

6 DISKUSSION

Kartierungsergebnisse

Sowohl die Analyse von Deletionssyndromen, wie dem WAGR-Syndrom, als auch Beobachtungen von Allelverlusten der Region 11p13–14.1 in verschiedenen Tumoren lassen neben den bereits kartierten Genen auf weitere bisher unbekannte Gene schließen, die die genetische Ursache dieser Krankheiten klären können. Eine detaillierte Kartierung mit dem Ziel der Sequenzierung und der daraus resultierenden Identifizierung neuer Gene dieser Region ist daher von erheblichem Interesse. Die Voraussetzung für eine Sequenzierung sind Contigs, die möglichst vollständig und in hoher Abdeckung die genomische Sequenz repräsentieren. Zu Beginn der Arbeit existierte bereits ein Contig bestehend aus YAC-Klonen, die 8 Mb der Region 11p13–14.1 vollständig abdecken (Gawin et al. 1995). Allerdings sind die Klone des YAC-Vektorsystems ungeeignet für eine spätere Sequenzierung. Gründe hierfür liegen in der Größe der YAC-Inserts. Diese bewegt sich durchschnittlich zwischen 300 kb und 1 Mb. Durch die relativ hohe Instabilität der Inserts kommt es häufig zum teilweisen Verlust des Inserts oder zu Chimärität vieler YAC-Klone. Sie können verschiedene Inserts besitzen, die von unterschiedlichen Bereichen der genomischen Sequenz stammen. Das System des PAC-Vektors, das für eine Feinkartierung des Chromosomenabschnitts 11p13 gewählt wurde, erweist sich gegenüber dem YAC-Vektorsystem als vorteilhaft. Die Insertgröße der PAC-Klone liegt durchschnittlich bei 120 kb, woraus eine höhere Stabilität des PAC-Inserts im Vergleich zum YAC-Klon resultiert. Letztendlich wurde auch ein System benötigt, dessen technische Handhabung vergleichsweise einfach ist. PAC-DNA ist relativ leicht zu isolieren und die Anzucht von *E.coli* ist wesentlich problemloser als die der Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae*, in denen das YAC-Vektorsystem vermehrt wird. Als genomische Bibliothek stand die PAC-Bank RPCI 1,3-5, die auf „High Density Grid“ Filtern aufgebracht war, zur Verfügung (Ioannou et al. 1994). Die theoretische Abdeckung der einzelnen PAC-Banken reichte vom Drei- bis Sechsfachen des gesamten menschlichen Genoms. Da mehrere dieser Banken zeitgleich benutzt wurden, addieren sich die jeweiligen Einzelwerte auf eine insgesamt 16-fache Abdeckung der verwendeten genomischen PAC-Bibliothek. Je höher die Abdeckung der Bibliothek, die für ein Screening benutzt wird, ist, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit ein lückenloses Contig mit den identifizierten Klonen erstellen zu können.

Für die Identifizierung 11p13-spezifischer PAC-Klone wurden Alu-PCR-Proben von YAC-Klonen aus dem YAC-Contig, das 11p13–14.1 abdeckt, benutzt. Dazu ergänzend wurden YAC-Endproben, sowie auf 11p13 lokalisierte Marker als Probe verwendet. Bei der späteren Analyse der hiermit erhaltenen PAC-Bibliothek konnte die Spezifität der Klone für die Region 11p13 nicht für alle PAC-Klone bestätigt werden. Dies galt für Klone, deren Endprobe keine zusätzlichen Klone identifizieren konnte und die außerdem mit keiner der 11p13-spezifischen Marker verifiziert werden konnten. Gründe hierfür liegen in Fehlerquellen bei der Auswertung der Koordinaten auf den „High Density Grid“ Filtern. Die Klone waren zwar nach einem bestimmten Muster doppelt auf die Filter gestempelt, manche dieser Muster waren aber nicht deutlich voneinander zu unterscheiden. Für diese Muster ergaben sich bei der Auswertung theoretisch zwei Möglichkeiten der Koordinatenbestimmung. Ein weiterer Anteil der Klone wiederum zeigte ein positives Signal mit den meisten der verwendeten PAC-Endproben und Marker, oder die Hybridisierung mit deren Endproben erzeugte einen so hohen Hybridisierungshintergrund, daß eine Auswertung dieser Ergebnisse nicht möglich war. Bei einem Teil dieser Klone konnte

