signifikante Rolle bei ethnischen Unterschieden der Melanogenese und konstitutiver Hautpigmentierung darstellen (Alaluf, Barrett et al. 2003). Da dieses Gen bereits im Melaninstoffwechsel beschrieben ist, scheint eine Verbindung mit hereditärem Brustkrebs als unwahrscheinlich.

4.4 Ausblick

Die Bruchpunktfragmente müssen als nächstes kloniert werden und sequenziert werden. Es sind bereits genomische BAC-DNA-Banken von einzelnen Mutationsträgern in der Vorbereitung. Die in dieser Arbeit vorgestellten PCR-Proben können dabei als Marker eingesetzt werden, um die positiven BAC-Klone von den Mutationsträgern identifizieren zu können. Als nächstes könnten dann die identifizierten Bruchpunktfragmente sequenziert werden. Diese Sequenzierung gäbe darüber hinaus auch Aufschluss darüber, welche *repeat*-Sequenzen nun genau in diesen Rearrangements involviert sind.

Von Interesse ist weiterhin, inwiefern die Gene *TYRP1* und *mPDZ* (*MUPPI*) eine Rolle in den beschriebenen Rearrangements spielen. Hier könnte durch eine *Realtime*-PCR zunächst festgestellt werden, ob, im Vergleich zu Wildtypen die keine 9p-Anomalie zeigen, ein Unterschied in der Expression der Gene nachweisbar ist. Ein interessantes Gen ist dabei das *mPDZ*-Gen, dessen genaue Funktion bisher nicht geklärt ist. Da bereits ein *PDZ*-Gen, *PCD1*, in Brustkrebstumoren als amplifiziert aufgefallen ist, besteht die Vermutung, dass auch dieses Gen in Mammakarzinomen involviert sein könnte.

5. Literaturverzeichnis

- (2001). "Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease." Lancet **358**(9291): 1389-99.
- Abbott, D. W., M. L. Freeman, et al. (1998). "Double-strand break repair deficiency and radiation sensitivity in BRCA2 mutant cancer cells." J Natl Cancer Inst **90**(13): 978-85.
- Abelson, H. T. and L. S. Rabstein (1970). "Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice." Cancer Res **30**(8): 2213-22.
- Alaluf, S., K. Barrett, et al. (2003). "Ethnic Variation in Tyrosinase and TYRP1 Expression in Photoexposed and Photoprotected Human Skin." Pigment Cell Res **16**(1): 35-42.
- Anelli, A., T. F. Anelli, et al. (1995). "Mutations of the p53 gene in male breast cancer." Cancer **75**(9): 2233-8.
- Antonarakis, S. E., H. H. Kazazian, et al. (1995). "Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A." Adv Exp Med Biol **386**: 19-34.
- Antonarakis, S. E., H. H. Kazazian, Jr., et al. (1985). "DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters." Hum Genet **69**(1): 1-14.
- Baker, S. J., S. Markowitz, et al. (1990). "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." Science **249**(4971): 912-5.
- Ballabio, A., R. Carrozzo, et al. (1989). "Molecular heterogeneity of steroid sulfatase deficiency: a multicenter study on 57 unrelated patients, at DNA and protein levels." Genomics **4**(1): 36-40.
- Barritt, D. S., M. T. Pearn, et al. (2000). "The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2." J Cell Biochem **79**(2): 213-24.
- Bartram, C. R., A. de Klein, et al. (1983). "Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia." Nature **306**(5940): 277-80.
- Baskaran, R., L. D. Wood, et al. (1997). "Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation." Nature **387**(6632): 516-9.
- Baumann, P., F. E. Benson, et al. (1996). "Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro." Cell **87**(4): 757-66.
- Bloom, K. J., H. Govil, et al. (2001). "Status of HER-2 in male and female breast carcinoma." Am J Surg **182**(4): 389-92.
- Boissy, R. E., H. Zhao, et al. (1996). "Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous

- albinism: a new subtype of albinism classified as "OCA3". Am J Hum Genet **58**(6): 1145-56.
- Bondeson, M. L., N. Dahl, et al. (1995). "Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome." Hum Mol Genet **4**(4): 615-21.
- Bongarzone, I., M. G. Butti, et al. (1994). "Frequent activation of ret protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas." Cancer Res **54**(11): 2979-85.
- Box, N. F., J. R. Wyeth, et al. (1998). "Complete sequence and polymorphism study of the human TYRP1 gene encoding tyrosinase-related protein 1." Mamm Genome **9**(1): 50-3.
- Chen, J., D. P. Silver, et al. (1998). "Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells." Mol Cell **2**(3): 317-28.
- Chen, K. S., P. Manian, et al. (1997). "Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome." Nat Genet **17**(2): 154-63.
- Chen, P. L., C. F. Chen, et al. (1998). "The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5287-92.
- Christ, L. A., C. A. Crowe, et al. (1999). "Chromosome breakage hotspots and delineation of the critical region for the 9p-deletion syndrome." Am J Hum Genet **65**(5): 1387-95.
- Cleary, M. L. and J. Sklar (1985). "Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(21): 7439-43.
- Collins, F. S. and S. M. Weissman (1984). "The molecular genetics of human hemoglobin." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **31**: 315-462.
- Connor, F., D. Bertwistle, et al. (1997). "Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation." Nat Genet **17**(4): 423-30.
- Davies, A. A., J. Y. Masson, et al. (2001). "Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein." Mol Cell **7**(2): 273-82.
- Donohoue, P. A., N. Jospe, et al. (1989). "Two distinct areas of unequal crossingover within the steroid 21-hydroxylase genes produce absence of CYP21B." Genomics **5**(3): 397-406.
- Duesberg, P. H., S. Kawai, et al. (1975). "RNA of replication-defective strains of Rous sarcoma virus." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(4): 1569-73.

- Ekstrand, A. J., C. D. James, et al. (1991). "Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo." Cancer Res **51**(8): 2164-72.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-25.
- Elledge, S. J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." Science **274**(5293): 1664-72.
- Ensenauer, R. E., A. Adeyinka, et al. (2003). "Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients." Am J Hum Genet **73**(6): 1027-40.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Fero, M. L., E. Randel, et al. (1998). "The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression." Nature **396**(6707): 177-80.
- Fodde, R. and R. Smits (2002). "Cancer biology. A matter of dosage." Science **298**(5594): 761-3.
- Ford, D., D. F. Easton, et al. (1998). "Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium." Am J Hum Genet **62**(3): 676-89.
- Freije, D. and D. Schlessinger (1992). "A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus." Am J Hum Genet **51**(1): 66-80.
- Friedman, L. S., S. A. Gayther, et al. (1997). "Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population." Am J Hum Genet **60**(2): 313-9.
- Friedman, L. S., F. C. Thistlethwaite, et al. (1998). "Thymic lymphomas in mice with a truncating mutation in Brca2." Cancer Res **58**(7): 1338-43.
- Fuks, F., J. Milner, et al. (1998). "BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF." Oncogene **17**(19): 2531-4.
- Gimenez-Abian, J. F., D. J. Clarke, et al. (2000). "Premitotic chromosome individualization in mammalian cells depends on topoisomerase II activity." Chromosoma **109**(4): 235-44.
- Goss, K. H., M. A. Risinger, et al. (2002). "Enhanced tumor formation in mice heterozygous for Blm mutation." Science **297**(5589): 2051-3.
- Green, E. D., H. C. Riethman, et al. (1991). "Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones." Genomics **11**(3): 658-69.
- Greenberg, F., V. Guzzetta, et al. (1991). "Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous-gene syndrome associated with del(17)(p11.2)." Am J Hum Genet **49**(6): 1207-18.

