

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenenen aus der
DiGeorge-Syndrom-Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 10**

Peter Lichtner

aus

Berlin

2001

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Thomas Meitinger betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 17. August 2001

.....

Dissertation eingereicht am 17. August 2001

1. Gutachter Prof. Dr. Thomas Meitinger

2. Gutachter Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung 16. Mai 2002

meinen Eltern

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

Publikationsliste:

Schuffenhauer S, Lichtner P, Peykar-Derakhshandeh P, Murken J, Haas OA, Back E, Wolff G, Zabel B, Barisic I, Rauch A, Borochowitz Z, Dallapiccola B, Ross M, Meitinger T (1998): Deletion mapping on chromosome 10p and definition of a critical region for the second DiGeorge syndrome locus (DGS2). *Eur J Hum Genet* 6: 213-225.

Schuffenhauer S, Leifheit H-J, Lichtner P, Peters H, Murken J, Emmerich P (1999): De novo deletion (14)(q11.2q13) including PAX9: clinical and molecular findings. *J Med Genet* 36: 233-236.

Bartsch O, Wagner A, Hinkel GK, Lichtner P, Murken J, Schuffenhauer S (1999): No Evidence for Chromosomal Microdeletions at the Second DiGeorge Syndrome Locus on 10p Near D10S585. *Am J Med Genet* 83: 425-426.

Lichtner P, König R, Hasegawa T, van Esch H, Meitinger T, Schuffenhauer S (2000): An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13/14. *J Med Genet* 37: 33-37.

Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden G, Harding B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns JP, Van de Ven W, Thakker RV, Devriendt K (2000): GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* 406: 419-22.

Lichtner P, Attié-Bitache T, Schuffenhauer S, Henwood J, Bouvagnet P, Scambler P, Meitinger T, Vekemans M (2002): Expression and mutation analysis of BRUNOL3, a candidate gene for heart and thymus developmental defects associated with partial monosomy 10p. *J Mol Med* 80: 431-442.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Chromosomenaberrationen als Ursache von angeborenen Fehlbildungssyndromen	1
1.2.	Das DiGeorge-Syndrom	2
1.2.1.	Historie und Phänotyp	2
1.2.2.	Ursachen des DiGeorge-Syndroms	2
1.2.3.	Die Mikrodeletion 22q11	3
1.2.4.	Mausmodelle	4
1.2.5.	Die partielle Monosomie 10p	5
1.2.5.1.	Krankheitsloci auf Chromosom 10p.....	5
1.2.5.1.1.	Einzelgenerkrankungen	6
1.2.5.1.2.	Suszeptibilitätsloci und Haploinsuffizienzregionen	6
1.2.5.1.3.	Tumorloci	7
1.2.5.2.	Phänotyp	8
1.3.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	11
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Patienten	12
2.2.	Laborgeräte und Laborhilfsmittel.....	12
2.3.	Chemikalien und andere Materialien	15
2.4.	Puffer und Lösungen	15
2.4.1.	Puffer und Lösungsmittel	16
2.4.2.	Nährmedien	16
2.5.	Kits	16
2.6.	Zellkultur	17
2.6.1.	Primäre Lymphozyten-Kulturen.....	17
2.6.2.	Lymphoblastoide Zelllinien.....	17
2.7.	Zytogenetische Methoden	18
2.7.1.	Präparation von Chromosomen	18
2.7.1.1.	Chromosomenpräparation aus primären Lymphozyten-Kulturen.....	18
2.7.1.2.	Chromosomenpräparation aus lymphoblastoiden Zelllinien	19
2.7.2.	GTG-Karyotypisierung von Chromosomen	19
2.8.	Molekularzytogenetische Methoden	19
2.8.1.	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH).....	19
2.8.1.1.	Vorbereitung der Präparate.....	19
2.8.1.2.	Vorbereitung der Sonden.....	20
2.8.1.2.1.	Markierung von YAC-Klonen.....	20
2.8.1.2.2.	Markierung von PAC-Klonen	21
2.8.1.3.	Hybridisierungs-, Wasch- und Färbebedingungen	21

Inhaltsverzeichnis

2.8.1.4.	Auswertung	22
2.9.	Molekulargenetische Methoden	22
2.9.1.	DNA-Isolierung	22
2.9.1.1.	Präparation von DNA aus Lymphozyten	22
2.9.1.2.	Präparation von DNA aus Hefen	23
2.9.1.2.1.	Schnellaufschluß von Hefen	23
2.9.1.2.2.	Aufschluß von Hefen mit Lyticase	24
2.9.1.3.	Präparation von extrachromosomaler DNA aus E. coli	24
2.9.1.3.1.	Präparation von Plasmid-DNA	24
2.9.1.3.1.1.	Präparation von PAC-DNA	24
2.9.1.4.	Präparation von DNA-Blöckchen	26
2.9.1.4.1.	Präparation von DNA-Blöckchen aus Lymphozyten	26
2.9.1.4.2.	Präparation von DNA-Blöckchen aus Hefen	26
2.9.2.	Gelelektrophoresen	27
2.9.2.1.	Horizontale Agarosegelelektrophorese zum Auftrennen von DNA	27
2.9.2.2.	Wechselfeldgelelektrophorese (PFGE)	28
2.9.2.3.	Polyacrylamidgelelektrophorese zur DNA-Sequenzierung	28
2.9.2.4.	Polyacrylamidgelelektrophorese zur Genotypisierung	29
2.9.3.	Übertragung von DNA auf Nylonmembranen	29
2.9.3.1.	Übertragung von DNA in Agarosegelen auf Nylonmembranen (Southern-Blot)	29
2.9.3.2.	Übertragung von E. coli Flüssigkulturen auf Nylonmembranen (Dot-Blot)	30
2.9.4.	Radioaktive Hybridisierung von Southern-Blots, Northern-Blots und Dot-Blots	30
2.9.4.1.	Vorbereitung der Sonden	30
2.9.4.2.	Hybridisierungs-, Wasch- und Detektionsbedingungen	31
2.9.5.	RNA-in situ-Hybridisierung	32
2.9.5.1.	Vorbereitung der Hybridisierungssonde	32
2.9.5.1.1.	Linearisierung des Plasmids	32
2.9.5.1.2.	Markierung der Sonde	32
2.9.5.2.	In-situ-Hybridisierung von humanen Embryoschnitten	33
2.9.5.2.1.	Prähybridisierung der Präparate	33
2.9.5.2.2.	Hybridisierung der Präparate	34
2.9.5.2.3.	Auswertung der Hybridisierung	34
2.9.6.	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	35
2.9.6.1.	Standard-PCR	35
2.9.6.2.	PCR-Analyse polymorpher Mikrosatelliten	35
2.9.6.3.	Inter-Alu-PCR	35
2.9.6.4.	Alu-Vektor-PCR	36
2.9.6.5.	DOP-Vektor-PCR	36
2.9.6.6.	Amplifizierung der 5'-Bereiche von Genen: 5'-RACE-PCR	37
2.9.6.7.	Amplifizierung großer DNA-Stücke	37
2.9.7.	DNA-Sequenzierung	37
2.9.7.1.	Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Amplifikaten	37
2.9.7.1.1.	Sequenzierung von PAC-Klonen	38
2.9.8.	Weitere molekulargenetische Methoden	38
2.9.8.1.	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
2.9.8.1.1.	Restriktionsspaltung von DNA in Lösung	38
2.9.8.1.2.	Restriktionsspaltung von DNA-Blöckchen	38

Inhaltsverzeichnis

2.9.8.2.	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	39
2.9.8.2.1.	Isolierung von PCR-Banden und Restriktionsfragmenten	39
2.9.8.2.2.	Isolierung von YAC-Klonen aus Wechselfeldgelen	39
2.9.8.3.	Klonierung von PCR-Produkten	39
2.9.8.4.	Transformation kompetenter Bakterien.....	39
2.9.8.5.	Herstellung kompetenter Bakterien.....	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Deletionskartierungen bei Monosomie 10p-Patienten	41
3.1.1.	Isolierung und Charakterisierung von Chromosom 10-YAC-Klonen	41
3.1.2.	Isolierung und Charakterisierung von Chromosom 10-PAC- und BAC-Klonen	42
3.1.3.	Charakterisierung von 10p-Deletionen mit YAC-Klonen, PAC/BAC-Klonen und polymorphen Markern	43
3.1.4.	Genotyp-Phänotyp-Analyse	49
3.1.5.	Mikrodeletionsanalysen in der DGCR2 und in der HDR1-Region bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom und HDR-Syndrom.....	52
3.2.	Etablierung von PAC-Contigs über die 10p-Haploinsuffizienzregionen DGCR2 und HDR1	54
3.2.1.	Etablierung eines PAC-Contigs über die DGCR2	54
3.2.2.	Etablierung eines PAC-Contigs über die HDR1-Region	58
3.3.	In-silico-Analysen der genomischen Sequenzdaten.....	59
3.4.	Identifizierung von Transkripten aus der Region DGCR2.....	62
3.4.1.	Kartierung von EST-Klonen aus der Gene Map 96 und Gene Map 98.....	63
3.4.2.	Durchsuchung von cDNA-Bibliotheken mit zurückkartierten EST-Klonen	67
3.5.	Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenen aus den Haploinsuffizienzregionen DGCR2 und HDR1	70
3.5.1.	Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenen aus der Haploinsuffizienzregion DGCR2	71
3.5.1.1.	Expressionsanalyse von NAPOR	71
3.5.1.2.	Bestimmung der genomischen Struktur von NAPOR.....	81
3.5.1.3.	Mutationsanalyse des NAPOR-Gens	83
3.5.2.	Identifizierung von Kandidatengenen aus der HDR1-Region	85
3.5.2.1.	Feinkartierung der kritischen HDR1-Region	85
3.5.2.2.	Identifizierung und Mutationsanalyse des Kandidatengens GATA-3.....	86
3.6.	De novo Deletion (14)(q11q13) in zwei Patienten: PAX-9 und TTF-1 als DiGeorge-Syndrom-Kandidatene Gene	88
3.6.1.	Molekulargenetische Eingrenzung der 14q-Deletionen in den Patienten SAN und MAL	88
3.6.2.	Deletionsanalysen der Gene PAX-9 und TTF-1 bei den Patienten SAN und MAL	89
4.	Diskussion	92

Inhaltsverzeichnis

4.1.	Kartierungsarbeiten auf Chromosom 10p	92
4.2.	Identifizierung von Haploinsuffizienzregionen auf Chromosom 10p mit Deletionskartierung	94
4.2.1.	Deletionskartierungen bei Patienten mit partieller Monosomie 10p.....	94
4.2.2.	Das HDR-Syndrom und partielle Monosomie 10p	97
4.2.3.	Kartierung des HDR-Syndrom-Locus auf 10p.....	100
4.2.4.	DGS2 als <i>Contiguous Gene Syndrome</i>	101
4.2.5.	Weitere Krankheitsloci auf Chromosom 10p.....	104
4.3.	Das HDR-Syndrom und GATA-3	105
4.3.1.	Mutationssuche im GATA-3-Gen bei HDR-Syndrom-Patienten.....	105
4.3.2.	GATA-3 als Entwicklungsgen für die Niere, das Innenohr und die Parathyreoideae	107
4.4.	Die Haploinsuffizienzregion DGCR2	110
4.4.1.	Suche nach Kandidatengen aus der Haploinsuffizienzregion DGCR2	110
4.4.2.	NAPOR als Kandidatengen für einen Herzfehler und T-Zelldefekt in Patienten mit partieller Monosomie 10p	112
4.4.2.1.	NAPOR als Entwicklungsgen	112
4.4.2.2.	Expressionsprofil von NAPOR während der humanen Entwicklung	115
4.4.2.3.	Mutationsuntersuchung im NAPOR-Gen	116
4.4.2.4.	Die Haploinsuffizienzregion DGCR2: Auf dem Weg zur Identifizierung von Kandidatengen für Herzfehler und T-Zelldefekt	118
4.5.	PAX-9 als Kandidatengen für das DiGeorge-Syndrom	119
5.	Zusammenfassung	121
6.	Literaturverzeichnis.....	124
7.	Abkürzungen.....	141

1. Einleitung

1.1. Chromosomenaberrationen als Ursache von angeborenen Fehlbildungssyndromen

Die Entwicklung eines Embryos aus einer einzelnen befruchteten Eizelle zu einem ausgereiften Menschen verläuft nach einem präzisen Programm. Dieses Programm legt den Zeitpunkt und den Ort fest, an dem die Gewebe und Organe gebildet werden. All diese komplexen Schritte sind in einer einzigen, einfach aufgebauten polymeren organischen Verbindung verschlüsselt, der DNA. Die Erforschung der Embryonalentwicklung hat durch die Untersuchung von weniger komplex aufgebauten Modellorganismen wie Fliegen, Nematoden, Fischen und Fröschen in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht. Aber auch die Beobachtung, daß viele menschliche Fehlbildungssyndrome genetische Ursachen haben und die Identifizierung der verursachenden Gene in einigen dieser Syndrome, führte zu einem tieferen Verständnis der embryonalen Entwicklungsmechanismen.

Beim Menschen sind spezifische Chromosomenaberrationen für eine Reihe von Fehlbildungssyndromen verantwortlich. In etwa 0,7 % aller Lebendgeburten und über 2 % aller Schwangerschaften bei Frauen über 35 Jahren treten Chromosomenaberrationen auf. Bei 6-10 % aller Neugeborenen mit schweren Entwicklungsdefekten werden Chromosomenaberrationen gefunden. Diese Zahlen zeigen deutlich die medizinische Bedeutung von chromosomalen Anomalien.

Die Chromosomenaberrationen werden in sogenannte Aneuploidien, d.h. numerische Abweichungen im Chromosomensatz, und in Strukturaberrationen klassifiziert. Zu letzteren zählen Translokationen, Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Insertionen, Isochromosomen, dicentrische Chromosomen und Ringchromosomen. Am häufigsten sind Deletionen (z.B. Wolf-Hirschhorn-, Miller-Dieker-, Cri-du-chat- und DeGrouchy-Syndrom). Der bei Deletionen resultierende klinische Phänotyp ist das Ergebnis eines Verlustes von genetischem Material aus der deletierten Region. Meist liegt ein Dosiseffekt zugrunde, so daß der Verlust einer Kopie eines oder mehrerer Gene zu einer zu geringen Proteinkonzentration führt. Die Menge an gebildetem Protein reicht dann nicht mehr aus, um bestimmte Prozesse während der Embryonalentwicklung fehlerfrei auszuführen. Man spricht in diesem Fall von einem Haploinsuffizienzsyndrom. In den letzten Jahren wurden bei mehreren Haploinsuffizienzsyndromen die entsprechenden Krankheitsgene identifiziert (z.B. Greig-

Syndrom I, Williams-Beuren-Syndrom, Alagille-Syndrom, kampomele Dysplasie und Trichorhinophalangeales Syndrom).

1.2. Das DiGeorge-Syndrom

1.2.1. Historie und Phänotyp

Das DiGeorge-Syndrom wurde 1965 auf einem Immunologie-Kongreß das erste Mal erwähnt (Cooper et al. 1965) und anschließend von DiGeorge in einer Fallvorstellung veröffentlicht (DiGeorge und Harley 1965). Embryologisch handelt es sich um einen Entwicklungsfelddefekt der 3. und 4. Schlundtaschen (Lammer und Opitz 1986). Aus der gestörten Entwicklung dieser embryonalen Strukturen resultieren die drei Leitsymptome Thymus-Hypoplasie bzw. Thymus-Aplasie, Hypoparathyreoidismus und Herzfehler. Die Fehlentwicklung des Thymus kann zu einem T-Zelldefekt führen, der sich durch persistierende Infektionen bemerkbar macht. Die Hypoplasie der Nebenschilddrüsen (Hypoparathyreoidismus) führt insbesondere in der neonatalen Periode zu einer Hypokalzämie. Bei den Herzfehlern dominieren diejenigen, die den Herzausfluß-Trakt betreffen. Besonders häufig wird eine Fallot'sche Tetralogie, ein unterbrochener Aortenbogen, ein Truncus arteriosus und ein Ventrikelseptumdefekt beobachtet. Neben den drei Leitsymptomen weisen die Patienten typische faziale Auffälligkeiten auf. Dazu gehören ein Hypertelorismus, ein kurzes Philtrum, eine charakteristische Nase, ein kleiner zugespitzter Mund, ein kleines zurückweichendes Kinn und tief sitzende Ohren mit einer abnormal gefalteten Ohrmuschel (Abb. 2, Kapitel 1.2.5.2.). Meist sind die Patienten minderwüchsig und zeigen eine psychomotorische Retardierung.

1.2.2. Ursachen des DiGeorge-Syndroms

1981 wurde von de la Chapelle et al. (de la Chapelle et al. 1981) erstmals eine partielle Deletion von Chromosom 22 als mögliche Ursache des Krankheitsbildes vorgeschlagen. In der Folge haben weitere Beobachtungen von Patienten mit unbalancierten Translokationen und interstitiellen Deletionen den Zusammenhang des DiGeorge-Syndroms mit einer Mikrodeletion del(22q11) bewiesen (Augusseau et al. 1986; Greenberg et al. 1984; Greenberg et al. 1988b; Kelley et al. 1982; Wilson et al. 1992). Die Entwicklung der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) mit Sonden aus der deletierten Region zeigte die große Bedeutung der Mikrodeletion als Ursache des Syndroms (Carey et al. 1992; Driscoll et al. 1992). Heute gilt eine Mikrodeletion auf Chromosom 22q11 als Hauptursache für das DiGeorge-Syndrom. In 90 % der Fälle kann die Deletion nachgewiesen werden (Carey et al. 1992; Driscoll et al.

