

1 ZUSAMMENFASSUNG

In die Region p13 des menschlichen Chromosoms 11 kartieren mehrere krankheitsrelevante Gene wie das Wilms' Tumor Gen WT1 oder das für die Aniridie verantwortliche Gen PAX6. Beide Gene können bei Patienten mit dem WAGR-Syndrom deletiert sein, was das Auftreten von Wilms' Tumoren oder Aniridie bei diesen Patienten erklärt. Die genetische Ursache für weitere Symptome des WAGR-Syndroms, wie beispielsweise die geistige Retardierung, ist bisher nicht geklärt. Des Weiteren wurden Allelverluste auf 11p13 in Verbindung mit verschiedenen Tumoren (Lunge, Blase, Brust, Ovar) beobachtet, ohne daß die ursächlichen Gene hierfür beschrieben werden konnten. Eine Kartierung und anschließende Sequenzierung dieser Region dient als Grundlage für die Identifizierung neuer Gene, die möglicherweise im Zusammenhang mit diesen Krankheiten stehen.

Mit dem Ziel der Sequenzierung dieser Region wurde ausgehend von einem YAC-Contig, das 8 Mb des Chromosoms 11p13-14.1 abdeckt, eine Feinkartierung der Region 11p13 durchgeführt. Über ein Screening einer humanen PAC-Bibliothek mit 11p13-spezifischen Proben, wurden PAC-Klone erhalten, die aus dieser Region stammen. Mit einem Teil dieser Klone konnte mittels „chromosome walking“ ein 4,5 Mb großes PAC-Contig erstellt werden. Zur Sequenzierung des Chromosomenabschnitts 11p13 am Sanger Centre/UK wurden die PAC-Klone des „minimal tiling path“ gewählt.

Auf der Grundlage des PAC-Contigs wurden auf experimentellem Weg mit Hilfe des Exontrappings neue Transkripte isoliert. Hierfür wurden sechs PAC-Klone, die etwa 700 kb des Chromosoms 11p13 abdecken, herangezogen. Zusätzlich wurden erste Sequenzabschnitte (insgesamt ca. 640 kb) der PAC-Klone über eine computergestützte Auswertung mit dem Programmpaket NIX/HGMP analysiert. Insgesamt konnten mit Hilfe des Exontrappings und der in silico Analyse fünf neue potentielle Transkripte identifiziert werden. Eine erste Untersuchung dieser Transkripte wurde mit Hilfe von Datenbankvergleichen und Expressionsstudien auf Northern Blots und in situ Hybridisierungen durchgeführt. Aussagen über eine mögliche Funktion konnten bei zwei der identifizierten Transkripte anhand von Datenbankvergleichen getroffen werden. Es handelt sich zum einen um ein Transkript mit Homologien zum Gen *cca3* aus der Ratte, für das aufgrund der enthaltenen BTB-Domäne eine regulatorische Funktion auf DNA-Ebene postuliert werden kann. Zum anderen wurde ein Gen mit Ähnlichkeiten zu einem Transkript aus *Achlya ambisexualis* isoliert. Letzteres besitzt möglicherweise die Funktion eines Steroidrezeptors.

Zusätzlich zu den hier beschriebenen Transkripten, können aus dem erstellten PAC-Contig neue Gene auf der Basis von cDNA-Selektion, Exontrapping oder, nach Fertigstellung der gesamten Sequenz, über in silico Analysen identifiziert werden.

SUMMARY

The human chromosomal region 11p13 harbours several disease related genes among them the Wilms' tumour gene WT1 and PAX6 which is responsible for aniridia. Both genes can be deleted in patients with the WAGR syndrome explaining the Wilms' tumour or aniridia of the WAGR-syndrome. Additional symptoms of the WAGR syndrome like mental retardation are not yet understood genetically. Furthermore loss of heterozygosity of 11p13 has been observed in several cancers (breast, bladder, ovary, lung). None of these regions of allele loss have been narrowed down to a single gene yet. In order to identify genes associated with these diseases mapping and subsequent sequencing of the 11p13 region are of great interest.

With the aim of sequencing this region, fine mapping of 11p13 has been performed based on a YAC-contig spanning 8 Mb of chromosome 11p13–14.1. Screening of a human PAC-library with 11p13 derived probes resulted in a set of clones located in 11p13. Using the strategy of chromosome walking a PAC contig covering 4,5 Mb of 11p13 could be established with a subset of these clones. For sequencing 11p13 by the Sanger Centre/UK a minimal tiling path of PAC clones was chosen.