- Groffen, J., J. R. Stephenson, et al. (1984). "The human c-abl oncogene in the Philadelphia translocation." J Cell Physiol Suppl **3**: 179-91.
- Guanciali Franchi, P., G. Calabrese, et al. (2000). "FISH analysis in detecting 9p duplication (p22p24)." Am J Med Genet **90**(1): 35-7.
- Guzzetta, V., B. Franco, et al. (1992). "Somatic cell hybrids, sequence-tagged sites, simple repeat polymorphisms, and yeast artificial chromosomes for physical and genetic mapping of proximal 17p." Genomics **13**(3): 551-9.
- Hartwell, L. (1992). "Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells." Cell **71**(4): 543-6.
- Hasinoff, B. B., T. I. Kuschak, et al. (1995). "A QSAR study comparing the cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory effects of bisdioxopiperazine analogs of ICRF-187 (dexrazoxane)." Biochem Pharmacol **50**(7): 953-8.
- Heckman, C. A., J. W. Mehew, et al. (2002). "NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells." Oncogene **21**(24): 3898-908.
- Hibi, M., A. Lin, et al. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." Genes Dev **7**(11): 2135-48.
- Higgs, D. R., J. M. Old, et al. (1980). "A novel alpha-globin gene arrangement in man." Nature **284**(5757): 632-5.
- Higgs, D. R., M. A. Vickers, et al. (1989). "A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster." Blood **73**(5): 1081-104.
- Hogdall, E. V., L. Christensen, et al. (2003). "Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study." Cancer **98**(1): 66-73.
- Hollstein, M., D. Sidransky, et al. (1991). "p53 mutations in human cancers." Science **253**(5015): 49-53.
- Howlett, N. G., T. Taniguchi, et al. (2002). "Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia." Science **297**(5581): 606-9.
- Inoue, K., F. Zindy, et al. (2001). "Dmp1 is haplo-insufficient for tumor suppression and modifies the frequencies of Arf and p53 mutations in Myc-induced lymphomas." Genes Dev **15**(22): 2934-9.
- Joshi, M. G., A. K. Lee, et al. (1996). "Male breast carcinoma: an evaluation of prognostic factors contributing to a poorer outcome." Cancer **77**(3): 490-8.
- Jurka, J. (2000). "Repbse update: a database and an electronic journal of repetitive elements." Trends Genet **16**(9): 418-20.
- Juyal, R. C., L. E. Figuera, et al. (1996). "Molecular analyses of 17p11.2 deletions in 62 Smith-Magenis syndrome patients." Am J Hum Genet **58**(5): 998-1007.

- Kastan, M. B., Q. Zhan, et al. (1992). "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia." Cell **71**(4): 587-97.
- Kim, U. J., B. W. Birren, et al. (1996). "Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library." Genomics **34**(2): 213-8.
- Kimber, W. A., L. Trinkle-Mulcahy, et al. (2002). "Evidence that the tandem-pleckstrin-homology-domain-containing protein TAPP1 interacts with Ptd(3,4)P2 and the multi-PDZ-domain-containing protein MUPP1 in vivo." Biochem J **361**(Pt 3): 525-36.
- Kizaki, H. and Y. Onishi (1997). "Topoisomerase II inhibitor-induced apoptosis in thymocytes and lymphoma cells." Adv Enzyme Regul **37**: 403-23.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.
- Kolodner, R. (1996). "Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair." Genes Dev **10**(12): 1433-42.
- Kucherlapati, M., K. Yang, et al. (2002). "Haploinsufficiency of Flap endonuclease (Fen1) leads to rapid tumor progression." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9924-9.
- Kwabi-Addo, B., D. Giri, et al. (2001). "Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11563-8.
- Lakich, D., H. H. Kazazian, Jr., et al. (1993). "Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A." Nat Genet **5**(3): 236-41.
- Lane, D. (1998). "Awakening angels." Nature **394**(6694): 616-7.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-6.
- Larionov, V., N. Kouprina, et al. (1994). "Recombination during transformation as a source of chimeric mammalian artificial chromosomes in yeast (YACs)." Nucleic Acids Res **22**(20): 4154-62.
- Lauer, J., C. K. Shen, et al. (1980). "The chromosomal arrangement of human alpha-like globin genes: sequence homology and alpha-globin gene deletions." Cell **20**(1): 119-30.
- Lee, S. S., B. Glaunsinger, et al. (2000). "Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins." J Virol **74**(20): 9680-93.
- Levine, A. J., J. Momand, et al. (1991). "The p53 tumour suppressor gene." Nature **351**(6326): 453-6.
- Li, X. M., P. H. Yen, et al. (1992). "Characterization of a low copy repetitive element S232 involved in the generation of frequent deletions of the distal short arm of the human X chromosome." Nucleic Acids Res **20**(5): 1117-22.

- Lifton, R. P., R. G. Dluhy, et al. (1992). "A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension." Nature **355**(6357): 262-5.
- Lim, D. S. and P. Hasty (1996). "A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53." Mol Cell Biol **16**(12): 7133-43.
- Linzer, D. I. and A. J. Levine (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." Cell **17**(1): 43-52.
- Livingstone, L. R., A. White, et al. (1992). "Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53." Cell **70**(6): 923-35.
- Loeb, L. A. (1991). "Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis." Cancer Res **51**(12): 3075-9.
- Lupski, J. R. (1997). "Charcot-Marie-Tooth disease: a gene-dosage effect." Hosp Pract (Off Ed) **32**(5): 83-4, 89-91, 94-5 passim.
- Lupski, J. R. (1998). "Charcot-Marie-Tooth disease: lessons in genetic mechanisms." Mol Med **4**(1): 3-11.
- Lupski, J. R. (1998). "Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits." Trends Genet **14**(10): 417-22.
- Malcolm, S. (1996). "Microdeletion and microduplication syndromes." Prenat Diagn **16**(13): 1213-9.
- Mancini, A., A. Koch, et al. (2000). "The direct association of the multiple PDZ domain containing proteins (MUPP-1) with the human c-Kit C-terminus is regulated by tyrosine kinase activity." FEBS Lett **482**(1-2): 54-8.
- Mancini, M., M. Cedrone, et al. (2000). "Use of dual-color interphase FISH for the detection of inv(16) in acute myeloid leukemia at diagnosis, relapse and during follow-up: a study of 23 patients." Leukemia **14**(3): 364-8.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, et al. (1980). "The molecular genetics of human hemoglobins." Annu Rev Genet **14**: 145-78.
- Mazzarella, R. and D. Schlessinger (1998). "Pathological consequences of sequence duplications in the human genome." Genome Res **8**(10): 1007-21.
- Melo, J. V. (1996). "The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype." Blood **88**(7): 2375-84.
- Melo, J. V. (1996). "The molecular biology of chronic myeloid leukaemia." Leukemia **10**(5): 751-6.
- Mercer, W. E., M. T. Shields, et al. (1990). "Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(16): 6166-70.