1993). Daneben wurden vereinzelt Fälle beschrieben, bei denen andere Chromosomenaberrationen vorlagen. Dabei handelte es sich um partielle Monosomien, partielle Trisomien und um eine als Mosaik vorkommende Tetraploidie (Tab. 1). Bis auf eine Ausnahme sind all diese Chromosomenaberrationen Einzelfälle. Nur die partielle Monosomie 10p wird im Zusammenhang mit einem DiGeorge-Syndrom häufiger beobachtet. Elliot beschrieb 1970 zum ersten Mal einen Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p (Elliot et al. 1970). Bisher sind mehr als 50 Fälle dieser Chromosomenaberration in der Literatur veröffentlicht (Schuffenhauer et al. 1995; van Esch et al. 1999).

Bei wenigen Patienten kann weder eine Mikrodeletion 22q11 noch eine andere Chromosomenaberration nachgewiesen werden. In diesen Fällen wurde ein maternaler Diabetes oder Teratogene wie Retinoide und Alkohol als Ursachen für die Fehlbildung in Betracht gezogen (Ammann et al. 1982; Lammer et al. 1985; Wilson et al. 1993b).

Tabelle 1: Chromosomenaberrationen bei DiGeorge-Syndrom-Patienten.

Chromosomenaberration	Referenz
del(4)(q21.3q25)	(Fukushima et al. 1992)
del(5p)	(Taylor und Josifek 1981)
dup(9)(q21q22)	(Lindgren et al. 1994)
del(10)(p13)	(Van Esch et al. 1999)
del(17)(p13)	(Greenberg et al. 1988a)
del(18)(q21)	(Greenberg et al. 1988b)
i(18q)	(van Essen et al. 1993)
Tetraploidie (Mosaik)	(Wullich et al. 1991)

1.2.3. Die Mikrodeletion 22q11

Bei dem mit der Mikrodeletion 22q11 assoziierten DiGeorge-Syndrom ist die Ausprägung des klinischen Vollbildes eher selten, häufig zeigen die Patienten nur einen Teil der Symptome (Ryan et al. 1997). Die Variabilität des klinischen Bildes führte zur Definition weiterer Syndrome wie dem Velocardiofacialen Syndrom (Shprintzen et al. 1981) und dem *Conotruncal Anomaly Face Syndrome* bzw. Takao-Syndrom (Kinouchi et al. 1976; Shimizu et al. 1984; Takao et al. 1980). Da es sich nicht um ursächlich unterscheidbare Krankheitsbilder handelt, sondern um ein variables Krankheitsbild mit einer gemeinsamen genetischen Ätiologie, einer Mikrodeletion 22q11, wurde zunächst das gesamte Symptomenspektrum mit dem Akronym CATCH22 beschrieben (Wilson et al. 1993a). CATCH22 steht dabei für Herzfehler (*cardiac abnormality*), abnormale Fazies, T Zell-Defekt/ Thymus-Hypoplasie bzw. Thymus-Aplasie, Gaumenspalte (*cleft palate*), Hypokalzämie/ Hypoparathyreoidismus und Deletion del(22q11). Da CATCH22 im

angelsächsischen Sprachraum mit negativen Assoziationen bedacht ist, wird heute der Begriff 22q11-Deletionssyndrom verwendet (Burn 1999).

Mit Hilfe von polymorphen Markern und Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) mit vorwiegend genomischen YAC-Klonen aus der Chromosom 22q11-Region, konnten die Bruchpunkte bei Patienten mit einer Mikrodeletion 22q11 charakterisiert werden. Die meisten Patienten besitzen eine etwa 3 Mb große Deletion, etwa 10 % der Patienten haben eine kleinere 1,5–2 Mb große Deletion (Carlson et al. 1997; Lindsay et al. 1995). Diese kleinere Deletion überlappt vollständig mit der 3 Mb Deletion und ist in etwa 95 % der Mikrodeletionspatienten deletiert. Aufgrund von Patienten mit seltenen Bruchpunkten, die für andere Regionen auf 22q11 deletiert sind, ist es nicht möglich, für alle del(22q11)-Patienten eine gemeinsame kleinste überlappende Deletionsregion (SRO) zu definieren (Rauch et al. 1999; Saitta et al. 1999).

Die gesamte Mikrodeletionsregion liegt als genomische Sequenz vor. Sie enthält vier große Blöcke von repetitiven *low copy repeat* (LCR) Elementen und mehr als 20 Gene. Die meisten Bruchpunkte sind innerhalb der LCR-Elemente lokalisiert (Shaikh et al. 2000). Von vielen Genen konnte in Expressionsstudien und Tiermodellen eine Funktion während der Embryonalentwicklung gezeigt werden. Bei Patienten mit typischen Symptomen der Mikrodeletion 22q11 und ohne zytogenetische Auffälligkeiten wurden Mutationsanalysen in verschiedenen Genen aus der Region durchgeführt (Chieffo et al. 1997; Funke et al. 1997; Gong et al. 1997; Lindsay et al. 2001; Wadey et al. 1999). Mutationen wurden bisher nicht gefunden. Dies und die Tatsache, daß es keine einheitliche SRO in dieser Region gibt, zeigt die Schwierigkeiten bei der Suche nach den Ursachen des DiGeorge-Syndroms.

1.2.4. Mausmodelle

Zwei transgene Mäuse, deren Phänotyp dem DiGeorge-Syndrom ähnelt, sind bekannt. Bei einem Modell handelt es sich um eine Knockout-Maus, bei der das Gen Hox-1.5 deletiert wurde. Diese Maus hat weder einen Thymus noch Parathyreoideae und weist häufig Herzfehler auf (Chisaka und Capecchi 1991). Im zweiten Fall handelt es sich um eine Pax9 Knockout-Maus, bei der eine Aplasie des Thymus und der Parathyreoideae vorliegt (Peters et al. 1998). Die beiden homologen humanen Gene HOX A3 und PAX-9 sind weder in der Mikrodeletionssyndromregion 22q11 noch auf dem Nebenlocus auf 10p13-14 lokalisiert, so daß die beiden Modelle bei der Aufklärung dieser Regionen keinen Beitrag leisten können.

Die aktuellen Bestrebungen zielen auf die Etablierung von Mausmodellen mit Deletionen aus der Mikrodeletionssyndromregion 22q11 ab. Die orthologe Mausregion ist auf Chromosom

16 lokalisiert und liegt als genomische Sequenz vor. Abgesehen von einigen Umstrukturierungen entspricht sie der humanen Region. Bis auf ein Gen werden in der Mausregion alle humanen Gene wiedergefunden (Botta et al. 1997; Galili et al. 1997; Puech et al. 1997; Sutherland et al. 1998). Zwei transgene Mäuse mit Deletionen der Gene Gscl bzw. Hira zeigen keine Symptome des DiGeorge-Syndroms (Saint-Jore et al. 1998; Scambler et al. 1998; Wakamiya et al. 1998). Daneben wurden drei Mäuse mit größeren Deletionen etabliert. Während das eine Modell mit einer etwa 150 kb Deletion phänotypisch unauffällig ist (Kimber et al. 1999), wurden beim zweiten Modell mehrere Herzfehler gefunden, die auch bei DiGeorge-Syndrom-Patienten häufig auftreten. In dieser Maus wurde eine etwa 1,2 Mb Deletion eingefügt. Mindestens 14 Gene wurden dabei deletiert (Lindsay et al. 1999). Das dritte Mausmodell enthält eine etwa 550 kb große Deletion, zeigt aber keine typischen DiGeorge-Syndrom-Symptome (Puech et al. 1997). Da die drei Deletionsregionen überlappten, konnte die für den Herzfehler verantwortliche kritische Region, die bei einem der Mausmodelle noch eine Größe von über 1 Mb hatte, stark eingegrenzt werden. Eines der Gene in dieser Region war der T-Box-Transkriptionsfaktor Tbx1, der aufgrund seiner Expressionsdaten ein gutes Kandidatengen darstellte (Chapman et al. 1996; Chieffo et al. 1997). Mehrere Arbeitsgruppen etablierten Mäuse mit Nullallelen für dieses Gen (Jerome und Papaioannou 2001; Lindsay et al. 2001; Merscher et al. 2001). Heterozygote Tbx1 +/- -Tiere zeigten konotrunkale Herzfehler, die bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom häufig beobachtet werden. Homozygote Tbx1 -/- -Mäuse zeigten darüberhinaus ein weites Spektrum von Fehlbildungen, die mit dem DiGeorge-Syndrom-Phänotyp korrelierten. Damit ist Tbx1 das erste Gen, für das eine bedeutende Rolle bei der Ätiologie des DiGeorge-Syndroms im Tiermodell nachgewiesen wurde. Punktmutationen beim Menschen wurden bisher nicht gefunden (Chieffo et al. 1997; Lindsay et al. 2001).

1.2.5. Die partielle Monosomie 10p

Die Beobachtung eines sehr ähnlichen Phänotyps bei Patienten mit einer Mikrodeletion 22q11 und einer Monosomie 10p führte zur Hypothese, daß in beiden Deletionsregionen funktionell und strukturell verwandte Gene lokalisiert sein könnten. Ein Vergleich beider Regionen, so die Überlegung, könnte die Identifizierung von Kandidatengenen ermöglichen und somit zur Aufklärung des Pathomechanismus beim DiGeorge-Syndrom beitragen.

1.2.5.1. Krankheitsloci auf Chromosom 10p

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 sind bis Mai 2001 sechs Einzelgenerkrankungen, drei Suszeptibilitätsloci und eine Haploinsuffizienzregion kartiert worden. Von den sechs

Einzelgenerkrankungen wurde für zwei Krankheiten das mutierte Gen kloniert. Außerdem wurden auf 10p mehrere Loci für Tumorsuppressorgene kartiert (Abb. 1).

1.2.5.1.1. Einzelgenerkrankungen

Die Fettstoffwechselerkrankung Refsum-Krankheit wurde als autosomal rezessiver Erbgang auf Chromosom 10pter-10p11.2 kartiert (Nadal et al. 1995). 1997 gelang es zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, das verantwortliche Gen zu klonieren (Jansen et al. 1997; Mihalik et al. 1997). Mutationen in der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase (PAHX bzw. PHYH), die zu einer Inaktivierung des Proteins führen, sind für die sehr seltene Erkrankung verantwortlich.

Die zweite auf 10p kartierte Erkrankung mit identifiziertem Krankheitsgen ist die Megaloblastische Anämie Typ 1 (MGA1), bei der es sich um eine Vitamin B12-Mangelerkrankung handelt. Durch Kopplungsanalysen wurde der Krankheitslocus auf 10p12.1 kartiert (Aminoff et al. 1995). Mutationen auf beiden Allelen im Gen CUBN, das den intrinsischen Faktor des Vitamin B12-Rezeptors, Cubilin, kodiert, führen zur Erkrankung (Aminoff et al. 1999).

Neben diesen zwei Erkrankungen sind weitere vier Einzelgenerkrankungen auf 10p lokalisiert worden (Stand Mai 2001). In allen Fällen konnten die entsprechenden Krankheitsgene noch nicht identifiziert werden. Es handelt sich um einen Locus für ein primäres Glaucom mit offenem Kammerwinkel, GLC1E (Sarfarazi et al. 1998), um einen Locus für eine Blutkrankheit, Thrombozytopenie Typ 2, THC2, (Savoia et al. 1999), um einen Locus für einen schweren Immundefekt, SCIDA (Li et al. 1998) und um einen Locus für eine Herzerkrankung, ARVD6 (Li et al. 2000). Die ungefähre Position der Krankheitsloci kann der Abbildung 1 entnommen werden.

1.2.5.1.2. Suszeptibilitätsloci und Haploinsuffizienzregionen

Auf der Suche nach Suszeptibilitätsgenen in multigenen Erkrankungen wurden Hinweise dafür gefunden, daß bei drei Erkrankungen Suszeptibilitätsgene auf 10p lokalisiert sein könnten. Dabei handelt es sich um Diabetes mellitus Typ 1, IDDM10 (Davies et al. 1994; Reed et al. 1997), um Schizophrenie (Faraone et al. 1998; Faraone et al. 1999; Foroud et al. 2000; Kendler et al. 2000; Levinson et al. 2000; Schwab et al. 1998) und um Adipositas, OB10 (Hager et al. 1998).

Wie oben erwähnt, wurden einige Patienten mit partieller Monosomie 10p und einem assoziierten DiGeorge-Syndrom beschrieben. Diese Fälle weisen darauf hin, daß es neben dem Hauptlocus auf Chromosom 22q11 noch eine Haploinsuffizienzregion auf 10p gibt.

1.2.5.1.3. Tumorloci

Somatische Chromosomenaberrationen, die den kurzen Arm von Chromosom 10 beinhalten, sind bei verschiedenen Tumorerkrankungen beobachtet worden. Mehr als 40 unterschiedliche 10p-Aberrationen wurden bisher beschrieben, wobei akute myeloische Leukämien die Mehrzahl der Erkrankungen ausmachen. In den meisten Fällen sind die beiden Banden 10p11 und 10p12 betroffen (Mitelman et al. 1997). Viele Leukämien sind mit einer Translokation von Chromosom 11q23 assoziiert. Eine dieser Translokationen betrifft auch das Chromosom 10p. So wurde bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie eine Translokation $t(10;11)(p12;q23)$ beschrieben, bei der das Gen AF10 von Chromosom 10p12 mit dem Gen MLL von Chromosom 11q23 fusioniert (Chaplin et al. 1995a; Chaplin et al. 1995b).

In Gliomen sind mehrere LOH-Regionen auf verschiedenen Chromosomen identifiziert worden. Karlbom et al. bestimmte drei LOH-Regionen auf Chromosom 10, zwei auf 10q und eine nahe des Telomers von 10p (Karlbom et al. 1993). Kimmelman et al. identifizierte ebenfalls eine etwa 3 cM überspannende LOH-Region auf 10p15 in Gliom-Patienten (Kimmelman et al. 1996). Auf 10p15 sollte daher ein Tumorsuppressorgen lokalisiert sein, das bei der Entstehung von Gliomen eine entscheidende Rolle spielt.

Eine weiterer Locus für ein Tumorsuppressorgen, ST12 bzw. PAC1, wurde in Prostata-Karzinomen in die Region 10pter-10q11 kartiert (Sanchez et al. 1996).

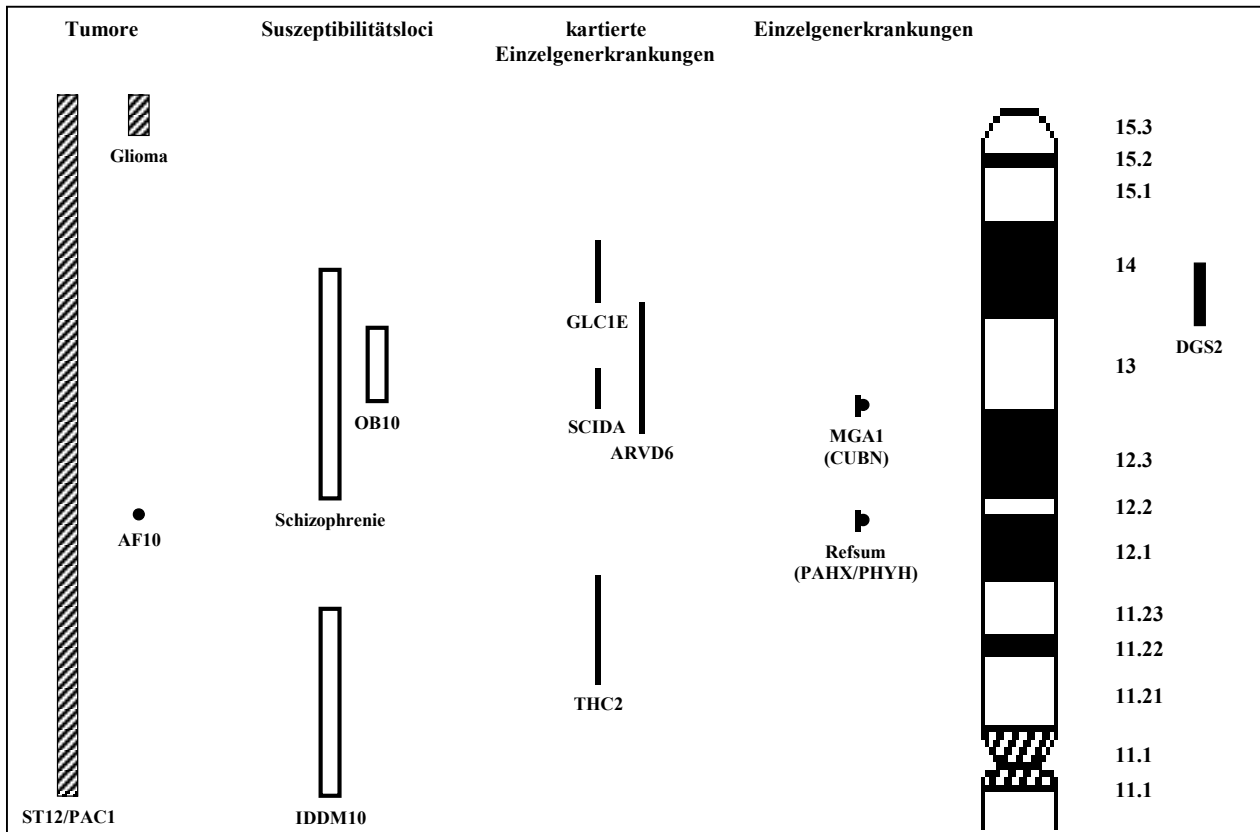


Abbildung 1: Zytogenetische Lokalisation von Krankheitsloci auf Chromosom 10p. Die Haploinsuffizienzregion DGS2 ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und ist rechts vom Chromosom dargestellt. Die Abkürzungen für die Krankheiten sind im Text erläutert.