The PAC contig has been used to isolate new transcripts located in this region. For this purpose exon trapping was performed with six of the PAC clones spanning 700 kb of 11p13. Additionally, genomic sequences of some of the PAC clones (ca. 640 kb) were analysed in silico by the NIX program package/HGMP. The exon trapping approach together with the in silico analyses resulted in the identification of five new transcripts which were investigated by database searches as well as expression studies via Northern blots and in situ hybridisations. For two of the identified transcripts a possible function could be suggested based on database searches. One shows similarities to a rat gene named *cca3* which may be involved in transcriptional regulation due to its BTB domain. The other one is similar to a transcript of *Achlya ambisexualis*. For the latter a role as a steroid receptor has been postulated.

In addition to the transcripts described here, new genes can be isolated by using the established PAC contig for either exon trapping, cDNA selection or in silico analysis of the sequence which will be finished in the near future.

2 EINLEITUNG

2.1 Das „Human Genome Project“

Das Erbmateriale des Menschen besteht aus ca. 3 Milliarden Basenpaaren. Das menschliche Genom in Form der etwa 80.000 bis 100.000 Gene entspricht nur etwa 3 - 5 % der gesamten DNA-Sequenz. Von den geschätzten 80.000 bis 100.000 Genen konnten bisher etwa 30.000 lokalisiert werden (GenMap'98).

Die Kartierung und Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms gibt Aufschluß über strukturelle und funktionelle Zusammenhänge auf genetischer Ebene. So ist die Kenntnis des genetischen Bauplans der Proteine die Grundlage für eine Erforschung deren Funktion. Zudem können aus dem Vergleich der Sequenzen menschlicher Genprodukte mit Proteinen anderer Organismen Modelle für die Rolle des Gens beim Menschen abgeleitet werden. Letztendlich sind genetische Veränderungen häufig die Ursache von Krankheiten. Die Kenntnis der DNA-Sequenz eröffnet hierbei neue Möglichkeiten der Diagnostik und Therapie.

Ein vorrangiges Ziel des „Human Genome Project“ (HGP) ist es, die gesamte menschliche DNA-Sequenz zu entschlüsseln, die etwa 80.000 bis 100.000 Gene des Menschen zu lokalisieren und deren Struktur und Funktion zu analysieren. Eine internationale Koordination erfährt das „Human Genome Project“ in der „Human Genome Organisation“ (HUGO), die 1989 in Genf gegründet wurde. Ein Schwerpunkt des HGP liegt auf der Entwicklung physikalischer und genetischer Karten zu den einzelnen Chromosomen, die die Grundlage für eine vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms bilden. Die Erstellung der Rohdaten der gesamten menschlichen DNA-Sequenz soll bis zum Frühjahr 2000 weitgehend abgeschlossen sein (Wadman 1999). Hiermit verbunden ist eine computergestützte Auswertung der erhaltenen DNA-Sequenzen, um bekannte Gene zu lokalisieren, neue Transkripte zu identifizieren und in einem Vergleich mit der Datenbank zu charakterisieren.

2.2 Erstellen von Karten

Eine Voraussetzung für die Sequenzierung des menschlichen Genoms sind detaillierte Karten, um eine Ordnung der späteren Sequenzen zu ermöglichen.

Die ersten entstandenen Karten sind genetische Karten, die auf Koppelungsanalysen von polymorphen Markern basieren. Der Abstand zweier Marker in Zentimorgan (cM) gibt deren Rekombinationswahrscheinlichkeit in der Meiose wieder, wobei die Rekombinationshäufigkeit von der chromosomalen Region abhängt.

Eine weitere Methode für eine statistische Kartierung von Markern ist die Erstellung von sogenannten „Radiation Hybrid Maps“. Grundlage hierfür bilden Hybridzellen, deren Genom sich aus Nagergenom und menschlichen Chromosomen zusammensetzt. Für die Herstellung dieser Hybridzellen wird eine Donorzelle mit menschlichem Genom einer Dosis γ -Strahlung ausgesetzt. Die entstandenen chromosomalen Bruchstücke in der bestrahlten Zelle werden mit dem Genom der Empfängerzelle (Hamsterfibroblasten) fusioniert. Über eine Kosegregation von Markern mit den so entstandenen „Radiation Hybrid Klonen“ entsteht die „Radiation Hybrid Map“. Der ermittelte Abstand der Marker in

den entstandenen Karten wird in Zentiray (cR) angegeben und ist abhängig von der Dosis der eingesetzten γ -Strahlung.