nachgewiesen werden, daß sie kein Insert besaßen. Aufgrund der Größe des Inserts (~120 kb) bedeutet dies einen Replikationsvorteil des PAC-Vektors gegenüber Klonen mit Insert. Daraus resultiert eine stärkere Hybridisierung dieser Klone, was ein falsch positives Signal vortäuscht. Eine andere Erklärung für eine hohe Hintergrundhybridisierung ist ein hoher Gehalt an repetitiven Sequenzen. Liegen diese Sequenzen nahe der Klonierungsstelle, so werden diese bei der Generierung der Endproben mit amplifiziert. Bei der Hybridisierung auf die Filter mit den 11p13 spezifischen PAC-Klonen wurde zwar zur Absättigung repetitiver Sequenzen mit menschlicher DNA kompetiert, seltener im Genom vorkommende repetitive Sequenzen (low copy repeats) konnten mit dieser Methode allerdings nicht abgesättigt werden. Schließlich wurden Klone identifiziert, deren Spezifität für die Region 11p13 zwar bestätigt werden konnte, deren Inserts aber eine Deletion oder Insertion aufwiesen. Eine Deletion wurde dann vermutet, wenn bei der Erstellung des Contigs ein positives Signal, das für diesen Klon aufgrund der übrigen Daten zu erwarten gewesen wäre, gefehlt hatte. Klone mit einer Insertion oder einem Doppelinsert wiederum zeigten positive Hybridisierungssignale in zwei oder mehreren unabhängigen Contigs und konnten demzufolge keiner dieser unterschiedlichen Regionen zugeordnet werden.

Für die Erstellung des Contigs, dessen Klone für die Sequenzierung am Sanger Centre/UK herangezogen wurden, konnten letztendlich 113 Klone von 618 eindeutig miteinbezogen werden. Bis auf eine Ausnahme (104M13) waren dies PAC-Klone, bei denen keine Deletionen oder Insertionen bzw. Doppelinserts festgestellt werden konnten. 104M13 ist vermutlich deletiert, da er mit PAC-Enden überlappender Klone kein positives Hybridisierungssignal zeigte, hingegen positiv für die beiden Marker D11S87 und WT1 war. Der scheinbar hohe Verlust von über 80 % der identifizierten 11p13 spezifischen PAC-Klone, die nicht in das endgültig erstellte Contig miteinbezogen wurden, ist darauf zurückzuführen, daß zu Beginn der Arbeit Hybridisierungsproben verwendet wurden, die außerhalb des fertiggestellten Contigs lagen. Die 107 mit diesen Proben identifizierten PAC-Klone wurden in die Statistik miteinbezogen, jedoch später nicht mehr bei der Konstruktion des Contigs berücksichtigt. Die Region der Größe von 3 Mb auf der Telomer-Seite des gezeigten Contigs, von der ein Teil der verwendeten Proben stammte, wurde von Beate Gawin weiter analysiert. Die Region einer Größe von etwa 0,6 Mb auf der Centromer-Seite des Markers D11S935 wurde nach Absprache mit Glenn Evans (University of Texas Southwestern) ebenfalls von weiteren Kartierungen im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen. Für die 4,5 Mb zwischen dem Marker D11S935 und dem Gen PAX6 konnte ein Contig mit mehrfacher Abdeckung mit Ausnahme von fünf Regionen, die jeweils unter 50 kb liegen, erstellt werden. Eine mehrfache Abdeckung grenzt die Wahrscheinlichkeit von deletierten Klonen ein, da bei genügend hoher Hybridisierungsdichte Deletionen weniger häufig übersehen werden können.

Um das mittels Hybridisierungsdaten erstellte PAC-Contig zu bestätigen, wurde in einem unabhängigen Ansatz von Holger Hummerich (Imperial College of Science, Medicine and Technology/UK) die Überlappung der Klone mittels Fingerprintanalysen überprüft. Nach einem Restriktionsverdau der PAC-DNA mit den Enzymen HindIII und Sau3AI wurden die erhaltenen Muster mit Hilfe des Programms FPC (V2.8.2) (Soderlund, Longden und Mott 1997) miteinander verglichen und daraus eine Überlappungswahrscheinlichkeit der Klone errechnet. Für Regionen mit hoher Abdeckung konnte die Überlappung in jedem Fall bestätigt werden. In Bereichen mit nur einfacher Abdeckung oder zwischen Klonen geringer Überlappung konnte mittels Fingerprintanalysen keine