1.2.5.2. Phänotyp

Patienten mit einer Mikrodeletion 22q11 sowie einer Monosomie 10p werden klinisch häufig als DiGeorge-Syndrom-Patienten charakterisiert. Um die unterschiedlichen Ursachen in den beiden Patientengruppen zu betonen, wird zwischen einem DiGeorge-Syndrom 1 (DGS1) und einem DiGeorge-Syndrom 2 (DGS2) unterschieden. Ein Vergleich der Phänotypen in den beiden Patientengruppen zeigt neben großen Ähnlichkeiten auch deutliche Unterschiede (Van Esch et al. 1999; Ryan et al. 1997). Sowohl die partielle Monosomie 10p als auch die Monosomie 22q11 sind durch eine sehr variable Expressivität des Phänotyps gekennzeichnet. Bei den meisten Patienten findet man nur ein Teilspektrum der Symptome des klassischen DiGeorge-Syndroms. Dies geht soweit, daß einige Patienten mit Deletionen keine DGS-Symptome zeigen, was eine verminderte Penetranz des DGS1 und des DGS2 belegt. Del(10p)-Patienten zeigen im allgemeinen eine schwerere mentale Retardierung als del(22q11)-Patienten und sind in etwa 90 % der Fälle kleinwüchsig (36 % bei del(22q11)-

Patienten). Nieren-Fehlbildungen werden in 56 % der del(10p)-Patienten und in 36 % der del(22q11)-Patienten gefunden. Folglich scheinen Abnormalitäten des Harntraktes in DGS2-Patienten häufiger vorzukommen. Umgekehrt verhält es sich mit den Herzfehlern, die bei 75 % der del(22q11)-Patienten und etwa der Hälfte der del(10p)-Patienten beobachtet werden. Die Herzfehler bei del(10p)-Patienten sind heterogener und beinhalten neben den DGS typischen konotrunkalen Herzfehlern u.a. auch Atrium- und Ventrikel-Septumdefekte, Aortenstenosen und Pulmonalstenosen. Zu den klassischen DGS-Symptomen gehören Immundefekte, wobei neuere Studien zeigen, daß sowohl bei del(22q11)- als auch bei del(10p)-Patienten diese seltener zu beobachten sind, als früher angenommen wurde. In beiden Patientengruppen findet man zu etwa 60 % eine Hypokalzämie meist als Folge eines Hypoparathyreoidismus. Die Kalzium-Werte normalisieren sich in der Mehrzahl der Fälle im Laufe der Entwicklung und sind gewöhnlich ein klinisches Problem der neonatalen Periode. Die Hypokalzämie bzw. der Hypoparathyreoidismus gehören sowohl bei del(22q11)-Patienten wie bei del(10p)-Patienten zu den Hauptmerkmalen des DGS-Phänotyps. Del(10p)-Patienten zeigen faziale Auffälligkeiten, die aber weniger spezifisch sind als bei DGS1-Patienten (Abb. 2). Außer den Symptomen, die bei DGS-Patienten typischerweise gefunden werden, zeigen del(10p)-Patienten auch Symptome, die nicht zum DGS-Spektrum gehören. Man findet bei 62 % der del(10p)-Patienten eine beidseitige sensorineurale Schwerhörigkeit, die sich mit zunehmendem Alter verschlechtert. Bei der Schwerhörigkeit, die bei etwa einem Drittel der del(22q11)-Patienten gefundenen wird, handelt es sich dagegen um einen konduktiven Hörverlust, so daß von unterschiedlichen molekularen und pathogenetischen Mechanismen in beiden Patientengruppen ausgegangen werden muß. Während eine Ptosis bei 22q11-Deletionen fast nicht bekannt ist, wird sie bei Patienten mit partieller Monosomie 10p gehäuft gefunden.

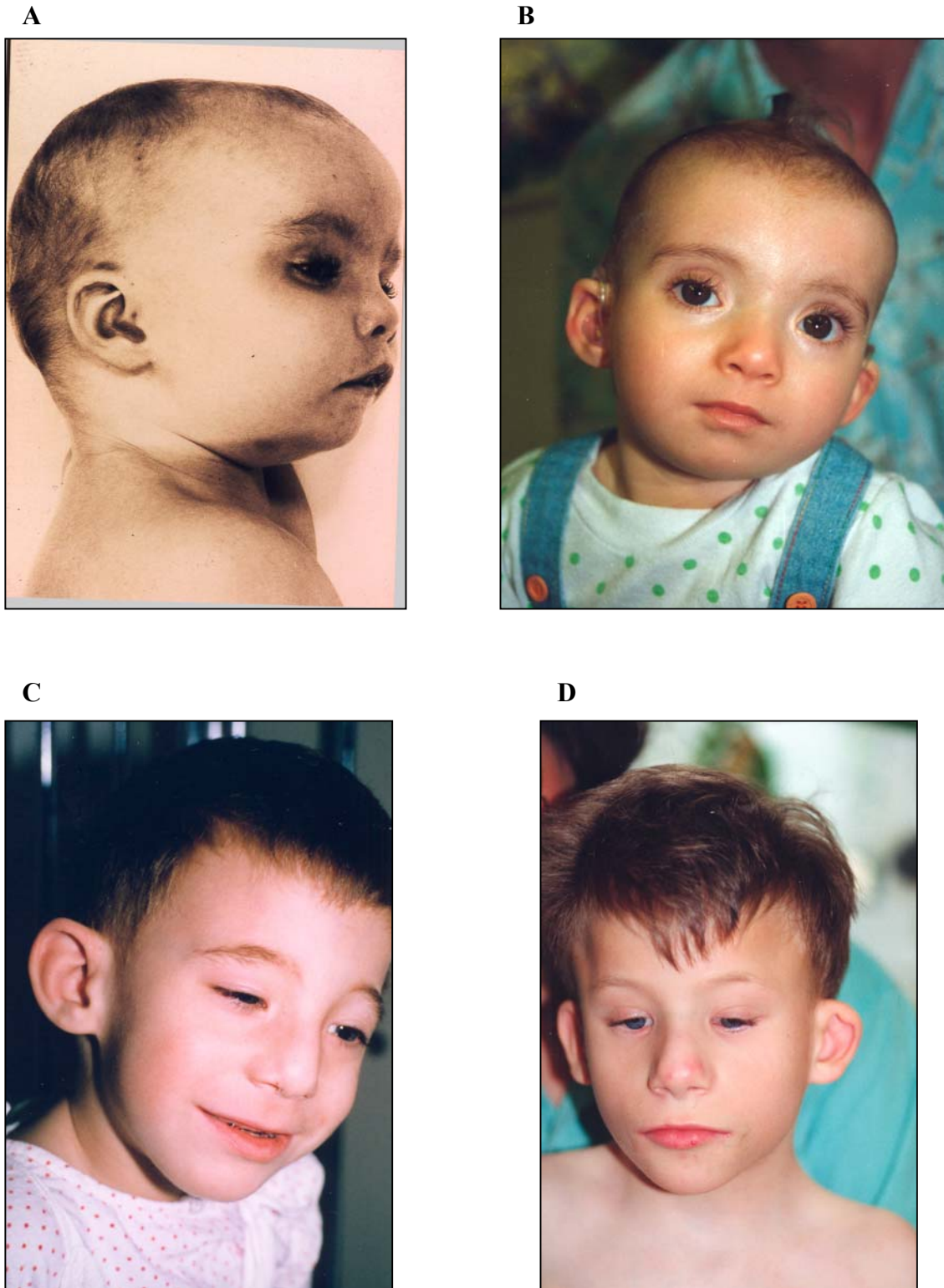


Abbildung 2: Phänotyp des DiGeorge-Syndroms.
Gezeigt sind vier Patienten mit DiGeorge-Syndrom.

A: Gesicht eines DiGeorge-Syndrom-Patienten mit einer Mikrodeletion 22q11.

B, C, D: Drei Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p und einem DiGeorge-Syndrom ähnlichen Phänotyp (B - Patient MAJ, C- Patient HOV, D - Patient ROB). Die chromosomalen Bruchpunkte der drei Patienten wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der Arbeit bestand darin, anhand molekulargenetischer Untersuchungen bei Patienten mit partieller Monosomie 10p eine oder mehrere Haploinsuffizienzregionen für das DGS auf 10p zu identifizieren und zu charakterisieren und damit einen Beitrag zur Erforschung der genetischen Ursachen des DGS zu leisten.

Die Isolierung geeigneter FISH-Sonden von Chromosom 10p und deren genaue Kartierung waren dafür eine wesentliche Voraussetzung. Mit Hilfe dieser Sonden sowie mit hochpolymorphen Markern sollte bei Monosomie 10p-Patienten eine Deletionskartierung vorgenommen werden. Eine anschließende Genotyp-Phänotyp-Analyse sollte eine kleinste überlappende Region (SRO) definieren, für die alle Patienten mit einem spezifischen Phänotyp deletiert sind.

Über die Haploinsuffizienzregion sollten mit genomischen Klonen Contigs etabliert werden, mit dem Ziel, diese im Rahmen des Humangenomprojekts zu sequenzieren. Eine In-silico-Analyse der Sequenzierdaten sollte sich anschließen. Die dabei identifizierten Transkripte aus der Haploinsuffizienzregion sollten über Expressionsstudien näher charakterisiert werden, um einzelne Gene als potentielle Kandidatengene für die Ausbildung des DGS-Phänotyps zu identifizieren. Eine Mutationsanalyse dieser Gene bei zytogenetisch normalen DGS-Patienten sollte folgen.

Über die Untersuchungen auf dem Chromosom 10 hinaus, sollten auch Patienten untersucht werden, die hemizygot für DGS-Kandidatengene aus der Maus waren.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit molekulargenetisch und zytogenetisch untersuchten Patienten wurden z.T. im Rahmen der genetischen Diagnostik und Beratung in der Abteilung für Medizinische Genetik der Kinderpoliklinik untersucht (Prof. J. Murken, Dr. H. Seidel, Dr. I. Rost). Von der Mehrheit der Patienten wurden Blutproben, DNA oder Chromosomenpräparate aus Kliniken, Praxen oder anderen genetischen Beratungsstellen zugesandt. Von einem Teil der Patienten wurden lymphoblastoide Zelllinien etabliert. Die Daten von einigen für die Arbeit besonders bedeutenden Patienten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Eine 10p-Deletionskartierung wurde bei 16 Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p und einem Patienten mit einer balancierten Translokation t(10p;14q) durchgeführt. Bei 22 zytogenetisch normalen DGS-Patienten wurde mit FISH-Sonden nach Mikrodeletionen auf 10p gesucht. Bei 104 Patienten mit angeborenen Herzfehlern (P. Scambler, London; P. Bouvagnet, Lyon; J. Henwood, Leeds) und fünf Foeten mit Thymus-Hypoplasie (M. Vekemans, Paris; H. Rehder, Marburg) wurden Mutationsanalysen im NAPOR-Gen vorgenommen. Bei 13 Patienten wurde im GATA3-Gen nach Mutationen bzw. Deletionen gesucht. Außerdem wurde bei zwei Patienten mit interstitiellen Deletionen auf 14q11q13 eine genauere Deletionskartierung durchgeführt.

2.2. Laborgeräte und Laborhilfsmittel

Produkt

Gelelektrophoresekammern
Kulturflaschen 25cm²
Peltier Thermo Cycler PTC-200
Pipettenspitzen für Gilson-Pipetten
Reaktionsgefäße 0,5ml; 1,5ml; 2,0ml
Reaktionsröhrchen 15ml; 50ml
Sequenzierer ABI PRISMTM-System 377
Sterilfilter

Firma

Effenberger, Gibco BRL
Greiner
MJ Research
Sarstedt
Eppendorf
Sarstedt
Applied Biosystems
Sartorius

Tabelle 2: Zusammenfassung der klinischen Symptome von Patienten mit 10p-Aberrationen.

<i>Patient</i>	<i>GM3470</i>	<i>AMS*</i>	<i>MEG</i>	<i>MAR*</i>	<i>LEM*</i>	<i>GM6936</i>
Zelllinie	FCL	LCL	LCL	LCL	LCL	LCL
Referenz 1)	A	b	c	d	b	e
10p-Aberration	del(10) (p12p13)	del(10) (p12p13)	del(10) (p12p13)	del(10) (p11p13)	del(10) (p13)	del(10) (p13)
Geschlecht	w	w	w	m	m	w
Untersuchungsalter (Jahre)		4 4/12	1 6/12	1/12	10 4/12	5
<i>DGS-Symptome</i>						
Hypoparathyreoidismus		-	-		+	+
Hypokalzämie		-	-	+	+	+
Thymus-Hypoplasie		-	+	+	-	-
T-Zelldefekt		-	+	+		+
Infektionen 2)		-	+	+	UT/OM	UT
Herzfehler 3)		-	VSD/ASD	ASD	-	PS
<i>andere Symptome</i>						
pränatale Wachstumsretardierung		-	+	-	-	-
postnatale Wachstumsretardierung		-		+	+	+
psychomotorische Retardierung	+	+	+		+	+
Muskel-Hypotonie		+			+	
Krampfanfälle		-	-		-	+
Nierendefekte 4)		-	-	HN	VR	VR
Kryptorchismus				+	+	
Hernien		-	-	+(I)	-	
Hand-/Fußanomalien 5)		K5, CS2/3	FC	K5, CS2/3	-	K
<i>kraniofaziale Symptome</i>						
abnormaler Schädel 6)	MC	BC	-	DC	DC, MC	MC
Hypertelorismus	-	-	-	-	+	+
Gaumenspalte		-	+	-	-	-
Schwerhörigkeit		-	-		-	
DGS/VCFS-Spektrum	nein 7)	nein	ja	ja	ja	ja

Sind Symptome nicht bekannt, ist die Zelle leer; w - weiblich; m - männlich; r - rechte Seite; l - linke Seite; LCL - lymphoblastoide Zelllinie; FCL - Fibroblasten-Zelllinie.

1) a - Coriell NGMS Katalog; b - (Schuffenhauer et al. 1998); c - (Lipson et al. 1996); d - (Obregon et al. 1992); e - (Greenberg et al. 1986); f - (Shapira et al. 1994); g - (Schuffenhauer et al. 1995); h - (Koenig et al. 1985); i - (Cowchock 1989); 2) GT - Gastrointestinaltrakt; OM - Otitis media; RT - respiratorischer Trakt; UT - Harntrakt; 3) ASD - Atriumseptumdefekt; AVS - Aortenklappenstenose; BAV - bicuspidale Aortenklappe; PS - Pulmonalstenose; TOF - Fallot'sche Tetralogie; VSD - Ventrikelseptumdefekt;

Material und Methoden

<i>BIH</i>	<i>MAJ</i>	<i>HOV</i>	<i>ROB</i>	<i>TAT</i>	<i>KAN</i>	<i>GM10207</i>	<i>Patient</i>
FCL	LCL	-	LCL	LCL	LCL	LCL	Zelllinie
f	g	b	b	h	b	i	Referenz 1)
del(10)(p13)	del(10)(p13)	del(10)(p13)	del(10)(p12)	del(10)(p13)	del(10)(p13)	t(10;14)(p13;p24)	10p-Aberration
m	w	m	m	m	m	m	Geschlecht
4	2 8/12	4 10/12	9 6/12	1 3/12	3		Untersuchungsalter
							<u>DGS-Symptome</u>
-	+	+		-	+	-	Hypoparathyreoidismus
-	+	+	+	+	+	-	Hypokalzämie
	+	-	-		-	-	Thymus-Hypoplasie
-	+	+	-	-	+	-	T-Zelldefekt
RT	RT/OM	UT	RT/GT	RT	RT	-	Infektionen 2)
BAV	TOF	-	AVS	-	-	(VSD) 8)	Herzfehler 3)
							<u>andere Symptome</u>
-	-			-	+	-	präinatale Wachstumsretardierung
+	+	+	+	+	+	-	postnatale Wachstumsretardierung
+	+	+	+	+	+	-	psychomotorische Retardierung
	+	+	+	+	+	-	Muskel-Hypotonie
		+	-	+		-	Krampfanfälle
HK(r)	HK(r),DP(l),VR	VR	-	-	HK(l),VR(l)	-	Nierendefekte 4)
		+	+	+	+	-	Kryptorchismus
-	-	-	+	+	-	-	Hernien
K5	PE	K	K5	CS2/3	-	-	Hand-/Fußanomalien 5)
							<u>kraniofaziale Symptome</u>
MC		MC	-	AS	AS	-	abnormaler Schädel 6)
	+	-	-	-	+		Hypertelorismus
-	-	-	-	-	-	+	Gaumenspalte
+	+	+	-		-	-	Schwerhörigkeit
nein	ja	ja	ja	ja	ja	nein	DGS/VCFS-Spektrum

4) DP - dichotomisches Pyelon; HK - hypoplastische Niere; HN - Hydronephrose; VR - vesicoureteraler Reflux; 5) CS2/3 - cutane Syndaktylie der Zehen 2 und 3; FC - Fingerkontrakturen; KS - Klinodaktylie des 5. Fingers; PE - Pes equinovarus; 6) AS - asymmetrischer Schädel; BC - Brachycephalie; DC - Dolichocephalie; MC - Mikrocephalie; 7) Patient GM3470 wurde aufgrund zu weniger Daten nicht in das DiGeorge-Syndrom-Spektrum eingeordnet, gleichwohl ist ein DiGeorge-Syndrom in diesem Patienten nicht auszuschließen; 8) GM10207 hat eine bilaterale Gaumenspalte, ist ansonsten aber gesund; sein Sohn trägt dieselbe Translokation und hat einen isolierten Ventrikelseptumdefekt.