Zu den physikalischen Karten zählen Makro-Restriktionskarten, die mit Hilfe von Pulsfeld-Gelelektrophoresen (PFGE) erstellt werden. Hierfür wird genomische DNA mit selten schneidenden Enzymen wie z.B. NotI oder MluI verdaut und auf einem Pulsfeld-Gel aufgetrennt. Die entstandenen Fragmente werden mit Hilfe von Markern über Southern Blot Hybridisierungen zur fertigen Makro-Restriktionskarte geordnet.

Neben den Restriktionskarten sind überlappende Klone (Contigs) in sogenannten Contig-Karten eine unmittelbare Voraussetzung für eine spätere Sequenzierung. Für die Erstellung von Contigs werden Vektorsysteme unterschiedlicher Insertgröße verwendet. Hierzu gehören YAC-Klone (yeast artificial chromosomes), mit denen sich aufgrund ihres großen Inserts (300 kb - 1 Mb) am schnellsten größere genomische Regionen abdecken lassen. Da das Insert aber eine vergleichsweise hohe Instabilität aufweist, werden auf der Basis von YAC-Contigs Feinkartierungen mit Vektoren kleinerer und somit auch stabilerer Inserts angestrebt. Hierfür eignen sich die sogenannten BAC- und PAC-Klone. Der BAC-Vektor (bacterial artificial chromosomes) wurde auf der Grundlage des F-Faktors von *E. coli* entwickelt (Shizuya et al. 1992) und kann ein Insert einer Größe bis zu 300 kb aufnehmen. Eine Alternative zu BAC-Klonen stellt das PAC-Vektorsystem (P1 derived artificial chromosomes) dar. Der PAC-Vektor wurde vom P1-Phagen abgeleitet und eignet sich für Insertgrößen mit durchschnittlich 120 kb (Ioannou et al. 1994). Für eine noch höhere Auflösung einer Contig-Karte können Cosmide mit einer Insertgröße zwischen 30 – 40 kb verwendet werden. Mit Hilfe von Contigs können Marker über Hybridisierungen oder PCR-Analysen relativ genau lokalisiert werden. Abstände in Restriktionskarten und Contig-Karten werden in Kilo- oder Megabasen (Mb, kb) angegeben.

Die unterschiedlichen Einheiten von Zentimorgan, Zentiray und Kilo- bzw. Megabasen, in denen die ermittelten Abstände in den genetischen Karten sowie in den „Radiation Hybrid Maps“ und den physikalischen Karten angegeben sind, sind nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Daher ist es sinnvoll eine Integration der unterschiedlichen Karten zu schaffen. Dies geschieht über die Verwendung gemeinsamer Marker. Im Rahmen des HGP sind das in erster Linie STS-Marker (sequence tagged sites) und EST-Marker (expressed sequence tags). Erstere sind Sequenzen einer durchschnittlichen Länge zwischen 200 und 500 bp, von denen nur eine Kopie in der genomischen Sequenz vorliegt, so daß eine einmalige Lokalisation gewährleistet ist. Letztere sind Sequenzen aus dem 3'- oder 5'-Ende von cDNA-Klonen, sie geben somit einen Hinweis auf exprimierte Sequenzen im Genom. STS-Marker können mittels PCR-Reaktion, EST-Marker auch über Hybridisierungen auf Southern Blots in die jeweilige Karte integriert werden.

2.3 Chromosom 11 – ein kurzer Überblick

Das menschliche Chromosom 11 umfaßt 144 Mb, das sind etwa 4,8 % der gesamten menschlichen DNA-Sequenz. Es zählt zu den Autosomen und ist relativ gut durch genetische und physikalische Karten charakterisiert. Neben sogenannten „Radiation Hybrid Maps“ (James et al. 1994; Schuler et al. 1996) existieren genetische Karten (Fain et al. 1996), sowie physikalische Karten mit STS- und EST-Markern (Smith et al. 1993), Informationen über NotI-Schnittstellen (Hosoda et al. 1997) und

Abschnitte mit überlappenden YAC-, BAC- oder PAC-Klonen (Arai et al. 1996; Baysal et al. 1997; Courseaux et al. 1997; Gawin et al. 1995; Guru et al. 1997; Kitamura et al. 1997; Rosier et al. 1994; Smith et al. 1993; Stankovic et al. 1997; Tunnaciffie et al. 1999). Insgesamt konnten bisher 77 Gene auf den kurzen Arm und 130 Gene auf den langen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert werden. Darunter fallen krankheitsrelevante Gene, die zuerst aufgrund von Aberrationen auf Chromosom 11 vermutet wurden. Hierzu zählen Gene, deren Deletion mit entwicklungsabhängigen Mißbildungen, z.B. der Aniridie [PAX6 11p13 (Francke et al. 1979)] oder dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom [CDKN1C, IGF2 11p15 (Koufos et al. 1989)], in Zusammenhang stehen. Des weiteren liegen Gene, die für komplexe Erkrankungen wie die Ataxia telangiectasia [ATM, 11q23; (Sanal et al. 1990; Savitsky et al. 1995)] oder den Diabetes Typ I [INS, 11p15, (Davies et al. 1994)] verantwortlich gemacht werden, auf Chromosom 11.