signifikante Aussage getroffen werden. Die Überlappung wird an diesen Stellen jedoch durch die Hybridisierungsergebnisse aufrechterhalten. Hier wurden wie an den meisten Stellen des gesamten PAC-Contigs, die Hybridisierungsergebnisse aus den Koloniefilterhybridisierungen durch Ergebnisse aus den Hybridisierungen auf Southern Blots mit EcoRI verdauter PAC-DNA verifiziert.

Für eine Sequenzierung des erstellten PAC-Contigs konnte ein „minimal tiling path“ erstellt werden, das heißt, es wurden diejenigen Klone gewählt, die mit der geringsten Überlappung den gewünschten Bereich auf Chromosom 11p13 abdecken. Der hier gewählte „minimal tiling path“ unterscheidet sich an einer Stelle von den vom Sanger Centre/UK vorgeschlagenen Klonen für eine spätere Sequenzierung. Der Klon 594L9 wurde vom Sanger Centre/UK aufgrund der Fingerprint-Daten, die von Holger Hummerich erstellt wurden, für die Sequenzierung gewählt. Da für diesen Klon keine Hybridisierungsdaten zur Verfügung stehen, erscheint dieser Klon nicht in dem unter Abbildung 8 gezeigten Contig.

Strategien zur Identifizierung neuer Gene

Auf der Grundlage des hier erstellten PAC-Contigs können bekannte Gene genau lokalisiert werden, wie für die beiden Gene ELF5 und PDX1 gezeigt wurde. Darüber hinaus können zusätzlich neue Gene innerhalb einer Region von 4,5 Mb Länge identifiziert werden. Um nach neuen Transkripten zu suchen, wurde ein experimenteller Weg über das Exontrapping gewählt. Ergänzend hierzu wurde eine computergestützte Suche nach Genen in den vom Sanger Centre/UK fertiggestellten Sequenzen durchgeführt. Eine Identifizierung neuer Transkripte mit Hilfe des Exontrappings ist sinnvoll, da zum einen durch die in silico Analyse gefundene Gene bestätigt werden sollten. Dies gilt vor allem für Exonvorhersagen, für die keine Übereinstimmung mit einem EST-Klon oder einem bekannten Gen gefunden werden kann. Hier stellt das Exontrapping eine Möglichkeit der Verifizierung dar. Zum anderen können über eine computergestützte Analyse von DNA-Sequenzen nicht alle Exons erfaßt werden, da Exon-Intron-Strukturen mit einer Wahrscheinlichkeit von nur 60 % vorhergesagt werden (Segovia 1998). Aus diesem Grund ist es schwierig, diejenigen Transkripte über eine computergestützte Analyse zu identifizieren, die keine Ähnlichkeiten zu EST-Klonen oder anderen aus der Datenbank bekannten Sequenzen aufweisen. Eine Isolierung dieser Exons ist oft nur auf dem experimentellen Weg möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde für das Exontrapping der Vektor pSPL3-B verwendet, mit dem interne Exons in genomischer DNA identifiziert werden können. Neben Klonen, die ein potentielles Exon aus dem zuvor klonierten PAC-Klon enthielten, wurde eine hohe Anzahl an Artefakten erhalten. Diese enthielten entweder kein Intron (ca. 33 %), ein Intron mit Sequenzen aus dem pSPL3-B-Vektor (ca. 34 %), Introns mit repetitiven Sequenzen (Alu) oder Sequenzen aus E. coli. Fehlerquellen für das Auftreten von Artefaktklonen liegen in erster Linie am Vorhandensein kryptischer Spleißstellen, entweder in der eingesetzten genomischen DNA selbst, woraus möglicherweise die Inserts mit repetitiver DNA stammen, oder im pSPL3-B-Vektor. Ein kryptisches Exon, das bereits im pSPL3-Vektor beschrieben wurde, wurde allerdings im pSPL3-B Vektor eliminiert. Die von Burn et al. (1995) beobachtete Häufigkeit von Artefaktklonen mit einem pSPL3-Insert lag für den pSPL3-B-Vektor unter 1 % für pSPL3 zwischen 5 und 46 %. Allerdings konnte diese niedrige Rate an Artefaktklonen hier nicht bestätigt werden.