- Milde-Langosch, K., A. M. Bamberger, et al. (2000). "Expression of cell cycle-regulatory proteins rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members." Int J Cancer **87**(4): 468-72.
- Milner, J., F. Fuks, et al. (2000). "The BRCA2 activation domain associates with and is phosphorylated by a cellular protein kinase." Oncogene **19**(38): 4441-5.
- Milner, J., B. Ponder, et al. (1997). "Transcriptional activation functions in BRCA2." Nature **386**(6627): 772-3.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**(2): 293-9.
- Miyoshi, H., M. Nakau, et al. (2002). "Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice." Cancer Res **62**(8): 2261-6.
- Modrich, P. (1995). "Mismatch repair, genetic stability and tumour avoidance." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **347**(1319): 89-95.
- Morris, G. F., J. R. Bischoff, et al. (1996). "Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 895-9.
- Nathans, J., S. L. Merbs, et al. (1992). "Molecular genetics of human visual pigments." Annu Rev Genet **26**: 403-24.
- Naylor, J., A. Brinke, et al. (1993). "Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions." Hum Mol Genet **2**(11): 1773-8.
- Naylor, J. A., D. Buck, et al. (1995). "Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions." Hum Mol Genet **4**(7): 1217-24.
- Neitz, M. and J. Neitz (1995). "Numbers and ratios of visual pigment genes for normal red-green color vision." Science **267**(5200): 1013-6.
- Nowell, P. C. (1997). "Genetic alterations in leukemias and lymphomas: impressive progress and continuing complexity." Cancer Genet Cytogenet **94**(1): 13-9.
- Nunez, G., L. London, et al. (1990). "Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines." J Immunol **144**(9): 3602-10.
- Orkin, S. H. and H. H. Kazazian, Jr. (1984). "The mutation and polymorphism of the human beta-globin gene and its surrounding DNA." Annu Rev Genet **18**: 131-71.
- Osorio, A., A. Barroso, et al. (2000). "Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families." Br J Cancer **82**(7): 1266-70.
- Paulovich, A. G., D. P. Toczyski, et al. (1997). "When checkpoints fail." Cell **88**(3): 315-21.

- Pentao, L., C. A. Wise, et al. (1992). "Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit." Nat Genet **2**(4): 292-300.
- Perucho, M. (1996). "Cancer of the microsatellite mutator phenotype." Biol Chem **377**(11): 675-84.
- Phear, G., N. P. Bhattacharyya, et al. (1996). "Loss of heterozygosity and base substitution at the APRT locus in mismatch-repair-proficient and -deficient colorectal carcinoma cell lines." Mol Cell Biol **16**(11): 6516-23.
- Pich, A., E. Margaria, et al. (1996). "DNA ploidy and p53 expression correlate with survival and cell proliferative activity in male breast carcinoma." Hum Pathol **27**(7): 676-82.
- Polack, A., R. Feederle, et al. (1993). "Regulatory elements in the immunoglobulin kappa locus induce c-myc activation and the promoter shift in Burkitt's lymphoma cells." Embo J **12**(10): 3913-20.
- Ponting, C. P. (1997). "Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants." Protein Sci **6**(2): 464-8.
- Ponting, C. P., C. Phillips, et al. (1997). "PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites." Bioessays **19**(6): 469-79.
- Portella, G., D. Salvatore, et al. (1996). "Development of mammary and cutaneous gland tumors in transgenic mice carrying the RET/PTC1 oncogene." Oncogene **13**(9): 2021-6.
- Rabbitts, T. H. (1994). "Chromosomal translocations in human cancer." Nature **372**(6502): 143-9.
- Rayson, D., C. Erlichman, et al. (1998). "Molecular markers in male breast carcinoma." Cancer **83**(9): 1947-55.
- Reiter, L. T., T. Murakami, et al. (1997). "The human COX10 gene is disrupted during homologous recombination between the 24 kb proximal and distal CMT1A-REPs." Hum Mol Genet **6**(9): 1595-603.
- Rowley, J. D. (1973). "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." Nature **243**(5405): 290-3.
- Sasaki, M., N. Tsuji, et al. (2003). "PCD1, a novel gene containing PDZ and LIM domains, is overexpressed in human breast cancer and linked to lymph node metastasis." Anticancer Res **23**(3B): 2717-21.
- Savelyeva, L., A. Claas, et al. (1998). "An interstitial tandem duplication of 9p23-24 coexists with a mutation in the BRCA2 gene in the germ line of three brothers with breast cancer." Cancer Res **58**(5): 863-6.
- Savelyeva, L., A. Claas, et al. (2001). "Constitutional genomic instability with inversions, duplications, and amplifications in 9p23-24 in BRCA2 mutation carriers." Cancer Res **61**(13): 5179-85.

- Sawyers, C. L., J. McLaughlin, et al. (1994). "The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth." *Cell* **77**(1): 121-31.
- Schiavon, F., M. L. Mostacciuolo, et al. (1994). "Non-radioactive detection of 17p11.2 duplication in CMT1A: a study of 78 patients." *J Med Genet* **31**(11): 880-3.
- Schwartz, D. C. and C. R. Cantor (1984). "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis." *Cell* **37**(1): 67-75.
- Seeger, R. C., G. M. Brodeur, et al. (1985). "Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas." *N Engl J Med* **313**(18): 1111-6.
- Shaffer, L. G. and J. R. Lupski (2000). "Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans." *Annu Rev Genet* **34**: 297-329.
- Shapiro, L. J., P. Yen, et al. (1989). "Molecular studies of deletions at the human steroid sulfatase locus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(21): 8477-81.
- Sharan, S. K. and A. Bradley (1997). "Murine Brca2: sequence, map position, and expression pattern." *Genomics* **40**(2): 234-41.
- Sharan, S. K., M. Morimatsu, et al. (1997). "Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2." *Nature* **386**(6627): 804-10.
- Shizuya, H., B. Birren, et al. (1992). "Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(18): 8794-7.
- Simon, D. B., R. S. Bindra, et al. (1997). "Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III." *Nat Genet* **17**(2): 171-8.
- Smit, A. F. and A. D. Riggs (1996). "Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1443-8.
- Smits, R., P. Ruiz, et al. (2000). "E-cadherin and adenomatous polyposis coli mutations are synergistic in intestinal tumor initiation in mice." *Gastroenterology* **119**(4): 1045-53.
- Song, W. J., M. G. Sullivan, et al. (1999). "Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia." *Nat Genet* **23**(2): 166-75.
- Spring, K., F. Ahangari, et al. (2002). "Mice heterozygous for mutation in Atm, the gene involved in ataxia-telangiectasia, have heightened susceptibility to cancer." *Nat Genet* **32**(1): 185-90.
- Stehelin, D., H. E. Varmus, et al. (1976). "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA." *Nature* **260**(5547): 170-3.
- Sung, P. (1994). "Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein." *Science* **265**(5176): 1241-3.