2.4 Die Region 11p13

2.4.1 Bisherige Karten

In Karten, die Chromosom 11p13-14.1 abdecken, wird die Länge dieses Chromosomenabschnitts mit etwa 8 Mb angegeben (Gawin et al. 1995), was ungefähr 14 % des gesamten Chromosoms 11 entspricht. Die ersten Karten der Region 11p13–14.1 entstanden aufgrund der Beobachtung des genetischen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten des WAGR-Syndroms (**W**ilms' tumour – **A**niridia - **g**enitourinary malformation - **m**ental **r**etardation) und Deletionen des Chromosoms 11p13 (Francke et al. 1979). Auf der Suche nach den verantwortlichen Genen wurden zuerst die beiden Gene CAT, das Gen für Katalase (Junien et al. 1980), und FSHB, die β -Untereinheit des Follikel stimulierenden Hormons, als mit dem WAGR-Syndrom gekoppelte Marker in die Region lokalisiert (Glaser et al. 1986). Eine erste genauere physikalische Kartierung und damit verbunden eine Isolierung von neuen 11p13-spezifischen Proben erfolgte durch Compton et al. (1988). Neben Deletionskarten, der Kartierung überlappender Deletionen unterschiedlicher Länge aus Patienten mit Wilms' Tumor, Aniridie, geistiger Retardierung und/oder urogenitalen Fehlbildungen (Gessler et al. 1989) entstanden weitere physikalische Karten, basierend auf der Isolierung zusätzlicher 11p13-spezifischer Proben und deren Kartierung mittels PFGE-Analysen (Gessler und Bruns 1989). Die Isolierung erster YAC- und Cosmid-Contigs, sowie eine weitere Lokalisation von chromosomalen Bruchpunkten für die Region 11p13 erlaubte die Erstellung einer detaillierten physikalischen Karte durch Fantès et al. (1995). Schließlich konnte von Gawin et al. (1995) ein YAC-Contig erstellt werden, das 8 Mb des Chromosoms 11p13–14.1 abdeckt.

2.4.2 Kartierte Gene

Im Zuge der Kartierungsarbeit der Region 11p13–14.1 konnten bisher 15 Gene charakterisiert werden, von denen zwei (WT1 und PAX6) mit Symptomen des WAGR-Syndroms in Zusammenhang gebracht werden. Im folgenden sollen diese in der Reihenfolge ihrer Lage cen-tel auf 11p13–14.1 näher beschrieben werden.

RAG1 und **RAG2** sind in Lymphozyten exprimierte Gene. Sie sind notwendig für die somatische Rekombination - die sogenannte V(D)J-Rekombination - bei der Entstehung der Antikörperdiversität (McBlane et al. 1995). RAG1 besitzt DNA-Bindungsspezifität für Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS) und kann direkt mit der DNA assoziieren, während RAG2 nur in Anwesenheit von RAG1 an DNA binden kann (Difilippantonio et al. 1996). Liegen Mutationen im RAG1- oder RAG2-Gen vor, so führt das zu einer bestimmten Form des SCID (**S**evere **C**ombined **I**mmune **D**eficiency)-Syndroms, das mit dem Fehlen der B-Lymphozyten (B-negativ-SCID-Syndrom) einhergeht (Schwarz et al. 1996). RAG1 und RAG2 wurden durch Oettinger et al. (1992) erst auf den kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 11 lokalisiert, bevor eine genaue Kartierung auf 11p13 durch Analysen an somatischen Zellhybriden erstellt werden konnte (Sherrington et al. 1992).