Trotz der hohen Zahl an Artefakten, die jedoch eindeutig von positiven Klonen unterschieden werden konnten, wurden 35 Exons aus einer Region von etwa 700 kb detektiert, von denen 23 ein offenes Leseraster aufwiesen. Drei der identifizierten Exons stammen aus Genen, die zuvor schon auf diese PAC-Klone lokalisiert worden waren. Dies kann als eine Positivkontrolle für die angewandte Methode angesehen werden. Zur weiteren Kontrolle besteht nach Abschluß der Sequenzierung der PAC-Klone die Möglichkeit des Vergleichs mit den Sequenzen der identifizierten Exons. Mit einem überwiegenden Teil der isolierten Exons konnten keine Ähnlichkeiten zu EST-Klonen gefunden werden. Ein Grund kann in der Verwendung des pSPL3-B-Vektors liegen, mit dem grundsätzlich nur interne Exons isoliert werden. Da bei der Herstellung der cDNA-Banken Primer, die an das PolyA-Ende der mRNA binden, verwendet werden, sind Klone, die das 3'-Ende eines Gens repräsentieren, in der Überzahl. Folglich stehen für interne Exons langer Transkripte häufig keine cDNAs in GenBank zur Verfügung. Diese Tatsache erfordert, interne Exons, die in einer *in silico* Analyse leicht übersehen werden können, über das Exontrapping zu identifizieren.

Im Gegensatz zum Exontrapping stellt die *in silico* Analyse, sofern die Sequenzen verfügbar sind, einen schnellen und einfachen Weg dar neue Gene einschließlich ihrer genomischen Struktur zu charakterisieren. In der 640 kb langen DNA-Sequenz, die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Programmpakets NIX/HGMP untersucht wurden, konnten zwei nahezu vollständige Transkripte und vier EST-Cluster, bzw. einzelne EST-Klone gefunden werden, die Teil eines Transkripts sein können. Zusätzlich zu diesen potentiellen Transkripten wurden drei Pseudogene identifiziert. Die Anzahl der *in silico* gefundenen Transkripte auf gleicher Länge genomischer DNA ist vergleichbar mit der Anzahl der mit Hilfe des Exontrappings identifizierten Transkripte, die eine Homologie zu einem EST-Klon aufwiesen (vgl. Abbildung 18). Ein direkter Vergleich des Exontrappings mit der *in silico* Identifizierung von Transkripten in dieser Region kann allerdings erst nach Fertigstellung der Sequenzen der PAC-Klone, die für das Exontrapping verwendet wurden, gezogen werden. Auffällig sind aber dennoch Regionen höherer und niedrigerer Gendichte. Neben PAC-Klonen, auf die gleich mehrere Transkripte (1169J3, 85M6) zu liegen kommen, wurde in anderen Bereichen der genomischen DNA (entsprechend den PAC-Klonen 305G21 und 143A8) außer Sequenzhomologien zu einem Pseudogen (305G21) kein Transkript gefunden. In die Region der Länge von etwa 500 kb, in der die beiden PAC-Klone 305G21 und 143A8 zu liegen kommen, konnten bisher keine Gene kartiert werden. Bekannt ist auch die insgesamt ungleiche Verteilung der Gene auf die einzelnen Chromosomen. So sind beispielsweise auf Chromosom 1 oder 11 im Verhältnis mehr Gene zu finden als auf den Chromosomen 13 oder 18 (GenMap 98).

Mögliche Funktionen der neuen Transkripte

Für eine Beschreibung der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Transkripte wurden Expressionsanalysen auf Northern Blots und in verschiedenen Embryonalstadien der Maus durchgeführt. Durch den Nachweis der Expression kann das Vorliegen eines Artefakts bei der Durchführung des Exontrappings ausgeschlossen werden. Expressionsmuster geben zudem erste Hinweise, ob ein Gen in bestimmten Organen oder Embryonalstadien eine besondere Rolle spielt. Eine Vermutung über die Funktion der identifizierten Transkripte kann mit Hilfe von Ähnlichkeiten zu bekannten Genen getroffen werden. Für zwei der hier neu identifizierten Transkripte kann über die