2.3. Chemikalien und andere Materialien

Anorganische und organische Grundchemikalien wurden von der Apotheke der LMU München, den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) sowie den unten genannten Firmen bezogen. Weitere Chemikalien und andere Materialien sind im Methodenteil aufgeführt.

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>
Acrylamid	BIO-RAD
Agarose	Biozym
Agarose LGT	Biozym
Anti-Avidin	Vektor Laboratories
Antibiotika	Sigma
[α ³² P]-dCTP (370 MBq/ml, 10 mCi/ml)	Amersham
Avidin-FITC	Sigma
Bacto-Agar, -Trypton	Serva
Bisacrylamid	BIO-RAD
Byodine B Transfer Membrane	Pall
Colcemid (Kolchizin)	Gibco BRL
DAPI	Sigma
Dextransulfat	Pharmacia
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Pharmacia
Ficoll 400	Pharmacia
FKS	Roche Diagnostics
Giemsa-Farblösung	Merck
Glaskugeln	Sigma
Hefeextrakt	Serva
Humane COT-1 DNA	Gibco BRL
IPTG (dioxanfrei)	Roth
Längenstandard 1 kb-Leiter	Gibco BRL
Längenstandard V	Roche Diagnostics
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Tris	USB
Tween 20	Sigma
X-Gal	Sigma

2.4. Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und je nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert. Danach wurde der pH-Wert eingestellt. Die Mehrzahl der Lösungen und Puffer sind in den entsprechenden Abschnitten des Methodenteils aufgeführt.

2.4.1. Puffer und Lösungsmittel

<u>PCR-Puffer 10 x:</u>	500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 15 mM MgCl ₂ , 0,1 % (w/v) Gelatine.
<u>Probenauftragspuffer 6 x:</u>	15 % Ficoll 400, 0,25 % Orange G.
<u>SSC 20 x:</u>	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat.
<u>TAE 50 x:</u>	2 M Tris, 50 mM EDTA, 57,1 ml Eisessig/l.
<u>TBE 10 x:</u>	900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0.
<u>TE:</u>	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5.
<u>PCI:</u>	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1).
<u>CI:</u>	Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1).

2.4.2. Nährmedien

<u>LB-Medium:</u>	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l Aqua bidest.
<u>LB-Agar:</u>	1,5 g Bacto-Agar/100 ml LB-Medium.
<u>SOC-Medium:</u>	20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 186 mg KCl, 4 g Glucose, ad 1 l Aqua bidest.
<u>TYM-Medium:</u>	10 g Bacto-Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 3,0 g NaCl, ad 1 l Aqua bidest.
<u>2 x YT-Medium:</u>	16 g Bacto-Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l Aqua bidest.
<u>YPD-Medium:</u>	10 g Bacto-Trypton, 20 g Hefeextrakt, 20 g Glucose, ad 1 l Aqua bidest.
<u>YPD-Agar:</u>	1,5 g Bacto-Agar/100 ml YPD-Medium.

2.5. Kits

Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
BioNick™ Labeling System	Gibco BRL
GeneAmp®XL PCR Kit	Applied Biosystems
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN

2.6. Zellkultur

2.6.1. Primäre Lymphozyten-Kulturen

Die primären Lymphozyten-Kulturen dienten der Chromosomenanalyse mittels GTG-Bänderung und der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH).

Etwa 0,7 ml steriles heparinisiertes Vollblut wurde in einem mit einem Silikonstopfen verschlossenen 25 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml Kulturmedium A oder B versetzt und bei 37°C kultiviert. Antibiotika wurden nur zugegeben bei Blutproben zweifelhafter Sterilität. Diesen Kulturen wurde Penicillin (EK: 10 IE/ml) und Streptomycin (EK: 10 µg/ml) für die gesamte Kulturdauer zugesetzt. Nach 72 h erfolgte die Chromosomenpräparation.

Kulturmedien:

- A) RPMI 1640 mit 20 % foetalem Kälberserum (FKS) (v/v), 0,1 ml Phytohämagglutinin (PHA) (PHA-M, Wellcome) und 0,1 ml PHA (PHA-HA15, Seromed) pro 10 ml RPMI 1640/20 % FKS.
- B) McCoy's 5A/20 % FKS, 0,1 ml PHA-M und 0,1 ml PHA-HA15 pro 10 ml McCoy's 5A/20 % FKS.

2.6.2. Lymphoblastoide Zelllinien

Die Etablierung von lymphoblastoiden Zelllinien erfolgte durch Transformation von Leukozyten mit Epstein-Barr-Virus (EBV) nach einem modifizierten Protokoll von Neitzel (Neitzel 1986). Die Leukozyten wurden über einen Ficoll-Gradienten (1400 U/min, 30 min) isoliert, zweimal mit PBS gewaschen, in 1,0 ml Kulturmedium C aufgenommen und mit 1,0 ml EBV-Überstand versetzt. Der EBV-Überstand wurde durch Filtration (Millipore 0,45 µm) des Kulturmediums einer mit EBV transformierten Primatenzelllinie (B95-8) gewonnen und bei -70°C aufbewahrt.

Kulturbedingungen:

Kulturmedium C, 37°C, 5 % CO₂, 80 % Luftfeuchtigkeit.

Etwa 1-2 Wochen nach dem Kulturansatz erfolgte in Abhängigkeit vom Zellwachstum die Zugabe von 1-3 ml Kulturmedium C, danach in Abhängigkeit vom Zellwachstum eine wiederholte Zugabe bzw. später ein partieller Austausch von Kulturmedium C (wöchentlich ca. 2 x).

Asservierung:

Nach Anreicherung (1400 U/min, 10 min) wurden die Zellen bis zu einer Zelldichte von ca. 2×10^6 /ml in Kulturmedium C resuspendiert. Nach Zugabe von 1 Vol. Kulturmedium D (4°C) wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt, einer Mehrschrittgefrierung unterzogen (60 min/-20°C, langsames Abkühlen auf -70°C in Styroporbehälter über ca. 24 h) und in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

Reaktivierung:

Die Reaktivierung der Zellen erfolgte durch rasches Auftauen bei 37°C, sofortiges Waschen mit 10 ml PBS (Toxizität von DMSO) (1400 U/min, 10 min, 4°C) und Resuspension in 5 ml Kulturmedium C.

Kulturmedien:

- C) RPMI 1640/10 % FKS, 200 mM L-Glutamin, 100 mM Natrium-Pyruvat, Penicillin/Streptomycin (EK: 10 IE/ml / 10 µg/ml).
- D) Kulturmedium C mit 10 % DMSO (Einfriermedium).

2.7. Zytogenetische Methoden

2.7.1. Präparation von Chromosomen

2.7.1.1. Chromosomenpräparation aus primären Lymphozyten-Kulturen

Vor der Chromosomenpräparation wurden die primären Lymphozyten-Kulturen für 10 min mit Colcemid (EK: 0,1 µg/ml) versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Chromosomenpräparation erfolgte unmittelbar danach und wurde nach folgender Standardmethode durchgeführt (Dutrillaux und Couturier 1983).

- (1) Zellernte: Abtrennen des Kulturmediums durch Zentrifugation der Zellkultur (1000 U/min, 10 min).
- (2) Hypotone Behandlung: Resuspension der Zellen in 6 ml 75 mM KCl, Inkubation für 10-12 min bei 37°C, Zentrifugation (800 U/min, 10 min).
- (3) Fixation: Resuspension der Zellen in Fixativ (Ethanol/Essigsäure = 1/3) durch rasches aber vorsichtiges Pipettieren unter Vermeidung von größeren Luftblasen,

Zentrifugation (1000 U/min, 10 min), 2-3 maliges Wiederholen der Fixation, vor letzter Zentrifugation Inkubation bei 4°C für 15 min.

- (4) Herstellung der Chromosomenpräparate: Auftropfen der fixierten Suspension geeigneter Zelldichte auf gekühlte (4°C), fettfreie mit Aqua dest. beschichtete Objektträger; nach Beurteilung der Präparate im Phasenkontrastmikroskop gegebenenfalls Einstellung der Zelldichte sowie Variation der Auftropfhöhe.

2.7.1.2. Chromosomenpräparation aus lymphoblastoiden Zelllinien

Die o.g. Methode wurde folgendermaßen modifiziert (Schuffenhauer 1997):

- (1) Zellernte bei einer nicht synchronisierten Zellkultur: 15-20 h nach partiellem Mediumersatz und 10-30 min Colcemid-Inkubation (EK: 0,1 µg/ml).
- (2) Hypotone Behandlung: 25-30 min, vor Zentrifugation Zugabe von 2-3 Tropfen Fixativ und vorsichtiges Mischen (Präfixation zur Vermeidung von Zelladhäsionen).

2.7.2. GTG-Karyotypisierung von Chromosomen

Als Routinebänderungsmethode diente die G-Bänderung mit Trypsin und Giemsa-Farbstoff (GTG) (Seabright 1971). Die Karyotypisierung erfolgte nach den Richtlinien der Association of Cytogenetic Technologists Task Force zur Chromosomenanalyse (Knutsen et al. 1990). Mindestens 8 Mitosen mit GTG-Färbung (400-550 BpH) wurden strukturell analysiert und mindestens ein GTG-Karyogramm erstellt. Wenigstens 5 Mitosen und das Karyogramm wurden im Computer dokumentiert.

2.8. Molekularzytogenetische Methoden

2.8.1. Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

Es wurde im wesentlichen dem Protokoll der Chromosomen-in situ-Suppressions-Hybridisierung nach Lichter et al. (Lichter et al. 1988) gefolgt.

2.8.1.1. Vorbereitung der Präparate

Als Präparate dienten Objektträger mit frisch aufgetropften Chromosomensuspensionen, höchstens 2 Wochen alte Präparate (Lagerung bei 4°C) oder ältere Präparate, die bei -70°C gelagert wurden.

Vor der Hybridisierung wurden die Präparate in 2 x SSC inkubiert (37°C, 30 min), anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert (70 %, 90 %, 100 % Ethanol, jeweils 3 min) und an der Luft getrocknet.

2.8.1.2. Vorbereitung der Sonden

Die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung wurde mit zwei Arten genomischer Klone als Sonden durchgeführt, künstlichen Hefechromosomen (YACs) und von P1 abstammenden künstlichen bakteriellen Chromosomen (PACs). Die Markierung erfolgte mit Biotin-14-dATP über eine Nicktranslation. Aliquots der Nicktranslationen wurden zur Kontrolle der Produktgrößen (optimale Größe 200-500 bp) auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen. Pro Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung wurde der halbe Nicktranslations-Ansatz (0,5 µg DNA) (Inter-Alu-PCR Produkte, PAC-DNA) bzw. der gesamte Nicktranslations-Ansatz (1 µg DNA) (gesamte Hefe-DNA-Präparationen) mit humaner COT-1TM-DNA (10 µg) und SS-DNA (20 µg) alkoholisch gefällt.

2.8.1.2.1. Markierung von YAC-Klonen

Die Markierung der DNA wurde mit dem BioNickTM Labeling-System (Gibco BRL) durchgeführt. Es wurde sowohl DNA aus der Hefe-DNA-Präparation direkt eingesetzt, als auch rein humane DNA, die mittels Inter-Alu-PCR aus Hefe-DNA-Präparationen gewonnen wurde. Das Herstellerprotokoll wurde dabei folgendermaßen modifiziert:

- (a) Für Inter-Alu-PCR Produkte: Der Nicktranslations-Ansatz wurde 30 min bei 16°C inkubiert.
- (b) Für gesamte Hefe-DNA-Präparationen: Dem Nicktranslations-Ansatz wurde zusätzlich DNaseI zugegeben (EK: 0,2 U/µl) und die Reaktionszeit auf 2 h verlängert.

2.8.1.2.2. Markierung von PAC-Klonen

Die Markierung der DNA wurde mit dem BioNickTM-Labeling-System (Gibco BRL) durchgeführt. Folgende Modifikationen zum Herstellerprotokoll wurden eingeführt: Dem Nicktranslations-Ansatz wurde zusätzlich DNaseI zugegeben (EK: 0,003 U/ μ l) und die Reaktionszeit auf 2 h verlängert.

2.8.1.3. Hybridisierungs-, Wasch- und Färbebedingungen

Denaturierung: Der mit COT-1TM-DNA und SS-DNA gefällte Nicktranslations-Ansatz wurde in 5 μ l deionisiertem Formamid und 5 μ l Hybridisierungsmix gelöst, die DNA denaturiert (75°C, 5 min) und anschließend präassoziiert (37°C, 20 min).

Die Chromosomenpräparate wurden in einer Denaturierungslösung inkubiert (70°C, 2,5 min), sofort danach über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydratisiert (70 %, 90 %, 100 % Ethanol, 0°C, je 2 min) und an der Luft getrocknet.

Hybridisierung: Die DNA-Sonde wurde auf das entsprechende Hybridisierungsfeld des Präparats getropft und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) abgedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden mit einem Gummiklebstoff (Fixogum, Marabuwerke GmbH & Co., Tamm) abgedichtet und das Präparat in einer feuchten Kammer inkubiert (37°C, 1-3 d).

Waschen: Nach Entfernen des Deckglases wurden folgende Waschschrte durchlaufen: 3 x Waschlösung 1 (45°C, 5 min), 3 x 0,1 x SSC (60°C, 5 min) und 1 x 4 x SSC/0,2 % Tween 20 (37°C, 1 min). Dann wurden die Präparate mit 1 ml der Blockinglösung in einer feuchten Kammer inkubiert (37°C, 20 min) und anschließend mit 4 x SSC/0,2 % Tween 20 gewaschen (37°C, 1 min).

Färbung: Gefärbt wurden die Präparate mit FITC-Avidin und wenn nötig anschließend zur Verstärkung des Signals mit Anti-Avidin gefolgt von FITC-Avidin. Die Inkubation mit den FITC-Avidin- und Anti-Avidin-Lösungen (jeweils 100 μ l) fand in einer feuchten Kammer statt (37°C, 45 min), und die Präparate wurden nach der Inkubation 3 x mit 4 x SSC/0,2 % Tween 20 gewaschen (37°C, 3 min). Gegengefärbt wurden die Chromosomen mit DAPI. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. (RT, 1 min) wurden die Präparate mit einer DABCO-Lösung eingedeckelt.

Lösungen:

Hybridisierungsmix:	20 % Dextransulfat/4 x SSC, pH 7,0.
Denaturierungslösung:	70 % Formamid/30 % 2 x SSC, pH 7,0.
Waschlösung 1:	50 % Formamid/50 % 2 x SSC, pH 7,0.
Blockinglösung:	5 % BSA/4 x SSC, pH 7,0.
FITC-Avidin-Lösung:	(Sigma), 1 : 200-Verdünnung in 4 x SSC/0,2 % Tween 20.
Anti-Avidin-Lösung:	(Vektor Laboratories), 1 : 200-Verdünnung in 4 x SSC/0,2 % Tween 20..
DAPI-Lösung:	0,025 % DAPI/Aqua dest.
DABCO-Lösung:	1,8 M DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan) in 90 % Glycerin, 10 % 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0).

2.8.1.4. Auswertung

Die Auswertung und Dokumentation erfolgte am Mikroskop Axiophot (Carl Zeiss, Frankfurt) in Kombination mit einer CCD-Farbkamera und der Software MacProbe_v4.0 (psi Scientific Systems). Zum Ausschluß von Mikrodeletionen 10p wurden mindestens 20 Mitosen mit Signalen auf beiden Chromosomen 10 ausgewertet. Für die Bestimmung einer Deletion auf Chromosom 10p wurden mindestens 20 Mitosen mit Signalen nur auf dem intakten Chromosom 10 ausgewertet. Sonden, die Deletionsbruchpunkte überdecken, wurden aufgrund unterschiedlicher Signalintensitäten zwischen intaktem und deletiertem Chromosom ermittelt.

2.9. Molekulargenetische Methoden

Die Mehrheit der hier in Kurzform dargestellten molekulargenetischen Methoden sind detailliert in Sambrook et al. (Sambrook et al. 1989) beschrieben.