GLT1 (GLTR) zählt zur Gruppe der Glutamattransporter. Außer GLT1 sind noch drei weitere Glutamattransporter bekannt, die allerdings nicht auf Chromosom 11 kartieren. Das Protein des GLT1-Gens ist zur Aufrechterhaltung einer niedrigen extrazellulären Glutamatkonzentration und zur Beendigung der Glutamat-vermittelten Nervenreizleitung erforderlich. Eine Störung des Glutamattransports wird mit neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimer-Krankheit, ALS (amyotrophische laterale Sklerose) oder Chorea-Huntington in Zusammenhang gebracht (Palmer et al. 1986; Portera-Cailliau et al. 1995; Rothstein et al. 1995; Szatkowski und Attwell 1994). Dafür spricht auch die Beobachtung spontan auftretender letaler epilepsieähnlicher Anfälle in Mäusen, die homozygot für eine Deletion im Glt1-Gen sind (Tanaka et al. 1997). Ein erster Hinweis auf eine Lokalisation von GLT1 auf Chromosom 11 erbrachte die Kartierung des homologen Gens der Maus *Eaat2* (Glt1) auf die Zentromerregion des Chromosoms 2, das syntenisch zum menschlichen Chromosom 11p ist (Kirschner et al. 1994). Das menschliche GLT1 konnte schließlich von Takai et al. (1996) mittels FISH-Analysen dem Chromosomenabschnitt 11p11.2-p13 zugeordnet werden.

CD44 ist ein Glykoprotein, das in der Zellmembran lokalisiert ist. Es besitzt eine Funktion als Rezeptor für Hyaluronsäure (Aruffo et al. 1990) und vermutlich auch für Osteopontin (Weber et al. 1996). Die genomische Organisation weist 19 Exons auf, von denen 10 alternativ gespleißt werden (Screaton et al. 1992). Die daraus und aus posttranslationaler Modifizierung resultierenden Isoformen spielen eine Rolle in der Regulation der Aktivierung und Wanderung von Lymphozyten und Makrophagen (Weber et al. 1996). Das Auftreten bestimmter Spleißvarianten der CD44-mRNA steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Metastasierung bestimmter Tumoren (Matsumura und Tarin 1992). CD44 wird außerdem in Zellen der AER (apical endodermal ridge) exprimiert, einer für die frühe Extremitätenentwicklung bedeutenden ektodermalen Zellschicht (Sherman et al. 1998). Die Kartierung auf 11p13 erfolgte durch Cianfriglia et al. (1992).

PDX1 kodiert für eine Untereinheit des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes, die sogenannte X-Komponente. Die Pyruvat Dehydrogenase ist ein Enzym, das zwischen den Stoffwechselwegen der Glykolyse, des Fettstoffwechsels und des Aminosäureabbaus steht. Das Transkript der X-Komponente kann daher in erster Linie in Skelett- und Herzmuskel detektiert werden, wobei eine niedrige Expression auch in anderen Geweben gefunden wird (Aral et al. 1997). Mutationen oder Deletionen im PDX1-Gen führen zur Laktatazidemie, die mit einem erhöhten Blutpyruvat- und Laktat Spiegel einhergeht. Als Folge treten zum Teil schwere psychomotorische Fehlentwicklungen und geistige Retardierung auf (Ling et al. 1998; Robinson et al. 1990). Die bei dieser Krankheit

auftretenden Laktatazidosen können unter Umständen zum Tod führen (Marsac et al. 1993). Die Lokalisation auf 11p13 erfolgte über ein Screening von Radiation Hybrid Panels und YAC-Bibliotheken sowie FISH-Analysen (Ling et al. 1998).

ELF5 gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Regulation der zellulären Proliferation und Tumorgenese spielen. Diesen Transkriptionsfaktoren gemeinsam ist das Motiv der ETS-Domäne, das an purinreiche Sequenzen im Promotor oder Enhancer der Zielgene bindet (Janknecht und Nordheim 1993; Kodandapani et al. 1996; Macleod, Leprince und Stehelin 1992; Wasyluk, Hahn und Giovane 1993; Werner et al. 1995). Über PCR-Analysen eines Radiation Hybrid DNA Pannels mit genspezifischen Primern konnte ELF5 auf die Region p13-15 des Chromosoms 11 lokalisiert werden (Zhou et al. 1998).

CAT - das Gen für die menschliche Katalase - besteht aus 13 Exons, die auf eine Länge von 34 kb verteilt sind (Quan, Tsuchiya und Carter 1986). Das Enzym Katalase besteht aus vier Untereinheiten und einer Hämgruppe und katalysiert den Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff, um somit die Zelle vor dem toxischen Einfluß des Wasserstoffperoxids zu schützen. Bei Akatalasemie, einer Reduktion der Enzymtätigkeit auf 0,2 – 4 % der normal gemessenen Aktivität (Takahara 1952), wurden Mutationen gefunden, die zu einem falschen Spleißen des Gens führen (Wen et al. 1990). Interessanterweise sind die klinischen Symptome der Akatalasemie auf die Entwicklung von Gangränen im Mundbereich beschränkt (Takahara 1948). Scheinbar reicht eine niedrige Aktivität der Katalase aus, um die übrigen Zellen vor der Toxizität des Wasserstoffperoxids zu schützen. Aufgrund einer Koppelung des CAT-Lokus mit dem WAGR-Syndrom, konnte das Gen der Region 11p13 zugeordnet werden (Junien et al. 1980).