- Swift, M., D. Morrell, et al. (1991). "Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia." N Engl J Med **325**(26): 1831-6.
- Tavtigian, S. V., J. Simard, et al. (1996). "The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds." Nat Genet **12**(3): 333-7.
- Tomlinson, I. P., M. R. Novelli, et al. (1996). "The mutation rate and cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14800-3.
- Tong, Q., S. Xing, et al. (1997). "Leucine zipper-mediated dimerization is essential for the PTC1 oncogenic activity." J Biol Chem **272**(14): 9043-7.
- Tonin, P. N. (2000). "Genes implicated in hereditary breast cancer syndromes." Semin Surg Oncol **18**(4): 281-6.
- Tuddenham, E. G., R. Schwaab, et al. (1994). "Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition." Nucleic Acids Res **22**(22): 4851-68.
- Tutt, A., D. Bertwistle, et al. (2001). "Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences." Embo J **20**(17): 4704-16.
- Ullmer, C., K. Schmuck, et al. (1998). "Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein." FEBS Lett **424**(1-2): 63-8.
- van der Burg, M., B. Smit, et al. (2002). "A single split-signal FISH probe set allows detection of TAL1 translocations as well as SIL-TAL1 fusion genes in a single test." Leukemia **16**(4): 755-61.
- Veitia, R., M. Nunes, et al. (1997). "Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1." Genomics **41**(2): 271-4.
- Venkatachalam, S., Y. P. Shi, et al. (1998). "Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation." Embo J **17**(16): 4657-67.
- Vidarsson, H., E. K. Mikaelssdottir, et al. (2002). "BRCA1 and BRCA2 bind Stat5a and suppress its transcriptional activity." FEBS Lett **532**(1-2): 247-52.
- Vnencak-Jones, C. L. and J. A. Phillips, 3rd (1990). "Hot spots for growth hormone gene deletions in homologous regions outside of Alu repeats." Science **250**(4988): 1745-8.
- Vnencak-Jones, C. L., J. A. Phillips, 3rd, et al. (1988). "Molecular basis of human growth hormone gene deletions." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(15): 5615-9.
- Weber-Chappuis, K., S. Bieri-Burger, et al. (1996). "Comparison of prognostic markers detected by immunohistochemistry in male and female breast carcinomas." Eur J Cancer **32A**(10): 1686-92.
- Welsh, P. L., K. N. Owens, et al. (2000). "Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2." Trends Genet **16**(2): 69-74.

- Wetmore, C., D. E. Eberhart, et al. (2000). "The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched." Cancer Res **60**(8): 2239-46.
- Wick, M. R., H. Sayadi, et al. (1999). "Low-stage carcinoma of the male breast. A histologic, immunohistochemical, and flow cytometric comparison with localized female breast carcinoma." Am J Clin Pathol **111**(1): 59-69.
- Wieser, R., U. Schreiner, et al. (2001). "Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of 3q21 rearrangements in myeloid malignancies." Genes Chromosomes Cancer **32**(4): 373-80.
- Wood, R. D. (1996). "DNA repair in eukaryotes." Annu Rev Biochem **65**: 135-67.
- Yang, W., K. S. Klos, et al. (2003). "ErbB2 overexpression in human breast carcinoma is correlated with p21Cip1 up-regulation and tyrosine-15 hyperphosphorylation of p34Cdc2: poor responsiveness to chemotherapy with cyclophosphamide methotrexate, and 5-fluorouracil is associated with Erb2 overexpression and with p21Cip1 overexpression." Cancer **98**(6): 1123-30.
- Yen, P. H., X. M. Li, et al. (1990). "Frequent deletions of the human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements." Cell **61**(4): 603-10.
- Yu, V. P., M. Koehler, et al. (2000). "Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation." Genes Dev **14**(11): 1400-6.
- Zhu, Y., P. Ghosh, et al. (2002). "Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment." Science **296**(5569): 920-2.
- Zimmermann, P., K. Meerschaert, et al. (2002). "PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane." Mol Cell **9**(6): 1215-25.
- Zimran, A., J. Sorge, et al. (1990). "A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder." J Clin Invest **85**(1): 219-22.
- Zurawel, R. H., C. Allen, et al. (2000). "Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice." Genes Chromosomes Cancer **28**(1): 77-81.

6. Abkürzungen

µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
Abb.	Abbildung
ACEDB	„A C. elegans Data Base“
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	künstliches Bakterien-Chromosom („bacterial artificial chromosome“)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CEPH	Centre d'Etudes du Polymorphisme Humain
Contig	Kurzwort für unmittelbar aufeinanderfolgende („contiguous“) Subklone
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DABCO	1,4-Diazobicyclo (2.2.2) octan
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EST	„expressed sequence tag“
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxymethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

ICRF-154	4,4'-(1,2-ethanediyl)bis(2,6-piperazinedion)
kDa	Kilo-Dalton
kb	Kilobasenpaare
LINE	„long interspersed repeated sequence“
LOH	„loss of heterozygosity“
M	Molarität (mol/l)
Mb	Megabasenpaare
ng	Nanogramm (10^{-9} g)
nm	Nanometer (10^{-9} m)
PAC	vom Phagen P1 abstammendes künstliches Chromosom („P1-derived artificial chromosome“)
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SINE	„short interspersed repeated sequence“
SSC	„standard saline citrate“
STS	„sequence tagged site“
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris (hydroxymethyl)-methylamin
tRNA	Translations-Ribonukleinsäure
U	Units. Definition für Restriktionsenzyme: Die Menge Enzym, die 1 μ g DNA in 60 min bei geeigneten Bedingungen vollständig verdaut. Definition für DNA-Polymerasen: Eine Unit ist die Aktivität, die zur Inkorporation von 10 nmol dNTPs in ein säure-präzipitierbares Produkt innerhalb von 30 min unter geeigneten Versuchsbedingungen führt.
YAC	künstliches Hefechromosom („yeast artificial chromosome“)

7. Anhang

A. Verzeichnis der BAC-Klone

BAC-Name (RPCI-11 Bank)	alternativer BAC-Name	Größe (bp)
412B23	al161788	170460
140C18	al133547	108265
12D24	al135786	156592
87N24	al135790	176273
292B8	al162233	179833
167C5	al137069	171852
446F13	al162422	65311
287F15	ac037423	171029
165C19	al355672	86371
23D5	al451129	76028
527D15	al513422	166169
352F21	al445586	198498
378H16	al391864	30920
6H18	al137851	139182
143N16	al353733	95442
744O14	al354722	126045
176P17	al157826	149087
664D14	al353639	103822
163F8	al133214	154621
299F23	al133479	165498
382H24	al161449	169660
187K14	al353711	79351
16O8	ac013781	160712
19A22	al441884	137783
50C21	al356054	37170
19G1	al390723	94643
536I1	al354952	54764
109M17	al162413	114302

B. Verzeichnis der Primersequenzen für PCR

Positiv getestete Proben sind rot markiert.

BAC-Probe	Primer: for	Primer: rev
ac013781_31	CAGGGCCAGTTTCTAAGTATGG	CTTTTCCTGTCTTTCCAACAGG
ac013781_41	CCCCAGAAAAGAAAAGTGGG	TGAAAATATTTGCCAGTTGC
ac013781_69	CTTTTTCTGGACCCTAAATCC	GCAATGCTCATTTTGGCC
ac013781_81	AACTGCAAATGGCTTGTATTG	TCATTCTCTTCCCTGAACTCC
ac013781_96	GGTCTCATCAGCATGCATTG	TGAAAATGAATGAGCATGC
ac013781_101	TTTTCCCCTCCCCTGAAG	GAATCTTGAACAAGCACACTGC
ac013781_113	CATTTCTGACATTAGTCGCTGC	GGGCGAGCTGTATAATTAATGG
ac013781_133	GGCCACTTCAGTGAAGCTCCTC	AGACAAGACGTGAACATTGGG
ac013781_144	ACAGGTATCAAAGGGCTACCG	ACCGTCAGGTTCTCAACTG