2.9.1. DNA-Isolierung

2.9.1.1. Präparation von DNA aus Lymphozyten

Die DNA-Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Miller (Miller et al. 1988). 5-10 ml EDTA-Blut wurden mit 40-45 ml kaltem Lysis-Puffer gemischt, 15 min auf Eis unter mehrmaligem Durchmischen inkubiert und zentrifugiert (1500 U/min, 10 min, 7°C). Das Pellet wurde in 40-50 ml Lysis-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis gestellt und zentrifugiert. Das die kernhaltigen Zellen enthaltende Pellet wurde in 5 ml SE-Puffer aufgenommen, mit 25 µl Pronase E (10 mg/ml) und 250 µl SDS (20 %) versetzt und über Nacht bei 37°C oder 24-48 h bei RT inkubiert. Bei der DNA-Isolierung aus lymphoblastoiden

Zellen wurde das aus der Kultur gewonnene Zellpellet ohne Inkubation mit Lysis-Puffer direkt proteolytisch behandelt.

Die Proteinfällung erfolgte durch Zugabe von 2-3 ml 5 M NaCl, intensives Vortexen und Zentrifugation (2500 U/min, 15 min, RT). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Röhrchen gegossen und ggf. nochmals zentrifugiert (2500 U/min, 15 min, RT). Durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol (100 %, -20°C) erfolgte die DNA-Fällung. Die DNA wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 300-1000 µl TE-Puffer über Nacht unter ständigem Mischen gelöst. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm (1 OD₂₆₀ = 50 µg DNA/ml).

Puffer:

Lysis-Puffer: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,4.

SE-Puffer: 75 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA, pH 8,0.

2.9.1.2. Präparation von DNA aus Hefen

Bei beiden beschriebenen Präparationsprotokollen wird die DNA der transfizierten künstlichen Hefechromosomen (YACs) zusammen mit der genomischen Hefe-DNA isoliert. Eine Abtrennung der YACs von den Hefechromosomen ist mit diesen Methoden nicht möglich.

2.9.1.2.1. Schnellaufschluß von Hefen

10 ml einer angeimpften YPD-Kultur wurden in den Inkubationsschüttler gestellt (30°C, 48 h). Die Zellen wurden abzentrifugiert (2000 U/min, 5 min), in 500 µl Aqua bidest. resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals kurz in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet wurde mit 200 µl GDIS-Lösung, 200 µl PCI-Lösung und 0,35 g Glaskugeln versetzt und 2 min kräftig gevortext. Nach Zugabe von 200 µl Aqua bidest., Mischen und Zentrifugation (15000 U/min, 4 min) wurde der Überstand in 2 neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in jedes RNase A (EK: 50 ng/µl) zupipettiert. Die RNase A-Behandlung fand bei 37°C statt und dauerte 10 min. Danach wurde die DNA ethanolisch gefällt und in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Lösungen:

GDIS-Lösung: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA, 2 % Triton X-100, 1 % SDS.

2.9.1.2.2. Aufschluß von Hefen mit Lyticase

Diese Methode wurde für die Präparation größerer Mengen DNA bevorzugt.

100 ml einer angeimpften YPD-Kultur wurden in den Inkubationsschüttler gestellt (30°C, 48 h) und zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml Aufschlußlösung 1 resuspendiert, mit Lyticase versetzt (EK: 40 µg/ml) und inkubiert (37°C, 1 h). Nach Zentrifugation (1500 U/min, 10 min, RT) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml Aufschlußlösung 2 resuspendiert und inkubiert (65°C, 10 min). Die Suspension wurde auf RT abgekühlt und mit 1 Vol. Ethanol (100 %) versetzt. Nach der Zentrifugation (2000 U/min, 10 min, RT) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet getrocknet und in 2 ml TE-Puffer gelöst. Es folgte eine RNase A-Behandlung (EK: 50 ng/µl, 37°C, 30 min) und eine Proteinase K-Behandlung (EK: 50 ng/µl, 65°C, 1 h) und anschließend eine Extraktion mit PCI gefolgt von einer Extraktion mit CI. Die DNA wurde ethanolisch gefällt und in 500 µl TE-Puffer gelöst.

Lösungen:

Aufschlußlösung 1: 0,9 M Sorbitol, 20 mM Na₂EDTA, 14 mM β-Mercaptoethanol.

Aufschlußlösung 2: 4,5 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,15 M NaCl, 0,1 M Na₂EDTA, 0,05 % N-Lauroylsarkosin.

2.9.1.3. Präparation von extrachromosomaler DNA aus E. coli

2.9.1.3.1. Präparation von Plasmid-DNA

Alle Plasmid-Präparationen wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.9.1.3.1.1. Präparation von PAC-DNA

Wurden große Mengen an PAC-DNA benötigt, insbesondere für FISH-Sonden, wurde eine Maxipräparation durchgeführt. In allen anderen Fällen (DNA für PCR oder Restriktionsspaltungen) wurde die DNA nach dem Mikropräparationsprotokoll isoliert.

- (a) Maxipräparation: Es wurde nach der Methode von Birnboim und Doley (Birnboim und Doly 1979) vorgegangen. 200 ml LB-Medium versetzt mit Kanamycin (EK: 20 µg/ml) wurden mit dem Bakterienklon angeimpft und im Inkubator geschüttelt (37°C, 16 h). Nach Zentrifugation (3000 U/min, 15 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Bakteriensediment in 8 ml Aufschlußlösung 1 (0°C) resuspendiert und mit 16 ml

Aufschlußlösung 2 versetzt. Es wurde vorsichtig gemischt und die Suspension auf Eis 5 min inkubiert. Anschließend wurde sofort Aufschlußlösung 3 (0°C) zugegeben, wieder vorsichtig gemischt und der Ansatz 10 min auf Eis gestellt. Der wäßrige Überstand wurde durch Zentrifugation (3000 U/min, 15 min, 4°C) isoliert und die DNA durch Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol mit anschließender Zentrifugation (3500 U/min, 5 min) gefällt und in 70 %igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 800 µl TE-Puffer gelöst und mit RNase A behandelt (EK: 50 ng/µl, 37°C, 30 min). Es folgten Extraktionsschritte mit PCI und CI und zum Schluß eine ethanolische Fällung. Die DNA wurde in 500 µl TE-Puffer gelöst.

Lösungen:

Aufschlußlösung 1: 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM Na₂EDTA, pH 8,0.

Aufschlußlösung 2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS.

Aufschlußlösung 3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,0 (Eisessig).

- (b) Mikropräparation: Es wurde nach einem modifizierten Protokoll von Marra et al. (Marra et al. 1997) vorgegangen. Eine 1,2 ml 2 x YT Kultur versetzt mit Kanamycin (EK: 20 µg/ml) in einem 2 ml Reaktionsgefäß wurde mit der Bakterienkultur angeimpft und in den Inkubationsschüttler gestellt (37°C, 24 h). Die Bakterienkulturen wurden zentrifugiert (7000 U/min, 15 min), der Überstand abgegossen und das Zellsediment in 50 µl GET-Puffer (0°C) durch kräftiges Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe weiterer 150 µl GET-Puffer wurden 200 µl Aufschlußlösung 2 zupipettiert, vorsichtig gemischt und die Reaktion mit 200 µl Aufschlußlösung 3 (0°C) neutralisiert. Der Ansatz stand 10 min auf Eis bevor er zentrifugiert wurde (15000 U/min, 15 min). Der Überstand wurde über nichtsterile Gaze in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml), das bereits mit 600 µl Isopropanol gefüllt war, gegossen. Nach Inkubation (RT, 15 min) wurde zentrifugiert (15000 U/min, 15 min), das Pellet mit 200 µl 80 %igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (15000 U/min, 15 min). Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 30 µl TE-Puffer gelöst (37°C, 30 min).

Lösungen:

GET-Puffer: 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM Na₂EDTA, 0,12 mg/ml RNase A, pH 8,0.

2.9.1.4. Präparation von DNA-Blöckchen

Für die Auftrennung sehr großer DNA-Fragmente mittels einer Wechselfeldgelelektrophorese (PFGE) wurde DNA in Agaroseblöckchen präpariert.

2.9.1.4.1. Präparation von DNA-Blöckchen aus Lymphozyten

5-10 ml EDTA-Blut wurden mit 40-45 ml kaltem Lysis-Puffer gemischt, 15 min auf Eis inkubiert, durchmischt und zentrifugiert (1000 U/min, 10 min, 7°C). Das Pellet wurde in 30 ml Lysis-Puffer resuspendiert, wieder 15 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert und in 10 ml PBS aufgenommen. Die Zellkonzentration wurde bestimmt (Neubauer-Zählkammer), die Zellen abzentrifugiert und in soviel PBS aufgenommen, daß eine Endkonzentration von 3×10^7 Zellen/ml vorlag. Die Zellsuspension wurde 1:2 mit geschmolzener 2 %iger LGT-Agarose (50°C) vermischt und in die auf Eis vorgekühlten Blöckchen-Formen pipettiert. Die festen Blöckchen wurden in 25 ml NDS-Puffer überführt und nach Zugabe von Pronase E (EK: 1 mg/ml) im Wasserbad inkubiert (50°C, 16 h). Dies wurde einmal wiederholt und die Blöckchen anschließend noch 4 x kurz in NDS-Puffer gewaschen. In diesem Puffer wurden die Blöckchen bei 4°C gelagert.

Puffer:

Lysis-Puffer: 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM Na_2EDTA , pH 7,4.

NDS-Puffer: 0,5 M Na_2EDTA , 10 mM Tris-HCl, 35 mM N-Lauroylsarkosin, pH 9,5.

2.9.1.4.2. Präparation von DNA-Blöckchen aus Hefen

Eine 50 ml Hefekultur, die sich noch nicht in der stationären Phase befindet, wurde zentrifugiert (1500 U/min, 10 min), das Zellsediment in 10 ml 50 mM EDTA (pH 8,0) gewaschen, zentrifugiert (1500 U/min, 10 min) und in 1 ml Aufschlußlösung 4 resuspendiert. Der Aufschlußlösung 4 war zuvor Lyticase zugegeben worden (EK: 0,5 mg/ml). Die Zellsuspension wurde mit 1,25 ml geschmolzener Fixierungslösung (50°C) vermischt und in die auf Eis vorgekühlten Blöckchen-Formen pipettiert. Die Blöckchen wurden in 25 ml Aufschlußlösung 5, der Lyticase zugegeben war (EK: 0,5 mg/ml), überführt und unter gelegentlichem Schütteln inkubiert (37°C, 2 h). Die Lösung wurde durch 25 ml LIDS-Puffer ersetzt und die Blöckchen darin wieder inkubiert (37°C, 1 h). Der LIDS-Puffer wurde gewechselt und die fixierten Hefezellen im Brutschrank vollständig lysiert (37°C, 16 h). Nach erneutem Austausch des LIDS-Puffers wurden die Blöckchen bei RT in diesem Puffer gelagert.

Lösungen:

Aufschlußlösung 4: 1 M Sorbitol, 20 mM EDTA, 14 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5.

Aufschlußlösung 5: 1 M Sorbitol, 20 mM EDTA, 14 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.

Fixierungslösung: 1,5 % LGT-Agarose, 1 M Sorbitol, 20 mM EDTA, pH 7,5.

LIDS-Puffer: 1 % Lithiumdodecylsulfat, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.

2.9.2. Gelelektrophoresen

2.9.2.1. Horizontale Agarosegelelektrophorese zum Auftrennen von DNA

PCR-Produkte, Plasmide und Fragmente aus Restriktionsspaltungen wurden in einer horizontalen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Folgende Bedingungen wurden angewandt: 0,8-2,0 %ige Agarosegele, Geldicke 6-8 mm, 1 x TBE-Puffer, 2-5 Volt/cm Elektrodenabstand. Den Gelen wurde Ethidiumbromid zugesetzt (EK: 200 ng/ml). Die DNA-Detektion erfolgte unter einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 300 nm.

Genomische DNA, die mit Restriktionsendonukleasen gespalten worden war, wurde unter folgenden Bedingungen aufgetrennt: 0,8 %ige Agarosegele, Geldicke 6-8 mm, 1 x Loening-Puffer, 1-1,5 Volt/cm Elektrodenabstand. Die Detektion erfolgte mit Ethidiumbromid (s.o.).

Zur Etablierung eines Contigs aus PAC-Klonen mit Hilfe eines *Fingerprinting*-Verfahrens wurde PAC-DNA in einem Volumen von 10 μ l mit HindIII gespalten. Es wurde nach einem modifizierten Protokoll von Marra et al. vorgegangen (Marra et al. 1997). Die Spaltungsreaktion wurde mit 1,75 μ l Gelauftragspuffer versetzt und 6 μ l dieses Ansatzes unter folgenden Bedingungen aufgetrennt: Elektrophoresekammer Horizon 20•25 (Gibco BRL), Kamm Model H1/H4 Delrin Comb 30 Tooth, 1 MM (Gibco BRL), 1 %iges Agarosegel, Geldicke 3-4 mm, 1 x TAE-Puffer (8 l), Zirkulation des Puffers mittels Pumpe, Kühlung 14°C, 70 Volt, 15 h. In jede fünfte Spur wurden 2,5 μ l des Längenstandards aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Vistra Green (Amersham-Pharmacia). Das Gel wurde samt Gelschlitten in einer Wanne mit 1 x TAE-Puffer, dem Vistra Green zugesetzt war (0,15 μ l/ml 1 x TAE-Puffer), 45 min unter sanftem Schütteln gefärbt. Anschließend wurde die DNA im FluorImager SI (Molecular Dynamics) detektiert und dokumentiert.

2.9.2.2. Wechselfeldgelelektrophorese (PFGE)

Ein 1,5 %iges Agarosegel in 0,5 x TAE-Puffer wurde auf einem seitlich abgedichteten Glasteller gegossen. Die in 0,5 x TAE-Puffer equilibrierten DNA-Blöckchen wurden in die Geltaschen eingesetzt und mit 0,5 %iger LGT-Agarose (50°C) überschichtet. Als Längenstandard diente DNA der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die analog zu den DNA-Blöckchen präpariert wurde. Das PFGE-Gerät (T. Meitinger, Abt. Medizinische Genetik, Eigenbau) faßt etwa 5,5 l 0,5 x TAE-Puffer, welcher über eine angeschlossene Kühlapparatur auf 15°C vorgekühlt wurde. Anschließend wurde der Glasteller mit dem beladenen Agarosegel in dem Elektrophoresegerät plaziert und die Laufbedingungen (Spannung, Umschaltzeit und Laufzeit) entsprechend der gewünschten Auftrennung festgelegt (Tabelle 3). Zur Detektion wurde das Gel 45 min in 0,5 x TAE-Puffer, dem Ethidiumbromid (EK: 200 ng/ml) zugegeben worden war, gefärbt und unter einem UV-Transilluminator bei 300 nm dokumentiert.

Tabelle 3: Laufbedingungen der Wechselfeldgelelektrophorese (PFGE).

Auftrennung [kb]	Spannung [V]	Umschaltzeit [s]	Laufzeit [h]
100-500	140	30	30
200-1000	130	60	40
800-2000	90	240	40

2.9.2.3. Polyacrylamidgelelektrophorese zur DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden auf einem ABI PRISM™-System 377 (Applied Biosystems) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen detektiert. Die gefällte und getrocknete Sequenzreaktion wurde in 3 µl Sequenzauftragspuffer gelöst. 1,5 µl davon wurden auf das vertikale denaturierende Polyacrylamidgel (5 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, Geldicke 0,2 mm, 7 M Harnstoff, 1 x TBE-Puffer) aufgetragen. Die Laufzeit betrug bei einer Leistung von 48 Watt 9 h. Die Sequenzrohdaten wurden mit dem Programm Sequencing Analysis (Applied Biosystems) erfaßt, analysiert und als Kurvendiagramm (Elektropherogramm) ausgedruckt.

Lösungen:

Sequenzauftragspuffer: 80 % Formamid, 20 % 25 mM EDTA (pH 8,0).

2.9.2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese zur Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte auf dem ABI PRISM™-System 377 (Applied Biosystems) entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen. Die gefällten und getrockneten PCR-Produkte wurden in 2,8 µl Sequenzauftragspuffer gelöst. 1,8 µl davon wurden auf das vertikale denaturierende Polyacrylamidgel (4,5 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, Geldicke 0,2 mm, 6 M Harnstoff, 1 x TBE-Puffer) aufgetragen. Die Laufzeit betrug bei einer Spannung von 2700 Volt 3 h. Die Rohdaten wurden von dem Programm Gene Scan™ Analysis (Applied Biosystems) erfaßt und in Fragmentgrößen umgerechnet. Die Daten wurden am Computer analysiert und zur Dokumentation ausgedruckt.

2.9.3. Übertragung von DNA auf Nylonmembranen

2.9.3.1. Übertragung von DNA in Agarosegelen auf Nylonmembranen (Southern-Blot)

Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde depuriniert (0,25 M HCl, 10 min) und anschließend im Denaturierungspuffer denaturiert (2 x 20 min). Dann wurde das Agarosegel auf eine Blotwanne gelegt und die DNA über Kapillarkräfte mit 0,4 M NaOH auf eine positiv geladene Nylonmembran (Byodine B Transfer Membrane, Pall) übertragen. Die Blotzeit war abhängig von der Größe der DNA-Fragmente: PCR-Produkte 30 min, genomische Restriktionsfragmente 5 h und DNA in Wechselfeldgelen über Nacht. Nach dem Blotten wurde die Nylonmembran in Postblot-Waschpuffer (10 min) und in 2 x SSC (10 min) neutralisiert und auf einem Filterpapier getrocknet.