p137-GPI (M11S1) ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Membranprotein. Es wurde über Antikörper isoliert, die gegen apikale und basale Membranfraktionen in Caco2-Zellen - einer menschlichen Darmzelllinie - gerichtet waren. p137-GPI stellt somit ein Kandidatengen dar, das für die apikal-basolaterale Transcytose in Caco-2-Zellen mitverantwortlich gemacht werden kann (Ellis und Luzio 1995). p137-GPI konnte von Gessler et al. (1996) auf die Region 11p13 lokalisiert werden.

RBTN2 (LMO2/Rhombotin-2) zählt zu den Proteinen, die eine LIM-Domäne aufweisen. Das Cysteinereiche Motiv der LIM-Domäne bindet Zink (Archer et al. 1994; Kosa et al. 1994) und vermittelt Protein-Protein Interaktionen (Arber, Halder und Caroni 1994; Schmeichel und Beckerle 1994). RBTN2 ist notwendig für die Erythropoese (Warren et al. 1994). Eine Überexpression von Rhombotin2 in T-Lymphozyten von transgenen Mäusen führt allerdings zu einer T-Zell Leukämie und zur Bildung von Lymphomen (Fisch et al. 1992). Ein weiterer Hinweis für die Eigenschaft von RBTN2 als Proto-Onkogen ist seine Aktivierung über die Translokation t(11;14)(p13q11) in Patienten mit akuter lymphoischer Leukämie (Showe und Croce 1986).

CD59 kodiert ähnlich wie p137-GPI für ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Glykoprotein (Sugita et al. 1989). Als membranständiges Protein ist CD59 auf der Oberfläche aller zirkulierenden Zellen, Epithel und Endothelzellen zu finden (Nose et al. 1990). In diesem Zusammenhang ist CD59 als Oberflächenantigen an der Hemmung der komplement-vermittelten Zellyse beteiligt (Meri, Waldmann und Lachmann 1991). Ein Fehlen von CD59 auf der Erythrozytenmembran wurde bei Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie beobachtet (Mahoney et al. 1992). Die Lokalisation des Gens auf die Region 11p13 erfolgte durch Bickmore et al. (1993).

WT1 ist eines der Gene, das für die Entstehung des Wilms' Tumors verantwortlich ist. Es besteht aus 10 Exons, die durch alternatives Spleißen für vier Isoformen eines Proteins mit vier Zinkfingerdomänen kodieren (Gessler, König und Bruns 1992, Haber et al. 1991). Zinkfinger sind DNA-bindende Domänen, was eine Aktivität des WT1-Proteins als Transkriptionsfaktor vermuten lässt. Als weitere regulatorische Domänen werden eine Transkriptionsaktivator- und Repressor-Domäne (Wang et al. 1995), eine Dimerisierungsdomäne (Reddy et al. 1995) und ein potentiell „Leucine-zipper“-Motiv (Madden, Cook und Rauscher 1993) genannt. Wie an transgenen Mäusen mit einer Mutation im WT1-Gen gezeigt werden konnte, spielt das Protein eine Rolle in der frühen Entwicklung des Urogenitalsystems. (Kreidberg et al. 1993). Dafür spricht auch das Expressionsmuster des WT1-Transkripts in der sich entwickelnden fötalen Niere (Pritchard-Jones et al. 1990). WT1 fungiert als Tumorsuppressorgen. Folglich führen Mutationen, die einen Funktionsverlust des WT1-Proteins nach sich ziehen, zur Tumorentstehung. Hierzu zählt in erster Linie der Wilms' Tumor. Des Weiteren wurden Mutationen im WT1-Gen bei JGCT (**Juvenile Granulosa-Cell Tumor**), NARM (**Non-Asbestos-Related Mesothelioma**), DSRCT (**Desmoplastic Small Round Cell Tumor**) und akuter myeloischer Leukämie beschrieben (Park et al. 1993). Aufgrund vorangegangener cytogenetischer Analysen konnte das WT1-Gen durch Erstellen einer physikalischen Karte der Kandidatenregion auf Chromosom 11p13 eingeordnet werden (Call et al. 1990; Gessler et al. 1990).