ac013781_153	CATTGATCTTTCCCATTAACC	TCCTCATTCCCATGTTTAACG
ac037423_01	CAAGCTTTTTTTGGTTAAACGG	TTTTGCCATGAGCAGATGAG
ac037423_23	CCTGTGACTCAGTCTTGCTCC	AGCTTCTTGGAGAGGTTCCAGG
ac037423_34	AGATGGCAGTTGGAAGATGG	AATAATTATGCACCTTCGGGG
ac037423_47	CCCATAATATGGAGCTCAGTCC	TGAAAAGCCATGGTGTTTAGG
ac037423_55	CCATTTTCGGACATTACCCAC	ATGTTTCACACCACTTTGTTG
ac037423_66	TTTTGTGAACAGACCACAGATC	GGGGGTCATTCTAACGGC
ac037423_75	TGGTCTGCTATTACCACTGTGC	ACCCCCTGAACTAATCAAAG
ac037423_75	GGTTCATCAGCTTCTTTCTTGG	ACCCCCTGAACTAATCAAAG
ac037423_83	ATGCAACGAACAGCAAAGG	GCACTCTTTTGACGTTCTTGC
ac037423_94	GGTGTGGGCAGATTTTGG	TCATGGGCCTTAGGGACTC
ac037423_107	TATTTACACTTAAAGTGGCCGC	TTTTCACATTTTCTCCTCCCC
ac037423_124	CTTTTTCTGGACCCTAAATCC	TCGAGATTGCTGAACTGTGC
ac037423_136	TCTGAACAGAAAGTGATGGCC	CCATGTACCTAGCATGCTGG
ac037423_146	TCCCTGTTGTTGTTACTTGTGG	TGCATGTAAGTCAAATGCTGTG
ac037423_153	GGAAGACCAGAGACATTGAACC	GAGAAGCACGATGGGAAGAG
ac037423_155	ATTAGCAAACACAGGTGGCC	TTTGGATCAATATTATGCCCC
ac037423_164	GCTCACAGACAAGGGGCTAG	ATAAGGCATATGGCTGGCAG
al133479_02	TCCCCTGACCTAATTTGTGC	TCCATTTCTACAATGTTGCTGG
al133479_03	TCCCCTGACCTAATTTGTGC	GGGGGTCATTCTAACGGC
al133479_04	GAAGGGATGAGGAAGAAATCG	TGTTTTCAGGGAATAATCCAGG
al133479_102	TACTCTGTTGCCAGGCTG	AAACTTTTTCTTGTCTCCACC
al133479_20	ACAGGTATCAAAGGGCTACCG	TTTGGTTCACCACATTCTTCC
al133479_05	TGTGAGGAAGAGGAGGCG	TCTTGGGTACCAGAAGCTGG
al133479_06	AAACCTCAGCACCTTCAGTAGC	GGTGTCTGCCCTATTATGAGG
AL133479_07	GGCAGACACATTTAGCCTCC	AGACAAGACGTGAACATTGGG
al133479_89	TGGTTTCAATAGGAGGACAGTG	CCAGATACCATACGTGTTACCC
al133479_149	GATATGTGTGGCATGAGGTCC	TGTGTACGGAGTCATTTTGTG
al133479_122	GCCCCATCAACAAATAGGTG	TTCCTTGAGTTCAATGTTGG
al133479_28	GATGGAGATCACTAACGGTGC	TCATGGGCCTTAGGGACTC
al133479_104	TTATGAATGCTGCAGTTCGTG	AGAGATGGAATTCACAAATGGG
al133479_59	TGGGAAATGCAATTTAAAACC	AGGGTGGTAATCTTTTGAGCTG
al133479_61	TGACTCAATCAACCACAATTCC	TGACTTCAGACTCTCACCAGG
al133479_72	GGAAAAAGCAACATTTTGACC	TCTGGTCTTCTGTCCCG
al133479_156	CCAAAAGATCAAAACAATTGG	ATGCATGTAATAGGTGACCTGG
al135790_105	ATATCCTTTTGGCAGCCATG	TGTGCATCTTTCTGCTGACC
al135790_116	TCCAAAATATTTCTCCAGCC	TCCCTTTGCAGAAATTTAGAGC
al135790_125	CACCTGAAAGGAAGAGATTTGG	TGTAAGAGTGCTGCCCAGG
al135790_137	ATGCCGCTCTGTTTCCTG	TGCTGACAAATCCAACCTACC
al135790_147	TGGGTCCAGATATCAAAGTGC	TACAAGGACAAACAAGCCCC
al135790_158	TTGTTACAAGCCATTGAATTGC	TATTCCAAGAGGAGGAAGTTGG
al135790_166	CAACTTTGAACGTTGATGAAGG	TGGAAACCTTCTACCCCTC
al135790_84	TGATCCATCAGCACTTCAGC	TGAAGGATAGGCATTCCCAC
al135790_75	CTCTCCCACAAATTTCAAAGG	GATTTGGGATGGACATTTGC
al135790_95	TTGAAATACTGTGCATGCTTCC	GACCTTCAGGATTTGAGTTGG
al137069_61	CAGATAAGAGCAAGCCTGGG	GAGGCCTTGCTTCAGCAG
al137069_01	GAAAGATTTGATGAGCAAACCC	AAATTGTCTGCATTTTGGCC
al137069_15	AGTTAGCGAACTTGAAAATGC	TCTTCAACAAAGGTTTGTGG