Lösungen:

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaOH, 0,5 M NaCl.

Postblot-Waschpuffer: 0,2 M Tris-HCl, 2 x SSC, pH 7,5.

2.9.3.2. Übertragung von E. coli Flüssigkulturen auf Nylonmembranen (Dot-Blot)

Der Vorteil von Dot-Blots liegt darin, daß sehr viele Klone ohne den Aufwand eines Southern-Blots (DNA-Präparation, Restriktionsspaltung, Agarosegel) auf eine Nylonmembran übertragen werden können. Die Bakterien werden auf der Membran mit Natronlauge lysiert und die DNA damit für Hybridisierungssonden zugänglich gemacht. Mit spezifischen Sonden ist es dann möglich, diese Filter zu hybridisieren und positive Klone zu identifizieren.

Eine mit LB (600 µl) und Kanamycin (EK: 20µg/ml) gefüllte Mikrotiterplatte wurde mit E. coli-Klonen, die mit PACs transformiert waren, angeimpft und in den Inkubationsschüttler gestellt (37°C/ 16 h). Mit einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 5 µl einer Kultur auf die Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde auf ein mit 0,5 M NaOH getränktes Filterpapier gelegt (4 min), was die Bakterienzellen lysierte und die DNA denaturierte. Zur Neutralisation wurde die Membran in 1 M Tris-HCl pH 7,2 (4 min), in Postblot-Waschpuffer (10 min) und in 2 x SSC (10 min) gewaschen. Abschließend wurde die Nylonmembran auf einem Filterpapier getrocknet.

Lösungen:

Postblot-Waschpuffer: 0,2 M Tris-HCl, 2 x SSC, pH 7,5.

2.9.4. Radioaktive Hybridisierung von Southern-Blots, Northern-Blots und Dot-Blots

2.9.4.1. Vorbereitung der Sonden

DNA-Fragmente größer als 150 bp wurden mit der Methode der Primerverlängerung (random priming) modifiziert nach Feinberg und Vogelstein (Feinberg und Vogelstein 1983) radioaktiv markiert. 20 ng DNA wurden mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 32 µl gebracht und denaturiert (95°C, 10 min). Das Reaktionsgefäß wurde sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl OLB-C, 2 µl BSA (10 mg/ml), Klenow-Fragment (1 U) und 1-3 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (0,5-1,5 MBq) wurde inkubiert (37°C, 30 min). Die Markierungsreaktion wurde durch

Zugabe von 100 µl TES-Puffer (bei Sonden, die nicht präassoziiert werden mußten) bzw. 50 µl TES-Puffer (bei Sonden, die präassoziiert werden mußten) gestoppt und die markierte Sonde mit einer Sephadex-G50-Säule von freien Nukleotiden getrennt (2000 U/min, 10 min). Sonden, die keiner Präassoziiierung bedurften, wurden anschließend denaturiert (95°C, 10 min) und bis zur Zugabe in die Hybridisierungsröhre auf Eis gestellt. Sonden mit repetitiven DNA-Sequenzen mußten präassoziiert werden. Vor der Denaturierung wurden 60 µl 20 x SSC und 100 µl Plazenta-DNA (10 mg/ml) zugegeben. Nach der Denaturierung (95°C, 10 min) wurde das Reaktionsgefäß sofort auf 65°C gestellt und bei dieser Temperatur mindestens 1 h inkubiert. Die Sonde wurde direkt von 65°C in die Hybridisierungsröhre pipettiert.

Lösungen:

OLB-C (Oligo-labeling-Puffer): Gemisch aus Lösungen A, B und C im Verhältnis 1:2,5:1,5.

Lösung 0: 1,25 M Tris-HCl, 125 mM MgCl₂, pH 8,0.

Lösung A: 1 ml Lösung 0, 18 µl β-Mercaptoethanol, je 5 µl 0,1 M dATP, dGTP, dTTP.

Lösung B: 2 M Hepes-Medium, pH 6,6.

Lösung C: Zufallsprimer (5'-pd(N)₆-Oligonukleotide, Amersham-Pharmacia) in TE-Puffer gelöst; EK: 90 A₂₆₀U/ml.

TES-Puffer: 20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,25 % SDS, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7,5.

2.9.4.2. Hybridisierungs-, Wasch- und Detektionsbedingungen

Die Nylonmembranen (Southern-Blots, Northern-Blots und Dot-Blots) wurden in 2 x SSC-Puffer (RT, 10 min) gewaschen, in eine mit 10 ml Prähyb-Mix gefüllte Hybridisierungsröhre gerollt und in einem Hybridisierungssofen unter ständigem Rotieren prähybridisiert (65°C, 2 h). Danach wurde der Prähyb-Mix gegen 10 ml Hyb-Mix getauscht, 100 µl denaturierte SS-DNA (10 mg/ml) zugegeben und die radioaktiv markierte DNA-Sonde zupipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in einem Hybridisierungssofen.

Die Waschbedingungen richteten sich nach der Hybridisierungseffizienz. Die Änderung der Signalintensität bei den verschiedenen Waschsritten wurde mit einem Geigerzähler verfolgt. Standardmäßig wurden die Nylonmembranen kurz in 2 x SSC-Puffer gespült. Es schlossen sich Waschsritte in den Waschlösungen 1-3 bei Temperaturen von 20°C-65°C an, wobei die Stringenz von Waschlösung 1 nach Waschlösung 3 zunahm. Die Dauer der Waschsritte variierte zwischen 5 min und 1 h.

Die Autoradiographie erfolgte mit Fuji RX-Filmen und CAWO SE6 Verstärkerfolien bei -70°C. Die Expositionszeit variierte von wenigen Minuten bis zu zwei Wochen.

Lösungen:

Prähyb-Mix:	1,5 x SSPE, 1 % SDS, 0,5 % Magermilchpulver.
Hyb-Mix:	1,5 x SSPE, 1 % SDS, 0,5 % Magermilchpulver, 10 % Dextransulfat.
20 x SSPE:	3,6 M NaCl, 0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 20 mM EDTA, pH 7,4.
Waschlösung 1:	2,0 x SSC, 0,1 % SDS.
Waschlösung 2:	0,5 x SSC, 0,1 % SDS.
Waschlösung 3:	0,1 x SSC, 0,1 % SDS.

2.9.5. RNA-in situ-Hybridisierung

Die RNA-in situ-Hybridisierungen wurden während eines Aufenthaltes im Labor von Prof. M. Vekemans (Hôpital Necker Enfants Malades, Paris) durchgeführt.

2.9.5.1. Vorbereitung der Hybridisierungssonde

2.9.5.1.1. Linearisierung des Plasmids

Die Sonde war in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert worden. Vor der In-vitro-Transkription mußte der Vektor linearisiert werden. Je 10 µg des Plasmids wurden mit NcoI bzw. PstI gespalten. Die beiden Reaktionen wurden mit Phenol/ Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol (2,5 Vol.) und Natriumacetat (3M, 1/10 Vol.) gefällt (-80°C, 30 min). Die Ansätze wurden zentrifugiert, die Pellets mit 70 %igem Alkohol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Pellets wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in TE aufgenommen (Endkonzentration der linearisierten Plasmide 200 ng/µl).

2.9.5.1.2. Markierung der Sonde

Die Sonde wurde durch In-vitro-Transkription mit ³⁵S-UTP in zwei Parallelreaktionen markiert. Zu je 4 µl des linearisierten Plasmids wurden 4µl Puffer, 3 µl ³⁵S-UTP (1250 Ci/mM), 1 µl NTP-Mix (10 mM), 2 µl DTT (0,1 mM), 1 µl Rnasine (36 U/µl, Promega) und 1,5 µl T7-RNA-Polymerase (Life Technologies) zugegeben. In der parallelen Markierung wurde statt T7-RNA-Polymerase 2 µl SP6-RNA-Polymerase zugegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C zwei Stunden inkubiert, wobei nach einer Stunde noch einmal 1,5 µl T7-RNA-Polymerase oder 2 µl SP6-RNA-Polymerase zugegeben wurden. Die Ansätze wurden mit je 1 µl RNase freier DNase (20 U) versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3 µl

Hefe-tRNA (10 mg/ml) zugegeben. Die Sonden sollten eine Länge von weniger als 0,1 kb besitzen, daher mußten sie hydrolysiert werden. Zu den Reaktionen wurden 50 µl der alkalischen Lösung A zugegeben. Nach der Inkubation (60°C, 30 min) wurde durch Zugabe von 50 µl Lösung B der pH-Wert neutralisiert. Es schloß sich eine Passage durch eine Sephadex G50-Säule an. Die Säule wurde mit 1 ml Equilibrierungspuffer, mit 50 µl Hefe-tRNA (10 mg/ml) und nochmals mit 0,5 ml Equilibrierungspuffer vorbehandelt. Anschließend wurde der gesamte Transkriptionsansatz auf die Säule pipettiert und mit 0,5 ml Equilibrierungspuffer eluiert. Es wurden je acht Fraktionen aufgefangen. Die radioaktive Aktivität wurde in einem Szintillationszähler für jede Fraktion bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden alkoholisch gefällt und in 20 µl DTT (0,2 M) aufgenommen. Es schloß sich erneut eine Aktivitätsprüfung im Szintillationszähler an. Die so vorbereiteten Sonden wurden bei -20°C gelagert.

Lösungen und Puffer:

Lösung A:	10 mM DTT, 80 mM NaHCO ₃ , 120 mM Na ₂ CO ₃ .
Lösung B:	200 mM Natriumacetat, 10 mM DTT, 1/100 Vol. Eisessig.
Equilibrierungspuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,1 % SDS, 10 mM DTT (kurz vor Gebrauch zugeben).

2.9.5.2. In-situ-Hybridisierung von humanen Embryoschnitten

2.9.5.2.1. Prähybridisierung der Präparate

Bei den Präparaten handelte es sich um Paraffinschnitte humaner Embryos, die auf Glasobjektträger aufgetragen waren. Der erste Vorbereitungsschritt für die Hybridisierung war das Entfernen des Paraffins. Dafür wurden die Präparate in Xylen gewaschen (3 x 10 min), in Ethanol (100 %, 3 min) überführt und durch eine absteigende Alkoholreihe geführt (Ethanol 100 %, 95 %, 85 %, 70 %, 50 %, 30 %, je 3 min). Zur Fixierung wurden die Präparate durch folgende vier Lösungen geleitet: NaCl (0,85 %, 5 min), 1 x PBS (5 min), Perfluoressigsäure (4 %, 20 min, 0°C) und 1 x PBS (2 X 5 min). Es schloß sich eine Proteinase K-Behandlung an. Die Präparate wurden 8 min in Puffer PK inkubiert, mit 1 x PBS gewaschen (5 min), wiederum mit Perfluoressigsäure (4 %, 5 min, 0°C) behandelt und sofort in Wasser überführt. Anschließend wurde acetyliert (200 ml Wasser + 2,8 ml Triethanolamin + 0,5 ml Acetanhydrid, 10 min) und mit 1 x PBS und NaCl (0,85 %) je 5 min gewaschen. Die

Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert (EtOH 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % je 3 min, 100 % 8 min) und an der Luft getrocknet.

Puffer:

Puffer PK: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM EDTA (pH 8,0), 20 µg/ml Proteinase K.

2.9.5.2.2. Hybridisierung der Präparate

Pro Präparat wurden 15 µl der Sonde benötigt, wobei eine Gesamtaktivität von 750000 cpm erreicht werden sollte. Die berechnete Menge an Sonde wurde mit dem Hybridisierungspuffer auf ein Endvolumen von 15 µl eingestellt. Der Ansatz wurde 2 min bei 80°C denaturiert, gut gemischt und auf den Embryoschnitt pipettiert. Mit einem Deckgläschen (22 mm x 22 mm) wurde das Präparat abgedeckt und in einer mit Formamid gesättigten feuchten Kammer über Nacht bei 50°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate in Lösung 1 (50°C, 30 min), in Lösung 2 (65°C, 20 min) und zwei mal in der 1 x Waschlösung gewaschen (37°C, 30 min). Es schloß sich ein RNase A-Verdau an (RNase A-Endkonzentration: 20 µg/ml in 1 x Waschlösung, 37°C, 30 min), um die nicht gebundene Sonde zu entfernen. Dann wurden die Präparate in 1 x Waschlösung (37°C, 5 min), 2 x SSC (37°C, 15 min) und 0,1 x SSC (37°C, 15 min) gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert (EtOH 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % je 3 min, 100 % 8 min) und an der Luft getrocknet.

Puffer:

Hybridisierungspuffer: 50 % Formamid, 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM EDTA, 10 % Dextransulfat, 1 % Dehnhardt, 10 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,5 mg/ml Hefe-tRNA.

Lösung 1: 5 x SSC, 10 mM DTT.

Lösung 2: 2 x SSC, 10 mM DTT, 50 % Formamid.

10 x Waschlösung: 4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM EDTA.

2.9.5.2.3. Auswertung der Hybridisierung

Die Präparate wurden in eine Filmkassette gelegt und mit Klebeband fixiert. Dann wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. Nach einer Exposition von drei Tagen wurde der Film entwickelt. Aus der Intensität der Signale auf dem Film konnte die Expositionsdauer der Präparate mit einer photosensitiven Emulsion abgeschätzt werden. In einer Dunkelkammer wurde die photosensitive Emulsion Kodak NTB-2 auf 45°C erwärmt und die Präparate anschließend in die Emulsion getaucht. Die Präparate wurden 3 h getrocknet und dann bei 4°C im Dunkeln 2-

4 Wochen gelagert. Nach dieser Zeit schloß sich die Entwicklung der photosensitiven Emulsion an. Zum Schluß wurden die Präparate mit Toluidinblau gegengefärbt, dehydratisiert und mit Eukitt eingeschlossen. Die Auswertung der Hybridisierungen erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Für die Dokumentation wurden mit einer CCD-Kamera Fotos aufgenommen.

2.9.6. Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

2.9.6.1. Standard-PCR

Die DNA-Amplifikation mit Hilfe der PCR erfolgte meist nach der Standardmethode von Saiki (Saiki et al. 1988). Für die Mehrheit der Reaktionen galten folgende Bedingungen: 1 x PCR-Puffer, 0,2 M dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Oligonukleotid-Primer-EK: 0,4 µM, Taq-Polymerase-EK: 0,005 U/µl, DNA-EK: 2–4 ng/µl. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl oder 50 µl, und die Reaktion fand in 0,5 ml Reaktionsgefäßen statt. Das PCR-Programm umfaßte in der Regel 35 identische Zyklen, wobei die wichtigen PCR-Variablen (Primer-Anlagerungstemperatur, Primer-Anlagerungszeit, DNA-Synthesezeit) für jedes Primer-Paar optimiert wurden. Sollten die PCR-Produkte sequenziert oder kloniert werden, wurden sie mit dem QIAquick Spin PCR Purification Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt.

2.9.6.2. PCR-Analyse polymorpher Mikrosatelliten

Die Mikrosatellitenanalyse erfolgte am ABI PRISM™-System 377 (Applied Biosystems). Der Standard-PCR wurden 0,3 µl eines fluoreszenzmarkierten Desoxynukleotids (Genescan-500-TAMRA, -R6G, -R110, Applied Biosystems) zugegeben, die PCR-Amplifikate ethanolisch gefällt und in 10 µl Aqua bidest. gelöst. 0,1 – 1,0 µl davon wurden zusammen mit 0,3 µl eines Längenstandards (Genescan-500 size standard, Applied Biosystems) in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und in 2,8 µl Sequenzauftragspuffer gelöst.

2.9.6.3. Inter-Alu-PCR

Die Inter-Alu-PCR wurde durchgeführt, um aus Hefe-DNA-Präparationen spezifisch die in der YAC-DNA klonierten humanen DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Diese PCR-Amplifikate wurden bei FISH-Analysen als Sonden eingesetzt.

Die Inter-Alu-PCR wurde analog zur oben dargestellten Standard-PCR durchgeführt, jedoch in einem doppelt so großen Ansatz mit einem Volumen von 100 µl. Folgende vier Oligonukleotid-Primer wurden benutzt:

CL1 (Lengauer et al. 1994):	5'-TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3'
CL2 (Lengauer et al. 1994):	5'-CTG CAC TCC AGC CTG GG-3'
PDJ34 (Breukel et al. 1990):	5'-TGA GCT ATG ATT ATA CCT CTG CAC TCC AGC CTG GG-3'
Sal1 (Kwiatkowski et al. 1993):	5'-AAG AGT GAG CCA CCG CAC CCA GCC-3'.

Die Primer wurden einzeln (CL1, CL2, Sal1, PDJ34) oder als Kombination (CL1+CL2, Sal1+PDJ34) in der Inter-Alu-PCR eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit folgendem PCR-Programm: Anfangsdenaturierung 94°C/5 min; 35 Zyklen 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/10 min; Auffüllreaktion 72°C/10 min. Die sechs PCR-Ansätze wurden vereinigt, die DNA ethanolisch gefällt und in 100 µl Aqua bidest. gelöst. Nach einer Konzentrationsbestimmung (1/10 Volumen wurde auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen) wurde 1 µg DNA mit Nicktranslation fluoreszenzmarkiert.