RCN1, das Gen für Retikulokalbin, ist beteiligt am Ca^{2+} -Stoffwechsel in den Kompartimenten des Endoplasmatischen Retikulums. Über ein sogenanntes EF-Hand-Motiv, das häufig in Ca^{2+} -bindenden Proteinen vorkommt, kann Retikulokalbin mit hoher Affinität an Ca^{2+} binden. Es spielt daher vermutlich eine Rolle bei der Proteinsynthese, der Sekretion, der intrazellulären Proteinsortierung und des Transports (Ozawa 1995; Ozawa und Muramatsu 1993). Über physikalische und cytogenetische Kartierung konnte das Gen für Retikulokalbin zwischen die Gene PAX6 und WT1 eingeordnet werden. Das homologe Gen in der Maus wurde auf dem zum menschlichen Chromosom 11p13 syntenischen Chromosom 2 lokalisiert (Kent et al. 1997).

PAX6 gehört zur Familie der Gene mit Homeoboxdomänen. Die Gene dieser Familie spielen in der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle. Das PAX6 Genprodukt enthält zwei DNA-Bindungsmotive, eine paired Domäne von 128 Aminosäuren und eine paired-ähnliche Homeodomäne von 61 Aminosäuren und fungiert somit als ein Transkriptionsfaktor (Ton et al. 1991; Treisman, Harris und Desplan 1991). Am C-Terminus befindet sich eine Prolin-, Serin- und Threonin-reiche Region, deren Funktion als transkriptioneller Aktivator in vitro nachgewiesen wurde (Glaser et al. 1994). Zu PAX6 homologe Gene wurden unter anderem in Drosophila (Quiring et al. 1994); in der Maus (Ton, Miwa und Saunders 1992), in der Ratte (Matsuo et al. 1993), im Hühnchen (Li et al. 1994) und im Zebrafisch (Krauss et al. 1991) gefunden. Mutationen oder Deletionen im menschlichen PAX6-Gen führen zu Aniridie, dem teilweise oder vollständigen Fehlen der Iris (Fantès et al. 1992; Prosser und van Heyningen 1998). Die Kartierung von PAX6 auf 11p13 erfolgte durch Ton et al. (1991).

FSHB kodiert für die β -Untereinheit des **F**ollikel **S**timulierenden **H**ormons (FSH), das eine zentrale Rolle bei der Regulation des Menstruationszykluses der Frau spielt. FSH ist ein Heterodimer aus einer α - und β -Untereinheit und zählt zu den Gonadotropinen aus der Familie der Glykoproteinhormone. Die α -Untereinheit ist ein bei den Gonadotropinen identisch vorkommender Baustein, während die β -Untereinheit von verschiedenen Genen stammt. Die FSH β -Untereinheit besteht aus drei Exons, die

als vier unterschiedliche Transkripte abgelesen werden (Jameson et al. 1988). Homozygote Mutationen oder Deletionen im FSHB-Gen können bei der Frau zur Sterilität führen (Layman et al. 1997; Matthews et al. 1993). Die Lokalisation von FSHB auf Chromosom 11p13-14.1 erfolgte durch Glaser et al. (1986).

KCNA4 (HK1) wird zu einer Familie von spannungsabhängigen K⁺-Kanälen gerechnet, die eine Homologie zu den Shaker-K⁺-Kanal-Genen in Drosophila zeigen (Stuhmer et al. 1989). Die cDNA von KCNA4 (HK1) wurde erstmals aus menschlichen Ventrikel-cDNA-Banken isoliert. Tatsächlich konnten über Northern Blot Analysen zwei Transkripte des KCN4-Gens einer Länge von 3,5 kb und 8 kb im Ventrikel und Atrium des Herzens nachgewiesen werden (Tamkun et al. 1991). Die Zuordnung des Gens zur WAGR-Region auf 11p14.1 erfolgte über die Isolierung einer genomischen Probe für HK1 und deren Analyse mit Hilfe von Pulsfeld-Gelelektrophoresen und somatischen Zellhybriden (Gessler, König und Bruns 1992).

2.4.3 Chromosomale Aberrationen

Hinweise für die Existenz weiterer Gene geben unter anderem Deletionen, die einer Krankheit zugrunde liegen, deren ursächliches Gen bisher noch nicht identifiziert werden konnte.