al137069_25	TTGGCCTGGGTTTTTCTTC	AAGAAGGCATCACAATCATGG
al137069_37	TGCAGGCTACGCAGTATTTG	CAGGTTACTGGAACAAGCAGC
al137069_38	TGCAGGCTACGCAGTATTTG	AGCACCTTCCTAGGTTTTTCC
al137069_47	ATTCAAAAGGATGGGCAGG	TTTTGCAAAAAGGTGCCTACC
al137069_56	TCCTTGCAGCTGTACATTGC	AAAAGCAACCAGTGTGTTTGC
al137069_64	AATAAAAAAATCGAGGAGGGG	TTAAATCCCAAATTGCAAAGG
al137069_66	TTGCTTTTGAGAGAGATAGCCC	AATCGTGACAGATCCACTTGG
al137069_80	TCATTTTGAGAACCACAAGTGG	GCTTGCTCTCATTTTGTGAGG
al137069_95	AATTCAATTGTGCCAAAGCC	TCTGTCTGTGTGTTTTGCTG
al137069_117	TGAAATGCTCCCAGTGTGAG	CCAAAAGCCTATAGCATGATCC
al137069_129	TGTCCTACCCCATACAGC	AGCAAATGAAAAACAAAGTGC
al137069_145	TGGCAAGAATTTCTCTCCTAGG	TTAAAAAATTAACCAAGGGCG
al137069_152	TCACCATTTGAAAAGGAGGG	AGCCGTGAAGTGTGGCTC
al137069_170	TGGAGGCATAGAGAAGGGG	GGCAAGCAGACCTCATGG
al137851_128	CCCCCTGCATCATATTTACC	TTCAGGCACTCAAATATTTTTG
al137851_103	CTTTCAAGATTGAATGTGTGGG	CAGCCAAAGTCATACCAGTCTG
al137851_02	ACAAATCATCCCGAAGGAAG	TGCAATAATGGCAATTCTCG
al137851_09	GGAAGAGACGTGCAAGGAAG	CACTGTCTGAGAGCCTATGGC
al137851_17	CAAAGAGCTCTGGGGTTTTG	AACTAAAGTCATCTTGCAGGGG
al137851_123	AATGGGATGAGTGACAATTCC	CTTCTGTGATAGAAATGCACCG
al137851_25	CTTACTTCCATTTCGCTTGGC	GGTGCTAACCAAACAGAACTCC
al137851_31	GACTAACAGCAGGCTCGAGG	AGCTTCAGGATTAGGTAGTGGG
al137851_37	ACAACATAAAAAACAGGCCATG	TGTTGCACACTTATTGTTCTGG
al137851_43	TCTTTTTGCATGTGTTGAATCC	ATTTGTGTTGGGGATGCTTC
al137851_50	CTTATCAGCTCAGTGCATACGC	TTGACACTGGACTTCACTTCAG
al137851_58	GAGCCTTGGCATTCTCTGTC	TTAGCACCTGTCCCAGCTG
al137851_66	GGTTGAAGAGCACATTAATGC	AAGAATGTCAAGTGGCTCATCC
al137851_72	GGAAGAGTTCAAACGCAAGG	CTTTAATAAGACCCGTGCATC
al137851_84	TTGTCCACCCATTGTCCAC	AATGCTCAGCTGATAGAAAGGC
al137851_93	CATAGCTTCCAATATCAGCAGG	AAGTCAAATTGTCCCTCTTTC
al137851_98	GCTGGTTGGCAAAAATGTG	GCTTCCTTTCCAGGAAGTCC
al137851_110	CTGCATGTGTCCCAAATTTG	TACAGCATGGGTGATGATGG
al137851_116	GGGGAAATTGGTTCCCTG	ACATGACTCCAGAAAATGTTGC
al138753_73	CAAAAATGCCAACAGTGGG	ACCCTATAACCATGTTGGAGGG
al138753_74	AGACATTGGCTTTTTATTTGGC	TTTTAAGACTCAGGCTTCTGCC
al138753_76	AATGTCTGTGATATCTGCACGG	TCTCAGGCCAAAATACAATGG
al138753_79	CATCTCTTGCCATTTCTCTG	AACATATGCGCAAGCAAGG
al138753_82	GTTTTGACAGTAGGTTTTCCCG	AGGAAGGCAGAGAAAGAGGC
al138753_86	AATCAGGAAGTGGCTTCAAGG	ATGTTCTCCATATGCCTTCTCC
al138755_08	GTTTTCTCTCTCATGATTGGG	AACGTCTGGCCCTGAAGAC
al138755_20	TTTCACATGAATACTGCCAAGG	GCTCATACGACCCCTACTTCC
al138755_42	TATAGGGCTCACCTAATGGTCC	TGGTGGACATGTCCATATGG
al139114_05	AGGATAGCTGCTGTGCGG	TTGGCATTCTTTCTCCAGC
al139114_130	ACAACAAGGGTGTCTGGGAG	TGACATTTGGAATTCTCCTGC
al157826-01	GCCTTCCGAGGAGTTCTTG	GAACAATTTTTCCATCTCCACC
al157828_87	CCAATATCAAGGGAAGTGAGG	TTCTTTCTGGCCTCATTTAACC

al157828_78	AGCAGAACCATGCCATAACC	TTGTCCTCCCAGGAGATGAG
al157828_50	CCCAGAAGGCAGCTTTACAG	TCCAACCTTCTTGCCAATTC
al157828_31	CTGCTGGAAATTTTAAGGATGG	TTTGACCTTTGGGAAAAGTG
al161788_04	GAGAACGCTTGTTATAGGTGGG	TTATGAGTGCCAGTTATGGCC
al161788_14	AGCTCATTTGACCCATCCAC	ATCACCAATTGTCTCATTCCG
al161788_23	TTTCACAAAACAACCTTTGCC	CTTCCCCATCTCCCTTAAG
al161788_30	AGAAAAGTGACCATTTGCTGG	AACAGACTGCCCTTTGGATG
al161788_31	TGAAGCTACAGTGATAACCAGG	AATGGAAACAACAACAGACTGC
al161788_42	TGAGAACCAGATGGCTAGCC	TGCTCAACTGCAGAGAAAAGC
al161788_46	AATGCAGTCATCATCAGGACC	AGTTTGGCACCAGGATGTC
al161788_112	CTTCCTTCTCAATCCTCATCAC	TGATGTTTTGTTGCTGCTATTG
al161788_55	TGCAGGACATAATCTGGCAG	GTCCAGATTTGCTAATGGCTG
al161788_61	GCATGACACAAAAGAGGAAAC	AAAATACTTCCATGGTTCCTGG
al161788_74	ATTAAGGCAATGAGTATGGGG	CTCTATTCCAATTTCCCTGCC
al161788_22	TGTAAGGAAGCCCTGGAATG	TTAGTACCCTCCATTGGCTCC
al161788_115	GGGTGGATACACTGAAGAGAGG	CTTTGAAAGAAAATCTGGGTGG
al161788_04	GAGAACGCTTGTTATAGGTGGG	CAGACGAAGTTTCCCTGAATG
al161788_23	TATTCGAAGGTTCCGGCAGTC	TAGGGGGAAAATATGGTCTGC
al161788_30	AGAAAAGTGACCATTTGCTGG	AACAGACTGCCCTTTGGATG
al161788_43	GCATGAAGGAAACACTTAAGGG	TCCTCAGAGCATTGCACAAG
al161788_105	ACGTGTTTCTAATTGTGCTTGC	GGTGACCTCTCAGATGTGAGG
al161788_117	GGGTTACCTTAGGCGGAGAC	CCCCACTCACATTCTGGTG
al161788_34	GTTTCTGCACCTACAATCTCC	TTTGGCCTCACCTTGATAC
al161788_22	TTTAGACATTGCATTCCCAGC	GATCAGGGCACAGGGTTG
al162233_94	CAGACAGGCTTAGGAGGCAC	GGGTACATCACCCATCCAAC
al162233_20	ATCTGATGCCTGACAAATTGG	TCTTTTTCGGGTTGCAATTC
al162233_07	CTTCCTCAATTCATTTCTTGGG	AATGTGGGAGTGCTGGAAAC
al162233_25	TTCCATCACTGCTGGATTACC	CTCTGGAAGGTAGGCCTGC
al162233_45	TGTTTTCCACATTCTTTTGTGC	ATCTCCCACTGACGGTGATC
al162233_46	TGTTTTCCACATTCTTTTGTGC	CCCCTTTCAGTACAGAATCACC
al162233_67	TTATGAAAAATGGGATCCAAGG	AGCATTCTCCCAAATATTTTCG
al162386_116	ACTCTCCTAGCCTTAGGCCG	AAGCAAATTGGCCACCATAG
al162386_152	AGCTCCCCATGGTGTTACAC	GGTCAGCAAAGTCCTTTTGC
al162386_04	AGTGTTACCATCAATTTTTGC	AGCTAATCCCTTTGAACATGC
al162386_13	CCATTTTCCATGCTGTTGC	TGCGTATTGACAAAAATCC
al162386_23	CAGTGTTCCCTGACATACATGGG	GTTTGCTGTTATCATTGCTGC
al162386_80	TACAGAAATTTTGGGTGAAAGG	CTTAGGGGCTCTCACTGCC
al162413_191	TGAGTGTTGATGATGAGCAATG	TTTGGCACCAAATGTCTGAG
al162413_206	TCCATCTCACATTCCTTGAGG	AGTATCTTGTCTGGCTTTGGC
al162413_177	CAATACGTGAAATTGTGTTTGC	TCTTGAACTAACATCCCCTG
al162413_03	CCACCTACGAAAAGAGCTCG	TGTATTCGCCTTACATCAGGG
al162413_177	CTTTCAGTGGAGAGATGGTGG	CCTTCAGTTTTTCCGTAAGTCC
al162413_39	TTCAGCTGAAGCCTTGGG	TGCAAAAAGTCACTTTTCCC
al162413_29	CTTTTCTTTTCAAAGCCACCC	TTGTCTGCACTCCACTCCAG
al162413_55	TGGTGGGAATTACATCCTAACC	CAGCCTCCACACCAGAAAAG
al162413_64	ACCCCTCCCCACAATAGATC	TGGGTATGACTGCATCTTGC
al162413_83	CGATTCCCAGAACAGTAAAAGG	TCTTTGTGTGAGGAAGTTGCC
al162413_132	TGAAAATTCCTTATCCATTGC	TACCATGAAGGAAAAAACTGCC