Homologie zu einem bekannten Gen eine potentielle Funktion des abgelesenen Proteins hergeleitet werden. Eines dieser beiden Transkripte zeigt auf Proteinebene Ähnlichkeiten zwischen 39 – 72 % zu einem Transkript, das aus *Achlya ambisexualis* isoliert wurde. Auf Northern Blots mit RNA aus *Achlya ambisexualis* konnte ein Produkt der Größe zwischen 3 und 4 kb detektiert werden (Schowalter, Toft und Sommer 1990). Mit cDNA-Proben aus der Maus (558312) und dem Menschen (588263) konnte im Northern Blot ein Transkriptionsprodukt ähnlicher Größe (4,3 und 4,4 kb) in allen getesteten Geweben sowie auch im Mausembryo nachgewiesen werden, wodurch die auf Proteinebene gefundene Homologie zwischen den beiden Transkripten bekräftigt wird. Für das aus *Achlya ambisexualis* isolierte Transkript wird aufgrund der enthaltenen Zinkfingerdomänen eine Rolle als transkriptioneller Regulator postuliert, möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Steroidrezeptor (Schowalter, Toft und Sommer 1990). Die Zinkfingerdomäne konnte im humanen Transkript bisher allerdings nicht nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auf die nur unvollständige cDNA-Sequenz zurückzuführen war, die *in silico* ausgewertet werden konnte.

Das zweite Transkript, dessen Funktion mit Hilfe von Datenbankvergleichen beschrieben werden kann, zeigt Homologien zu *cca3*. Dieses Gen wurde in einem Differential Display-Ansatz zwischen wachsenden und wachstumsinhibierten Zellen aus der Leberzelllinie 3Y1 isoliert (Hayashi et al. 1997b). Es wurde zusammen mit zwei anderen Vertretern dieser Gruppe (*cca1* und *cca2*) in wachstumsinhibierten Zellen identifiziert. Da außerdem beobachtet wurde, daß die mRNA-Konzentration in sich regenerierenden Leberzellen abfällt, wurde postuliert, daß das Gen eine Rolle bei der Suppression der Zellteilung spielt (Hayashi et al. 1997a). Für eine regulatorische Funktion sprechen auch die zwei unterschiedlichen Domänen – die Ankyrin-Domänen und die BTB-Domäne -, die auf Proteinebene sowohl im *cca3*-Gen als auch im menschlichem Homologen gefunden wurden. Das Transkriptionsprodukt des *cca3*-Gens konnte im Northern Blot im Gehirn, in der Milz, der Leber, der Niere und im Hoden der Ratte nachgewiesen werden (Hayashi et al. 1997a). Anders als in der Ratte konnte mit der entsprechenden homologen cDNA-Probe (2048118) im Northern Blot mit Poly-A⁺-RNA aus menschlichem Gewebe, darunter auch RNA aus Leber, Gehirn, Milz und Niere, kein Transkript nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt beim menschlichen Transkript eine wesentlich niedrigere und daher schwer nachweisbare Genexpression vor als beim Gen in der Ratte. Eine ähnliche Funktion des Gens aus der Ratte und des menschlichen Transkripts kann also nur über Homologien in der Proteinsequenz postuliert werden. Insbesondere die BTB-Domäne, die in beiden Proteinen vorhanden ist, spricht für eine Regulation auf DNA-Ebene.

Für Transkripte mit geringer Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen muß eine Homologie auf dem experimentellen Weg aufgrund ähnlicher Funktionen oder ähnlichen Expressionsmustern bestätigt oder ausgeschlossen werden. Eines der neuen Transkripte besitzt eine Ähnlichkeit von nur 27-35 % mit dem sogenannten „testes specific protein“ der Maus (Mazarakis et al. 1991). Der Nachweis einer Homologie zum „testes specific protein“ auf Expressionsebene konnte nicht geführt werden, da eine humane Gewebeprobe aus Hoden, mit der eine spezifische Expression des Transkripts für dieses Gewebe hätte gezeigt werden können, nicht zur Verfügung stand. Eine schwache Expression des neu identifizierten Transkripts konnte allerdings in verschiedenen anderen Geweben (Gehirn, Niere, Milz) nachgewiesen werden, das heißt, es liegt keine spezifische Expression für ein bestimmtes Gewebe vor. Da sich zudem auf dem Northern Blot die Größe (9,7 kb) des gefundenen Transkripts erheblich