2.9.6.4. Alu-Vektor-PCR

Die Alu-Vektor-PCR kam bei der Klonierung von PAC-Randfragmenten zum Einsatz. In einer Standard-PCR mit PAC-DNA als DNA-Matrize wurden folgende Primerpaare eingesetzt: CL1+T7, CL1+SP6, CL2+T7 und CL2+SP6, wobei CL1 und CL2 Alu-Primer und T7 und SP6 PAC-Vektorprimer sind. Die Amplifikation erfolgte mit nachfolgendem Programm: Anfangsdenaturierung 94°C/5 min; 35 Zyklen 94°C/1 min, 50°C/1 min, 72°C/4 min; Auffüllreaktion 72°C/5min. Unter diesen Bedingungen wurden sowohl Inter-Alu-PCR-Amplifikate erhalten, als auch Alu-Vektor-Amplifikate. Ein Vergleich des Agarosegel-Bandenmusters der Alu-Vektor-PCR mit der entsprechenden Inter-Alu-PCR (PCR nur mit CL1 bzw. CL2 als Primer) ermöglichte es, die für die Alu-Vektor-PCR spezifischen Banden zu identifizieren. Bei diesen Banden handelte es sich um potentielle PAC-Randfragmente, die aus dem Gel präparativ isoliert und direkt sequenziert, bzw. isoliert, in den pGEM-T-Vektor (Promega) kloniert und sequenziert wurden.

2.9.6.5. DOP-Vektor-PCR

Als Alternative zu der Alu-Vektor-PCR kam bei der Klonierung von PAC-Randfragmenten die DOP-Vektor-PCR zum Einsatz. Ihr Vorteil liegt darin, daß man auch dann Randfragmente erhält, wenn die klonierte humane DNA keine Alu-Sequenzen nahe der PAC-Vektor-Klonierungsstelle besitzt. Es wurde nach dem modifizierten Protokoll von Wu et al. (Wu et al. 1996) vorgegangen. Die so erhaltenen PCR-Fragmente wurden präparativ aus einem Agarosegel isoliert, in den pGEM-T-Vektor (Promega) kloniert und sequenziert. Meist schloß

sich eine weitere PCR mit den Primerkombinationen DOP-Primer + T7 bzw. DOP-Primer + SP6 und dem isolierten Fragment als DNA-Matrize an, um die Vektorsequenzen im Fragment zu minimieren (die Primer bei Wu et al. waren so gelegt, daß noch 70 nt bzw. 80 nt Vektorsequenz im Amplifikat verblieben, was eine Hybridisierung auf PAC-Filter unmöglich machte). Das damit erhaltene PCR-Amplifikat enthielt nur wenige Nukleotide des PAC-Vektors, so daß es direkt zur Hybridisierung einer PAC-Bibliothek eingesetzt werden konnte.

2.9.6.6. Amplifizierung der 5'-Bereiche von Genen: 5'-RACE-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurden cDNA-Klone (ESTs) kartiert, deren Position in Datenbanken bereits grob angegeben waren. Da die kartierten EST-Klone ausschließlich aus cDNA-Bibliotheken stammten, die mit Hilfe von poly-T-Primern konstruiert wurden, fehlten ihnen die 5'-Bereiche. Deren Klonierung sollte durch 5'-RACE-PCR erfolgen. Es wurden folgende Marathon ReadyTM cDNA-Bibliotheken (CLONTECH) eingesetzt: Human Brain (Cat.# 7400-1), Human Fetal Brain (Cat.# 7402-1), Human Fetus (Cat.# 7438-1), Human Heart (Cat.# 7404-1) und Human Retina (Cat.# 7449-1). Die PCR-Reaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei als Polymerase der Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTEC) zum Einsatz kam. Es wurde grundsätzlich eine verschachtelte (nested) PCR durchgeführt. PCR-Amplifikate wurden aus einem Agarosegel präparativ isoliert, in den pGEM-T-Vektor (Promega) kloniert und sequenziert.

2.9.6.7. Amplifizierung großer DNA-Stücke

DNA-Stücke größer als 3 kb wurden mit Hilfe des GeneAmp®XL PCR Kits (Applied Biosystems) amplifiziert. Die Reaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei kam folgendes PCR-Programm zur Anwendung: Anfangsdenaturierung 94°C/1 min; 25 Zyklen 94°C/30 s, 68°C/7 min; Auffüllreaktion 72°C/15 min.

2.9.7. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977) unter Verwendung des Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems). Die Sequenzen wurden auf dem ABI PRISMTM-System 377 (Applied Biosystems) analysiert.

2.9.7.1. Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Amplifikaten

Etwa 2 µg Plasmid-DNA oder 100 ng sauberes PCR-Produkt wurden pro Sequenzreaktion eingesetzt. Zusätzlich wurden 2 µl Premix und 20 pmol Primer pro Reaktion benötigt. Der

Ansatz wurde mit Aqua bidest. auf 10 µl Gesamtvolumen gebracht und in die PCR-Maschine gestellt. Das PCR-Programm umfaßte folgende 25 identischen Zyklen: 96°C/30 s; 50°C/15 s; 60°C/4 min. Die Sequenzreaktion wurde anschließend ethanolisch bei RT gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in einem Vakuumkonzentrator getrocknet.

2.9.7.1.1. Sequenzierung von PAC-Klonen

Die Sequenzierung von PAC-Klonen verlief analog zur Sequenzierung von Plasmiden, wobei 3-5 µg DNA eingesetzt wurden. Als Primer dienten die PAC-Vektorprimer T7 und SP6.

2.9.8. Weitere molekulargenetische Methoden

2.9.8.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

2.9.8.1.1. Restriktionsspaltung von DNA in Lösung

1-5 µg DNA (genomische DNA, PAC-DNA, Plasmide, PCR-Produkte) wurden mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease (1-5 U) und dem dazugehörigen Puffer versetzt und bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert (1-16 h). Doppelspaltungen mit unterschiedlichen Enzympuffern wurden schrittweise durchgeführt. Das Enzym mit geringerem Salzbedarf wurde zuerst eingesetzt. Die Bedingungen für das Enzym mit höherem Salzbedarf wurden nach erfolgtem ersten Verdau durch Zugabe der entsprechenden Menge an NaCl optimiert.

2.9.8.1.2. Restriktionsspaltung von DNA-Blöckchen

Vor der Restriktionsspaltung wurden die Blöckchen in TE gewaschen (fünfmaliger Wechsel des TE, über 24 h verteilt), um Reste des Lagerpuffers NDS bzw. LIDS zu entfernen. Die Blöckchen wurden in 1 x Enzympuffer equilibriert (30 min, 0°C), der Puffer abgenommen und gegen 150 µl Inkubationspuffer getauscht. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT wurden 20 U des Restriktionsenzym zugegeben und der Ansatz bei der optimalen Temperatur 2 h inkubiert. Danach folgte eine weitere Zugabe von 20 U des Restriktionsenzym. Die Gesamtreaktionszeit betrug 4 h. Die Blöckchen wurden vor dem Einsetzen in das Wechselfeldgel 15 min in 0,5 x TAE-Puffer equilibriert.

Puffer:

Inkubationspuffer: 700 µl Aqua bidest., 100 µl Gelatine (1 mg/ml), 100 µl Spermidin (30 mM), 100 µl 10 x Enzympuffer, 1 µl DTT (1 M).

2.9.8.2. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

2.9.8.2.1. Isolierung von PCR-Banden und Restriktionsfragmenten

Einzelne PCR-Banden oder Restriktionsfragmente wurden über einem UV-Transilluminator mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN) aus dem Agarosegel extrahiert und mit 30 µl Elutionspuffer (QIAGEN) von der Säule eluiert.

2.9.8.2.2. Isolierung von YAC-Klonen aus Wechselfeldgelen

Die Bande eines YAC-Klons wurde über einem UV-Transilluminator aus dem Wechselfeldgel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in mehrere kleinere Stücke zerteilt und in eine Kammer der Elektroelutionsapparatur (T. Meitinger, Abt. Medizinische Genetik, Eigenbau) gegeben. Die Kammern waren mit Dialyseschläuchen abgedichtet. Die Apparatur wurde mit 0,5 x TBE gefüllt und die DNA durch Anlegen eines elektrischen Feldes in die zweite Kammer elektroeluiert (25 V, 16 h). Die elektroeluierte DNA wurde mit einer Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, ethanolisch gefällt und in 20 µl TE wieder aufgenommen.

2.9.8.3. Klonierung von PCR-Produkten

Vor der Klonierung wurden die PCR-Produkte entweder mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) von überschüssigen Primern und Nukleotiden befreit, oder aber es wurden PCR-Banden aus einem Agarosegel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN) isoliert. Die so erhaltenen Produkte wurden nach dem Protokoll des Herstellers in den pGEM-T-Vektor (Promega) ligiert.

2.9.8.4. Transformation kompetenter Bakterien

100 µl kompetenter Bakterien (XL-1 Blue, bei -70°C gelagert) wurden 5 min auf Eis aufgetaut. Dann wurde der gesamte Ligierungsansatz (pGEM-T-Vektorsystem, Promega) zupipettiert und das Gemisch 20 min auf Eis gestellt. Es folgte der Hitzeschock (42°C, 45 s), eine Inkubation auf Eis (2 min) und anschließend die Zugabe von 950 µl SOC-Mediums. Die Bakterien wurden in den Inkubationsschüttler gestellt (37°C, 90 min), abzentrifugiert (4000 U/min, 10 min), das Medium abgenommen und in 100 µl frischem SOC-Medium

resuspendiert. Das gesamte Volumen wurde auf eine LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Lösungen:

LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agarplatte: 25 ml LB-Agar, 50 µl Ampicillin (50 mg/ml), 25 µl X-Gal (40 mg/ml), 1,0 µl IPTG (1 M).

2.9.8.5. Herstellung kompetenter Bakterien

Die Bakterienzellen (XL-1 Blue) wurden in 2 ml TYM-Medium, dem MgCl₂ zugesetzt war (EK: 10 mM), über Nacht bei 37°C angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien so 1 : 200 verdünnt, daß ein Gesamtvolumen von 100 ml resultierte. Die Kultur wurde in den Inkubationsschüttler gestellt und so lange geschüttelt, bis eine OD₅₅₀ von 0,9 erreicht war (etwa 3 h). Das Wachstum wurde gestoppt (0°C, 10 min) und die Bakterien zentrifugiert (3000 U/min, 10 min, 4°C). Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, wobei sowohl die Lösungen als auch die Zentrifuge vorgekühlt wurden. Das Bakteriensediment wurde in 15 ml Tfb-I-Lösung resuspendiert, zentrifugiert (3000 U/min, 10 min, 4°C) und in 4 ml Tfb-II-Lösung aufgenommen. Die kompetenten Bakterienzellen wurden in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 100 µl aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

Lösungen:

Tfb-I-Lösung: 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin.

Tfb-II-Lösung: 10 mM Na-MOPS (pH 7,0), 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % Glycerin.

3. Ergebnisse

3.1. Deletionskartierungen bei Monosomie 10p-Patienten

Insgesamt wurden 16 Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p und ein Patient mit einer balancierten Translokation $t(10p;14q)$ untersucht (s. Tabelle 2, Kapitel 2.1.). Die Deletionskartierung wurde mit Hilfe polymorpher Marker und FISH durchgeführt. Als Sonden dienten YAC-, PAC- und BAC-Klone, die aus verschiedenen genomischen Bibliotheken identifiziert bzw. aus veröffentlichten Karten ausgewählt wurden.

3.1.1. Isolierung und Charakterisierung von Chromosom 10-YAC-Klonen

YAC-Klone wurden über PCR aus der CEPH-Mega-YAC-Bibliothek (Research Genetics) oder über Hybridisierung aus der ICRFy900-YAC-Bibliothek (Zehetner und Lehrach 1994) isoliert. Für die PCRs wurden aus der genetischen CEPH-Karte (Cohen et al. 1993) sechs Marker aus der chromosomalen Region 10p12-10pter ausgewählt. Mit fünf Markern wurden 12 CEPH-MEGA-YAC-Klone identifiziert, mit einem Marker wurde kein Klon gefunden. Zur Isolierung eines 10p terminalen Klons wurde das Gen der Theta-Untereinheit der Proteinkinase C (PKC θ), welches auf Chromosom 10p15 kartiert worden war (Erdel et al. 1995), als Sonde zum Durchsuchen der ICRFy900-YAC-Bibliothek verwendet. Ein YAC-Klon wurde isoliert. Von allen YAC-Klonen wurde DNA präpariert und mittels PCR das Vorhandensein der Marker auf den Klonen kontrolliert.

Die Identifizierung von weiteren YAC-Klonen wurde durch die Veröffentlichung genomischer Karten wesentlich vereinfacht (Chumakov et al. 1995; Dib et al. 1996), da die Klone direkt aus den Karten übernommen werden konnten. Aus diesen Karten wurden weitere 23 10p-YAC-Klone ausgewählt. Als Kontrollsonden zur Identifizierung der Chromosomen 10 in FISH-Experimenten dienten zwei YAC-Klone vom langen Arm des Chromosoms 10 (937A6, 821D2).

Vor der Deletionskartierung wurden alle 38 YAC-Klone in einem FISH-Experiment auf normale männliche Metaphasechromosomenpräparationen hybridisiert. 18 (50 %) der Klone zeigten ein spezifisches Signal auf 10p. Drei Klone (8 %) zeigten kein Signal auf 10p und bei 15 Klonen (42 %) wurden neben den Signalen auf 10p noch zusätzliche Kreuzhybridisierungssignale auf anderen Chromosomen beobachtet. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden 20 YAC-Klone für die Deletionskartierung bei Monosomie 10p-Patienten ausgewählt (Tabelle 4).

Tabelle 4: YAC-Klone von Chromosom 10p.

YAC-Klon	Marker	Genetische Lokalisation (cM)	Selektionsmethode	FISH-Signale
959H8	D10S594	2	Karte	10p, 7p13/14
ICRFy900G0588	PKCθ	k.D.	Hybridisierung	10p, 15qter
809F9	D10S591	12	Karte	10p, 8q
876F3	D10S189	17	PCR	10p
877B11	D10S189	17	PCR	9, <u>15</u> , 20
908C1	D10S189	17	PCR	10p, 8p11/12
627A4	D10S226	26	Karte	10p
918H11	D10S547	28	Karte	10p
747H7	D10S547	28	Karte	10p
747H8	D10S547	28	Karte	10p, 14q31/32
773C3	D10S585	29	PCR	10p
765A4	D10S585	29	PCR	10p, 5
916D6	WI-8819	k.D.	Karte	10p, 2pter, 13, 21
749D7	D10S1705	32	Karte	10p, 15p, <u>20p</u> , 22p
815C2	D10S570	32	PCR	10p, 5qter
808A2	D10S223	32	Karte	10p
635F1	D10S223	32	Karte	10p
950B12	D10S223	32	Karte	10p
855D10	D10S191	36	Karte	10p
780F11	D10S191	36	PCR	10p
958G9	D10S191	36	PCR	10p, <u>12</u>
902H2	D10S191	36	PCR	10p, 1, 3
959G10	D10S191	36	Karte	10p
958C9	D10S191	36	Karte	10p
927H1	D10S1653	39	Karte	4, 12q
817E11	D10S548	43	Karte	10p
696F5	D10S203	45	Karte	10p, 2pter
764G1	D10S203	45	Karte	10p
807B3	D10S563	47	Karte	10p
934E11	D10S563	47	Karte	10p
805E6	D10S1747	47	Karte	10p
761H2	D10S197	51	PCR	10p, 5q, 6p, 13q
769B9	D10S197	51	PCR	10p
875B4	D10S197	51	PCR	6p22-24, 15q14/21
716A9	WI-8545	k.D.	Karte	10p, <u>4q</u>
748E1	WI-8819	k.D.	Karte	10p, 6q, 7q, 16p, 22p
937A6	D10S209	151	Karte	10q
821D2	D10S541	114	Karte	10q

YAC-Klone, mit denen 10p-Aberrationspatienten charakterisiert wurden, sind fett dargestellt. Die YAC-Klone sind entsprechend ihrer Lokalisation vom Telomer (oben) zum Zentromer (unten) angeordnet. Für jeden YAC-Klon ist nur ein korrespondierender Marker angegeben. Die Daten für die Marker und die genetischen Lokalisationen sind der Whitehead-Karte entnommen (Dib et al. 1996). Das FISH-Hybridisierungssignal auf 10p ist immer als erstes angegeben. Ist bei mehreren Hybridisierungssignalen pro YAC-Klon eines besonders stark, ist es unterstrichen (Hauptsignal). Die YAC-Klone 937A6 und 821D2 kartieren auf 10q (Kontrollsonden). k.D. - keine Daten.

3.1.2. Isolierung und Charakterisierung von Chromosom 10-PAC- und BAC-Klonen

Im Rahmen der Etablierung von PAC-Contigs über die definierten Haploinsuffizienzregionen wurden aus den RPCII,3-5-PAC-Bibliotheken (Ioannou und de Jong 1996) mittels PCR und

Hybridisierung etwa 300 PAC-Klone isoliert und charakterisiert (s. 3.2.). 31 PAC-Klone dienten als FISH-Sonden zur Deletionskartierung (Abb. 3). Zusätzlich wurden für eine Bruchpunktkartierung aus der Contig-Karte des Sanger Centre (<http://www.sanger.ac.uk>) fünf BAC-Klone ausgewählt (Tabelle 5).