Zu den häufigsten Deletionen des Chromosomenabschnitts 11p13 zählen die des WAGR-Syndroms. WAGR steht für „**W**ilms' **t**umour-**a**niridia-**g**enitourinary malformation-**m**ental **r**etardation“ und wurde zuerst von Miller et al. (1964) beschrieben. Bei Patienten, die dieses Syndrom aufweisen, ist die Region auf 11p13, die die Gene PAX6 und WT1 miteinschließt, deletiert. Neben dem auf diese Gene zurückzuführenden Symptomenkomplex des Wilms' Tumors sowie der urogenitalen Fehlbildungen (WT1) und der Aniridie (PAX6) sprechen weitere Symptome des WAGR-Syndroms für eine Beteiligung bisher nicht beschriebener Gene. Dies gilt für die geistige Retardierung, die mit Deletionen in der WAGR-Region verknüpft ist (Russel 1986) oder für das Auftreten von Pigmentanomalien bei ähnlichen Deletionen in der zu 11p13 syntenischen Region auf Chromosom 2 in der Maus (Glaser, Lane und Housman 1990).

Ein Allelverlust (loss of heterozygosity, LOH) der Region 11p13 wurde außerdem bei verschiedenen Krebserkrankungen beobachtet, für die bisher noch kein Kandidatengen gefunden wurde. Hierzu zählen Karzinome der Blase, bei denen vor allem in fortgeschrittenen, invasiven Tumoren eine Veränderung des kurzen Arms des Chromosoms 11 beschrieben wurde (Gibas et al. 1986). Shipman et al. (1993) konnte einen Allelverlust auf 11p13 in über 50 % der untersuchten Tumoren feststellen, wobei am häufigsten der Katalase-Lokus deletiert war. Lungenkarzinome wurden ebenfalls mit Deletionen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 in Verbindung gebracht (Ludwig et al. 1991; Weston et al. 1989). So sind beim NSCLC (**N**on-**S**mall **C**ell **L**ung **C**ancer) in 5-43 % der Fälle die Region 11p15 und in 23-72 % der untersuchten Lungenkarzinome die Region 11p13 deletiert (Ludwig et al. 1991). Bei Patientinnen mit Karzinomen des Ovars wurden neben Deletionen auf anderen Chromosomen auch solche der Region 11p13-11p15.5 gefunden (Kiechle-Schwarz et al. 1994; Kirschner et al. 1994; Kitamura et al. 1997; Vandamme et al. 1992). Des Weiteren wurden Deletionen der Region 11p13 bei Fällen von Brustkrebs (Garcia et al. 1991) oder HNSC (**H**ead and **N**eck **S**quamous **C**arcinoma) (El-Naggar et al. 1996) beobachtet.

Aufgrund dieser bei verschiedenen Tumoren auftretenden Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 11 - insbesondere der Bande p13 - können in der betroffenen Region eines oder mehrere Tumorsuppressorgene postuliert werden.

2.5 Ziel der Arbeit

Aufgrund von zytogenetischen Veränderungen des menschlichen Chromosoms 11p13, die in verschiedenen Syndromen, wie dem WAGR-Syndrom oder Tumoren gefunden wurden, liegt der Schluß nahe, die für diese Syndrome oder Tumoren relevanten Gene in der betroffenen Region zu vermuten. Bisherige Kartierungsarbeiten in der Region p13 des menschlichen Chromosoms 11 haben gezeigt, daß bereits krankheitsrelevante Gene, wie das Gen für den Wilms' Tumor, und für die Entwicklung bedeutende Gene, wie das PAX6-Gen, lokalisiert werden konnten.

Eine Identifizierung neuer Gene dieser Region ist unter anderem über die Sequenzierung dieses DNA-Abschnitts möglich. Eine unmittelbare Voraussetzung für diesen Schritt ist eine genaue physikalische Karte der Region in Form überlappender Klone (Contig), deren Insert aufgrund der Größe und Stabilität für eine Sequenzierung geeignet ist. Als System hierfür wurden Klone mit Inserts in pCYPAC2-Vektoren (PAC-Klone) gewählt, deren durchschnittliche Insertgröße um 120 kb liegt. Im Vergleich zu YAC-Klonen, die zu Beginn der Arbeit als 11p13 abdeckendes Contig vorlagen, weisen sie eine weitaus größere Stabilität gegenüber Rekombinationen auf. Mit Hilfe der bereits auf 11p13 kartierten und als Contig vorliegenden YAC-Klone, sowie EST-Markern, genomischen Markern, als auch lokalisierten anonymen cDNA-Klonen sollte eine 11p13 spezifische Bibliothek aus PAC-Klonen erstellt und diese anschließend als Contig geordnet werden.

Neben der Suche nach neuen Genen mit Hilfe von Datenbankvergleichen aus den sequenzierten PAC-Klonen des fertigen Contigs sollten auf experimentellem Weg über die Methode des Exontrappings neue Transkriptionseinheiten erschlossen werden.