al162413_144	TTGAAAATGAATCCACATTTTG	ATGCCTACGTGGTCCTTTTG
al162413_152	TTGTGAAATTCGCTTTGCAG	ATGGTTCCACCACTTTCTGC
al162413_163	TGTAACATCAGTGTGGACATGC	CTGGCCAAGGTCCCTCTAG
al162413_223	TTTTTTTTTCCACTCGGCAC	ACAGCCAGGGAAACACAAAG
al162413_235	AGAGAGAAGTTGGAAGGCTGG	GAGGGCATTATTCCTTTTTGC
al162413_248	AGTAGGAGGAACAGAAGACCCC	GACAAAAATCCCATGAGAAAGC
al162413_260	TTGAACATGTTCTCCTTTGGC	TTCTCATTGGCAGAAAAGTGC
al162413_273	GAAGATGGGGAAAAGCCTTC	GAGGCTGTGGAGATCAGTTTG
al162413_282	GGTTTCTGCACCTACAATCTCC	CACTCAGATGTAAAGGAAGCCC
al162413_300	TTGACTTTGCCTACCACATCC	CTCCTTGACACCAAAAATAGGC
al162413_309	GCTTCCGTCTTCTCCACAG	GTGAGTCTAGGGCCTGCAAG
al162422_04	CTTAGGGGGAGGTGGAAGAG	CCCAAGTTTTAGGTATGCAACC
al162422_13	CTGGGAGACCAAAGAATAGGG	GGAAGCAAATTATGCTACCTGG
al162422_26	CAGTGGCTTTCTTGATTGAGC	TCATTTGCCCACTAAGAGGG
al162422_31	AGCCTGGAAAACACACAAC	CTTTGCCATTTCTGTCTCTGC
al162422_50	ATTCCAGAATAAACATGGGGC	TTGCTTTGGCCACTTATTC
al162422_59	TCTGTGAAGTTGCCTTTCCC	GTGGGAGGGGTACTTAGAAAGG
al162422_05	GTGGGAGGGGTACTTAGAAAGG	TCTGTGAAGTTGCCTTTCCC
al162422_32	GCCAACACATGTTATTTGGTG	TATGCCATTCAACAGTCAACTC
al353595_05	AGCAATTGAGACATGCTTTCC	ATAGGCAAAGGATTCTGTTTGC
al353596_158	TCTACCGGCCATATTTTAGGC	TGCACCCCATTATTTCTAATCC
al353597_71	CTACTTTTGCCAGAGCCTG	TTCATATTTTGCTTGGTGTTC
al353952_05	TACCAGCTAGAAAGTCCAAGGC	TTTGCAGATTTTCAAAGGGG
al353952_10	TCTGCAAACAAGAACAGAGAGC	ATCTGAAGAGGGTGGACGG
al353952_18	TAAAGACAGGCTGGGACACC	GCAAAAGCACTTATGATGTCTG
al353952_25	AAATTGCCAGGAGAATGGG	GTGTAATTCTGCAGAACAGCAG
al353952_35	TTTTGGGGTCTTTGTAAAGTCG	AGTCCCATGGTCACATTTGC
al353952_36	TTTTGGGGTCTTTGTAAAGTCG	AGTCCCATGGTCACATTTGC
al353952_41	ATGCATTTTGAGTGTGAAGCC	AAACAATATGTAGGGTTTGGGC
al353952_51	TGTTTAGAGGGAGCAAAAGAGC	GGTGCAACTGCAGCACAC
al353952_61	ACCACAGTGAGTGATCATA CGG	AACGAAATGGGTTGGACAAC
al353952_86	CCAAGCAAGGGCAGTAGAAG	CATTTTGAAGAAGTCTTTGCC
al353952_101	TGTGAAGAGTTTGCAGGCTG	AAGCAGCACTACCTAGCCATG
al353952_112	CTCATAAACCTCACCTTGGTCC	AGCTTCTATGAATCGAAAATGG
al353952_120	TCTTGGAACATAACATCCCCTG	TTCTTTGAAGGAACTCCATTCC
al353952_130	GACAGAGGTCTAATTTCCGGG	GGCAGAAACAAATGAAATTTG
al353952_143	TGCAGCTTTCAAACCAGG	GATAGAGGATCAGGGGAGGC
al353952_151	GGCTAGCGAGGCCTTATTG	TTCTTGTGCAGGAGATGTGG
al353711_01	CTGAGGAATTCTGAGGATTCAC	CGGCTGGGTGAACTATGG
al353711_02	CTGAGGAATTCTGAGGATTCAC	CGGCTGGGTGAACTATGG
al353711_21	CTTATGGTGACATTGCCCG	TTGCACCTGCAGAAAATGAG
al353711_30	AAGAAGAGCTTTTGTCCAGGG	GAATTTCTACATGCTGGCTTCC
al353711_39	CTTACATGCATTTTGCACGG	TGATGAGTTCTGTGATTGGTCC
al353711_47	ATAGAAACCCTGGAATGGG	TCCAGTTACAGGCTCCGC
al353711_57	TGGTATCCTTGCATTTAATGC	ACAGATGGGATATTGCTGCC
al353711_64	TGCACATACAAATCACCATGC	GGGAATAAGGAAAATCTTAGG
al353711_77	TGGAGCAGAGTGTGAAGGG	TTAGTGTCCAGAGGATGGTGC
al353711_03	ATGGGATAGCTTTCTGGTAAGC	CTGAAAGGAAAACCAGAAAAAG