von der des bei Mazarakis et al. (1991) beschriebenen Transkripts (2 und 3 kb) unterscheidet, ist es unwahrscheinlich, daß es sich hierbei um ein Homologes zum „testis specific protein“ handelt. Alle anderen der neu identifizierten Transkripte zeigten keine Ähnlichkeiten zu bekannten Genen. Über den Nachweis der Expression entweder in adulten Geweben oder im Mausembryo konnte jedoch gezeigt werden, daß es sich hierbei tatsächlich um exprimierte Sequenzen handelt. Für die Exons 247B4 und 1001E10 wurde eine Genexpression im Embryo festgestellt. Dies läßt auf eine Rolle dieser Genprodukte in der Embryonalentwicklung vornehmlich in der Entwicklung von Gehirn und neuronalem Gewebe (247B4 und 1001E5) und den sich entwickelnden Knochen (1001E5) schließen. Vor allem für das Exon 1001E10 stehen überwiegend Sequenzen aus der nichtcodierenden Region des 3'-Endes zur Verfügung, mit denen aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks die Übereinstimmung zu homologen Genen weitaus niedriger und daher leichter zu übersehen ist. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß es sich hierbei um Transkripte neuer Genfamilien handelt. Eine Aufklärung der Funktion dieser neuen Gene ist somit von besonderem, zukünftigem Interesse. Für diejenigen Transkripte, für die auf RNA-Ebene kein Transkriptionsprodukt gefunden werden konnte, kann zum einen eine sehr niedrige Expression der Transkripte für den fehlenden Nachweis verantwortlich gemacht werden. Zum anderen waren auf den verwendeten Northern Blots nicht alle Gewebe oder Embryonalstadien repräsentiert. Eine Expression in einem dieser fehlenden Gewebe oder Embryonalstadien konnte daher nicht mit Hilfe der Northern Blot-Analyse oder in situ Hybridisierung detektiert werden. Es kann aber auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die für die Expressionsstudien verwendeten cDNA-Klone genomische DNA enthielt und diese daher nicht für den Nachweis exprimierter Sequenzen geeignet waren.

Ausblick

Das Interesse an der Kartierung des Chromosoms 11p13 gründet auf der Beobachtung von Deletionen in Verbindung mit verschiedenen Krankheiten, worunter das WAGR-Syndrom sowie unterschiedliche Tumorerkrankungen fallen. Bisher konnten bereits krankheitsrelevante Gene wie das Tumorsuppressorgen WT1 oder das für die Aniridie verantwortliche Gen PAX6 in die Region 11p13 kartiert werden. Weitere Gene, insbesondere die auf 11p13 postulierten Tumorsuppressorgene, die zur Klärung der genetischen Zusammenhänge der beobachteten Tumorerkrankungen beitragen können, wurden bisher nicht beschrieben. Auf der Basis des erstellten PAC-Contigs konnte mit der Isolierung von Genen begonnen werden, die in der Region 11p13 lokalisiert sind. Zwei der hier identifizierten Transkripte weisen eine Ähnlichkeit mit Proteinen auf, für die die Funktion eines transkriptionellen Regulators angenommen wird. Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise das WT1-Gen, sind häufig an der Regulation der Transkription beteiligt. Es kann daher die Frage aufgeworfen werden, ob die hier identifizierten Gene mit den bei Tumorpatienten gefundenen Deletionen in Zusammenhang stehen, auch wenn anhand des Expressionsmusters bisher kein Hinweis für eine spezifische Expression in den betroffenen Organen gefunden wurde. Um diese Frage zu klären, sind weitere Analysen dieser Transkripte erforderlich. Eine vollständige Charakterisierung dieser sowie auch der übrigen im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten Transkripte eröffnet somit ein interessantes Feld zukünftiger Forschungsaufgaben. Darüber hinaus können mit Hilfe des PAC-Contigs durch Exontrapping oder cDNA-Selektion weitere neue Transkripte isoliert werden. Die vollständige

Sequenzierung der 4,5 Mb DNA-Sequenz des hier erstellten PAC-Contigs bietet zudem die Chance, alle Gene dieser Region einschließlich ihres genomischen Aufbaus zu lokalisieren und somit die pathogenetischen Zusammenhänge der Region 11p13 vollständig zu klären.