al353711_04	TTCCAAATGTCAGTGTTCAATG	ACTTCAGCAAATACCACTGTGG
al161449_01	TGAGACTTCCTTAGAAGCAGGG	CCCCTCCCACCACCTATC
al161449_12	GACTTTGTTCTCAGGGGTTCC	TCTCTGGAAGTTTTTCAGAAGGC
al161449_23	AATTGACTTGCTGAGCCAGC	TTATTGAGATGTGTTCCATGCC
al161449_33	CAGATTGTTGATCCCTTCTCTG	GTCTCAGGCCCTTCTCCTG
al161449_41	GCAGCTCAATCACCTTCTCC	TGCCTGCACAATATAACAAAGG
al161449_54	TTGTTGTGCCAATATCACTCC	CGTTTGAGTTTAGTGTGACTGC
al161449_61	TTTCATTTTAAAAGCCCCC	CTGAAAATGCTGGTCTGAAGG
al161449_71	GACCACAAGAATTGTTTGTGTTG	GTGTTCATAACCAGCCTCTAGG
al161449_83	TTCAAAAATGTTTCGGGAGC	TGTATGTGACTTCCTTGATGCC
al161449_90	GCTGCACTTGCTACATTTTCC	TTAGAGTTTTAGCCACCTTGGC
al161449_100	TTGGACATGGACATGATCTAGC	TTCATAAGGTTTCCCAAATGG
al161449_109	GATGTCAAGGGAAGAAAAATGG	TGTGAAAGTGCAGTGGTTCTG
al161449_123	GAAATCTTGGCAGAGTAGTGC	AATTATTGCCCTGGGGAATC
al161449_133	GTTTGATTCAAGGTAAGCCTGG	AAAAGTCCATGGCCTGAGG
al161449_145	GAACAGAGTTCCCTCATTCC	TCTGTTGTGAGTTGCAAGGC
al161449_152	TGTTTTCTCTCCCAAGTTACC	TTGACAAGACCTCTTGACCTTC
al161449_163	GGTAGTGGGCCAAAAATTACC	TGCCTGCCACTGTAAGAAAC
al353639_02	CTCAACATTTTTCCCCTTATGC	AACCATGAATTTGTGAGTTCCC
al353639_11	CATTTTCAGTTTCACGTTTTCTC	ATCACACCTTGAACCTTCTGGTG
al353639_20	TTGGGAAGTAAGGGGTGATG	TTGATTCCTTCATTGACTGGC
al353639_30	GAAATAGTCCTTACCGCCTGG	AAACACAAAACCAATGGGTAGG
al353639_42	GTGGATGTGGCAATTCAG	AAGCACATGATTTGGGATTTG
al353639_51	GAAGGTATCATCCTCCACAAGC	ACCCTTTTGCACCTTGTACG
al353639_61	AGGCAAAAGGAAAGAGTCAGC	GAGACAGAGGATCCAGTGCTG
al353639_68	TTATTCCTCGAACTGCCTG	AGTAACACTTATTTGGGGAGGC
al353639_77	TGAAGTACACAATAAGCTGGCG	CACAGGTAGATGGCACAAACC
al353639_88	TCAGTGAAGACACCCAGCTG	ATTAGGAATTACCATTGCTGGC
al353639_96	CGTCTGAACCATCTAAACTCCC	CAAACCCAGGAAGATTACCTG
al441884_01	TCAGTGGTGGAAACATTAGCC	CACTCTATCATCCAGGCTAGGG
al441884_04	TTCCCATGCCTGAACCTTAGC	TCTTAATTTTGGCAGTGGTGC
al441884_23	CGAGTCTATCACGAAGGTGATG	TTGCCTCCATTGAGGAAGCTC
al441884_32	TTCCCATGCCTGAACCTTAGC	TCTTAATTTTGGCAGTGGTGC
al441884_55	TTGGGCGAACACTTAAAAC	GTATAGAGGAAGGGCTGCC
al441884_65	TTGCTATGGAGGAGGGATTG	AGGGTGTACCAGGCATCAG
al441884_75	AAATCAGCCATCCCTGACAG	GATTCAGAAAATGCCTACTCCG
al441884_83	TATAACAGGAGTGGTGGGGG	TTGTCTGCATGTGTACAAGTCC
al441884_98	AAAATTGTCCTCCTCCCC	TTGCATATTGTCAAATGCTGC
al441884_115	TCCTTCAGTTATGCAACTTTGG	GGGTGCAACTGTGTAAAGTCTG
Primer-cDNA	for	rev
cdna-tyrp1_1	AAGAACCCTTTGTCCGGG	GAACAGCAGGGTCATACTTTCC
cdna-tyrp1_2	CTCTGTCTTTTCTCAATGGCG	GAACAGCAGGGTCATACTTTCC
cdna-mpdz_1	CACTGGCAACACATGGAAAC	GTTCTTCTATGGCACCTCTTGC
cdna-mpdz_2	CACTGGCAACACATGGAAAC	TTCCCTTGACATGAGCTCG

C. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: **Stefan Brouwers**
Wohnort: Kastanienweg 79
69221 Dossenheim
Geburtsdatum: 10.09.1973
Geburtsort: Krefeld

Schulbildung / Studium

1984 – 1993	Gymnasium Fabritianum Uerdingen	
1993 – 1998	Universität Kaiserslautern	
1995 – 1996	Studienaufenthalt am Department of Biochemistry & Applied Molecular Biology, Manchester, England	
01.1998 – 12. 1998	Deutsches Krebsforschungszentrum, Abt. Zellphysiologie; Prof. Walter Pyerin, Heidelberg	Diplomarbeit: „Promoteruntersuchungen am Gen der regulatorischen β -Untereinheit der menschlichen Proteinkinase CK2“
01. 1999 – 06. 1999	Praktikum Paul-Ehrlich Institut, Abt. Allergologie, P.D. Dr. Stefan Vietz, Langen	Projekt „Schimmelpilzallergene“
07. 1999 – 11. 2003	Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Tumor Genetik, Prof. Manfred Schwab, Heidelberg	

D. Publikationen

Publikation mit direktem Bezug zur Arbeit:

Stefan Brouwers, Min-Kyoung Kim, Katrin Arnold, Larissa Savelyeva and Manfred Schwab

“Inversion and duplication in 9p23-24 identified in *BRCA2*^{+/-} mutation carriers including the *TYRP1* and *mPDZ* (MUPP1) and a pseudogene gene.” (to be submitted)

Weitere Publikationen:

Krehan A, Schmalzbauer R, Bocher O, Ackermann K, Wirkner U, Brouwers S, Pyerin W.
“Ets1 is a common element in directing transcription of the alpha and beta genes of human protein kinase CK2.”

Eur J Biochem. 2001 Jun;268(11):3243-52.

Min-Kyoung Kim, Sabine Zitzmann, Frank Westermann, Katrin Arnold, Stefan Brouwers, Manfred Schwab, and Larissa Savelyeva

„Increased rates of spontaneous sister chromatid exchange in lymphocytes of *BRCA2*^{+/-} carriers of familial breast cancer clusters” (submitted)

Posterbeiträge:

“Fine mapping of rearrangements on 9p in male breast cancer family”

Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes, 14-18 August 2002, Cold Spring Harbor, NY, USA

E. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Manfred Schwab für die Überlassung des Themas in seiner Arbeitsgruppe und den gedanklichen Austausch während meiner Arbeit, sowie die Einführung ins Paper-Schreiben. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. John Cullum für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Tumor Genetik möchte ich für die Kollegialität und das gute Arbeitsklima danken. Besonderer Dank gilt Dr. Andreas Claas und Dr. Larissa Savelyeva für die gute Einarbeitung in das Thema.

Besonders danken möchte ich Dr. Sabine Zitzmann für viele anregende (Korrekturlesen der Arbeit) und anstrengende Diskussionen ;-). Katrin Arnold und Dr. Ruprecht Wiedemeyer danke ich für das Korrekturlesen und Ratschläge im allgemeinen, sowie aufbauende Worte von Katrin Arnold in schweren Stunden. Ebenso gebührt Dank Jens Schmitt für die Korrekturlesung der Arbeit, sowie angenehme Minuten an der frischen Luft während des Laboralltags. Und nicht zu vergessen Min-Kyoung Kim für unterhaltsame Stunden im Lab, sowie immer aufbauende Worte. Danken möchte ich auch Eva Koziolk und Sonja Ortmann für lustige Momente während dieser Arbeit.

Danken möchte ich meiner Familie für die Unterstützung in der Zeit meiner Promotion.