Table 5: PAC/BAC-Klone für Deletionskartierungen.

PAC-Klone	PL02, PL04, PL13, PL14, PL16, PL23, PL24, PL29, PL31, PL36, PL48, PL49, PL52, PL61, PL64, PL69, PL81, PL100, PL113, PL121, PL135, PL143, PL178, PL196, PL200, PL232, PL239, PL242, PL264, PL271, PL276
BAC-Klone	bA120C13, bA48A13, bA138I18, bA401F24, bA348G8

Bei den Namen der PAC-Klone handelt es sich um Laborbezeichnungen, die korrekten Namen der Klone können der PAC-Konversionstabelle im Anhang IV entnommen werden. Die BAC-Klone entsprechen der Nomenklatur des Sanger Centre.

3.1.3. Charakterisierung von 10p-Deletionen mit YAC-Klonen, PAC/BAC-Klonen und polymorphen Markern

In der Literatur sind etwa 50 Patienten mit partieller Monosomie 10p beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei 16 solcher Patienten eine Deletionskartierung durchgeführt. Bei allen Patienten wurde eine Mikrodeletion 22q11 durch FISH mit dem Cosmid N25 (Oncor) ausgeschlossen. Alle Deletionen waren lichtmikroskopisch sichtbar und hatten somit eine Größe von mehreren Megabasen. Zehn der 16 Monosomie 10p-Patienten hatten eine terminale Deletion (LEM, GM6936, BIH, MAJ, HOV, ROB, KAN, TAT, WON, WAB), vier eine interstitielle Deletion (MAR, MEG, AMS, GM3470). Zwei Patienten hatten eine unbalancierte Translokation (PEN, PEQ). Außerdem wurde ein Patient mit einer reziproken Translokation $t(10p;14q)$ in die Untersuchung mit einbezogen (GM10207). Zur Feinkartierung der Deletionen wurden einige Patienten auch mit PCR über Haplotypenanalysen charakterisiert. Bei sechs Patienten stand DNA der Eltern zur Verfügung (MAR, AMS, LEM, MAJ, HOV, WAB). Bei zwei Patienten war nur DNA der Mutter vorhanden (ROB, KAN). Bei allen anderen 10p-Aberrationspatienten stand keine Eltern-DNA zur Verfügung. Aus dieser Gruppe wurden dennoch vier Patienten mit polymorphen Markern untersucht (MEG, GM6936, TAT, PEN), wobei bei Anwesenheit von zwei Allelen in dem betreffenden Patienten eine Deletion des Markers ausgeschlossen werden konnte. War ein Marker in diesen vier Patienten homozygot, konnte keine Aussage bezüglich einer Deletion gemacht werden.

parentaler Ursprung der Deletionen:

Der parentale Ursprung der Deletion konnte bei sechs Patienten bestimmt werden. Vier Patienten zeigten eine de novo Deletion des väterlichen Chromosoms (MAR, LEM, HOV,

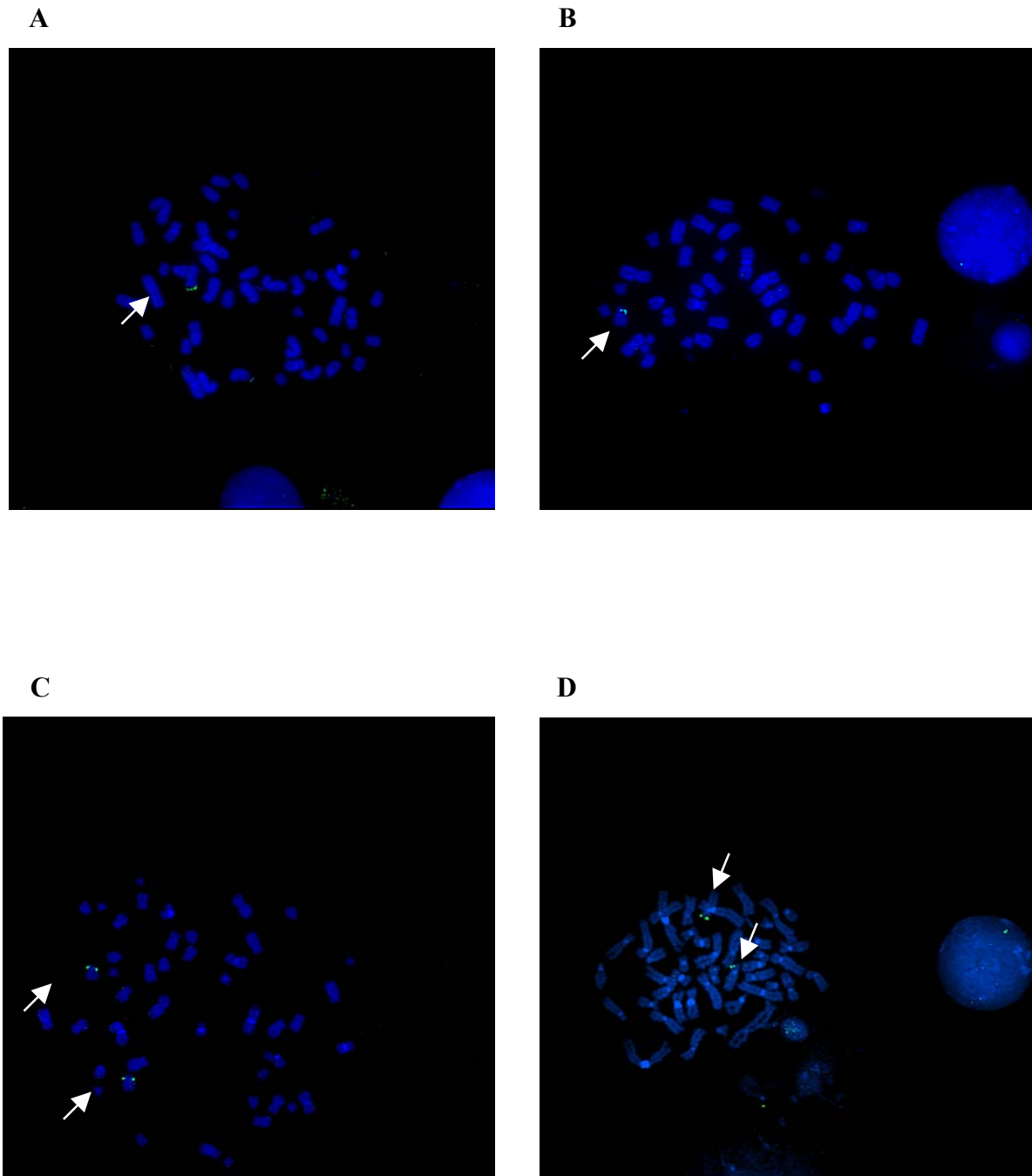


Abbildung 3: Deletionskartierung durch FISH mit PAC- und YAC-Sonden.

Es sind beispielhaft für die Deletionskartierung mittels FISH vier Hybridisierungen gezeigt. Die Metaphasechromosomen sind mit DAPI gegengefärbt. Die Hybridisierungssonden sind mit FITC markiert und die Signale als grüne Punkte auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 sichtbar.

A: Patient = TAT, Sonde = PAC PL04, Ergebnis = nur ein Signal auf dem normalen Chromosom, kein Signal auf dem deletierten Chromosom 10p, d.h. TAT ist hemizygot für diesen PAC-Klon.

B: Patient = KAN, Sonde = PAC PL14, Ergebnis = nur ein Signal auf dem normalen Chromosom, kein Signal auf dem deletierten Chromosom 10p, d.h. KAN ist hemizygot für diesen PAC-Klon.

C: Patient GM6936, Sonde = YAC 780F11, Ergebnis = Signale auf beiden Chromosomen 10p, d.h. GM6936 ist dizygot für diesen YAC-Klon.

D: Patient = WAB, Sonde = PAC PL16, Ergebnis = Signale auf beiden Chromosomen 10p, d.h. WAB ist dizygot für diesen PAC-Klon.

WAB), zwei eine de novo Deletion des mütterlichen Chromosoms (AMS, MAJ). Bei den beiden Patienten ROB und KAN stand nur mütterliche DNA für die Untersuchung zur Verfügung. Es wurden 13 (ROB) bzw. 14 (KAN) Marker getestet. Die beiden Patienten zeigten bei allen Markern ein Allel, welches auch bei der Mutter vorhanden war.

Deletionskartierung – terminale Deletionen:

Die Ergebnisse der 90 FISH-Experimente mit 20 YAC-Sonden bei 15 Patienten und die Ergebnisse der 110 PCR-Analysen mit 18 polymorphen Markern bei 12 Patienten sind tabellarisch zusammengefaßt (Tabellen. 6 und 7). Die Größe der Deletionen lag zwischen 10 und 48 cM. Die größten terminalen Deletionen wurden in den Patienten ROB, KAN und TAT gefunden. Ihre Bruchpunkte kartieren in einem 2 cM großen Intervall zwischen den Markern D10S548 (deletiert) und D10S563 (nicht deletiert), was einer Deletionsgröße von mindestens 48 cM entspricht. Die zweitgrößte Deletion wurde in Patient HOV gefunden (39 cM). Die Mikrosatellitenanalyse zeigte, daß der Marker D10S191 nicht deletiert ist. Die FISH-Daten mit YAC-Klon 855D10, der für den Marker D10S191 positiv ist, zeigten jedoch kein Hybridisierungssignal auf dem del(10)-Chromosom. Dies deutet darauf hin, daß der Bruchpunkt von HOV in unmittelbarer Nähe distal des Markers D10S191 kartiert. Die Bruchpunkte der terminalen Deletionen in den vier Patienten LEM, BIH, MAJ und GM6936 wurden innerhalb eines 4 cM-Intervalls zwischen den Markern D10S585 (deletiert) und D10S223 (nicht deletiert) kartiert, sind jedoch nicht identisch. LEM hat den distalsten Bruchpunkt mit einer mindestens 31 cM großen Deletion. Der Bruchpunkt in Patient WAB wurde mittels PCR in das 6 cM-Intervall zwischen die Marker D10S1720 (deletiert) und D10S223 (nicht deletiert) kartiert. Die Deletionskartierung von Patient WON wurde ausschließlich mit PAC-Klonen in FISH-Experimenten durchgeführt (s. 3.1.4.) und der Bruchpunkt in die Nähe des Markers D10S547 lokalisiert, was einer Deletionsgröße von etwa 28 cM entspricht.

Deletionskartierung – interstitielle Deletionen:

Die interstitiellen Deletionen sind in Abbildung 4 so geordnet, daß die distaleren Deletionsintervalle über den proximaleren angeordnet sind. Patient MAR zeigt die distalste und größte interstitielle Deletion. Der distale Bruchpunkt kartiert in dem 4 cM-Intervall zwischen den Markern D10S552 (nicht deletiert) und D10S189 (deletiert), und der proximale Bruchpunkt kartiert in dem 1 cM-Intervall zwischen den Markern D10S595 (deletiert) und D10S211 (nicht deletiert). Daraus folgt eine Deletionsgröße von 31-36 cM. Die interstitielle Deletion in Patient MEG hat wenigstens eine Größe von 17 cM und enthält die Marker D10S585 (distal) und D10S203 (proximal). Der distale Bruchpunkt in Patient AMS kartiert

zwischen den Markern D10S1720 (nicht deletiert) und D10S585 (deletiert), der proximale Bruchpunkt kartiert zwischen den Markern D10S191 (deletiert) und D10S595 (nicht deletiert). Dies ergibt eine Deletionsgröße von 8-19 cM. Die proximalste Deletion wurde in Patient GM3470 gefunden. Der distale Bruchpunkt liegt zwischen den Markern D10S1705 (nicht deletiert) und D10S570 (deletiert). Der proximale Bruchpunkt kartiert innerhalb des YAC-Klons 805E6 (D10S1747), der auf dem del(10p)-Chromosom ein schwächeres Signal zeigte als auf dem nicht deletierten Chromosom 10. Damit umfaßt die Deletion eine Größe von etwa 15 cM.

Deletionskartierung – Translokationen:

Die unbalancierte Translokation des Patienten PEN führte zu einer partiellen terminalen 10p-Deletion mit einer Größe von mindestens 18 cM. Der Bruchpunkt wurde zwischen den Markern D10S189 (deletiert) und D10S226 (nicht deletiert) kartiert. Patient PEQ hat ebenso wie PEN aufgrund einer unbalancierten Translokation eine terminale 10p-Deletion. Das Bruchpunktintervall liegt distal vom YAC-Klon 809F9. Die Deletion in Patient PEQ ist demnach kleiner als 13 cM.

Der 10p-Bruchpunkt der reziproken Translokation (10p;14q) im Patienten GM10207 kartiert innerhalb eines 4 cM großen Intervalls, das durch die Marker D10S552 (der(14)) und D10S189 (der(10)) begrenzt wird (Abb. 4).

Tabelle 6: Charakterisierung von Patienten mit 10p-Aberrationen durch FISH.

Pos.	YAC	MAR	MEG	AMS	3470	LEM	6936	BIH	MAJ	HOV	ROB	KAN	TAT	10207	PEN	PEQ
12	809F9	+		+								-		der(14)	-	+
17	876F3	-	+	+			-	-						der(10)	-	+
26	627A4				+			-					-	der(10)	+	+
28	918H11		+		+	-		-			-	-	-	der(10)	+	
28	747H7		+			+					-					
29	773C3		-		+	-	-	-			-	-	-			
k.D.	916D6		-				-			-		-				
32	815C2				-											
32	808A2		-		-		+	+	+		-	-	-		+	
32	950B12							+	+	-						
32	635F1						-		-							
36	855D10								+	-						
36	780F11		-		-		+				-		-		+	
43	817E11	-			-						-		-			
45	696F5		-				+					-	-			
45	764G1	-			-								+			
47	807B3	+										+	+			
47	934E11		+		-		+				+					
47	805E6				+/-										+	
51	875B4				+		+						+	der(10)		

+ = Signale auf beiden Chromosomen 10, - = Signal nur auf dem nicht-deletierten Chromosom 10, +/- = YAC überdeckt den Bruchpunkt. 3470 - Zelllinie GM3470, 6936 - Zelllinie GM6936, 10207 - Zelllinie GM10207. Pos. - Position in cM (entnommen der Whitehead-Karte (Dib et al. 1996)), k.D. - keine Daten.

Tabelle 7: Charakterisierung von Patienten mit 10p-Aberrationen mit polymorphen Markern.

Pos.	Marker	MAR	AMS	LEM	MAJ	HOV	ROB	KAN	MEG	GM3470	GM6936	BIH	PEN
17	D10S189	n.i.		pat.del.	mat.del.	pat.del.	1 Allel	1 Allel					1 Allel
26	D10S226	pat.del.	n.i.	n.i.	mat.del.		1 Allel	1 Allel					
k.D.	GATA-P19252		n.del.	pat.del.		pat.del.	1 Allel	1 Allel	2 Allele				
k.D.	GATA-P34271		n.del.	n.i.		pat.del.	1 Allel	1 Allel	1 Allel				
k.D.	AFM154yb4		n.i.	n.i.		pat.del.	1 Allel	1 Allel	1 Allel				
26	D10S1720		n.del.	n.i.		pat.del.	1 Allel	1 Allel	2 Allele				
28	D10S547		n.i.					1 Allel	1 Allel				
29	D10S585	n.i.	mat.del.	n.i.	n.i.	pat.del.	1 Allel		1 Allel		1 Allel	1 Allel	
k.D.	D10S1216		mat.del.	n.i.		pat.del.						1 Allel	
k.D.	GATA-P19251		mat.del.	n.del.		pat.del.	1 Allel	1 Allel			1 Allel	1 Allel	
32	D10S1705		mat.del.	n.del.	mat.del.	pat.del.	1 Allel	1 Allel		2 Allele	1 Allel	2 Allele	
32	D10S570	n.i.		n.i.	mat.del.	pat.del.	1 Allel	1 Allel			1 Allel	1 Allel	
32	D10S223		n.i.		n.i.						1 Allel	2 Allele	
36	D10S191	pat.del.	mat.del.	n.del.	n.del.	n.del.		1 Allel					
43	D10S548		n.i.			n.del.	1 Allel						
45	D10S203		n.i.			n.i.	1 Allel	1 Allel	1 Allel				
45	D10S595	n.i.	n.del.			n.i.	1 Allel	1 Allel					
51	D10S197	n.del.	n.del.		n.del.	n.i.		2 Allele					

Von den Patienten MAR, AMS, LEM, MAJ und HOV stand elterliche DNA zur Verfügung, bei den Patienten ROB und KAN war nur mütterliche DNA vorhanden und von den Patienten MEG, GM4370, GM6936, BIH und PEN gab es keine elterliche DNA.

n.i. - Marker ist nicht informativ, mat.del. - maternales Allel im Patienten deletiert, pat.del. - paternales Allel im Patienten deletiert, n.del. - Marker ist im Patienten nicht deletiert, 1 Allel - Patient ist homozygot für den Marker (keine Aussage über Deletion möglich), 2 Allele - Patient ist heterozygot für den Marker, Pos. - Position in cM (entnommen der Whitehead-Karte (Dib et al. 1996)), k.D. - keine Daten.

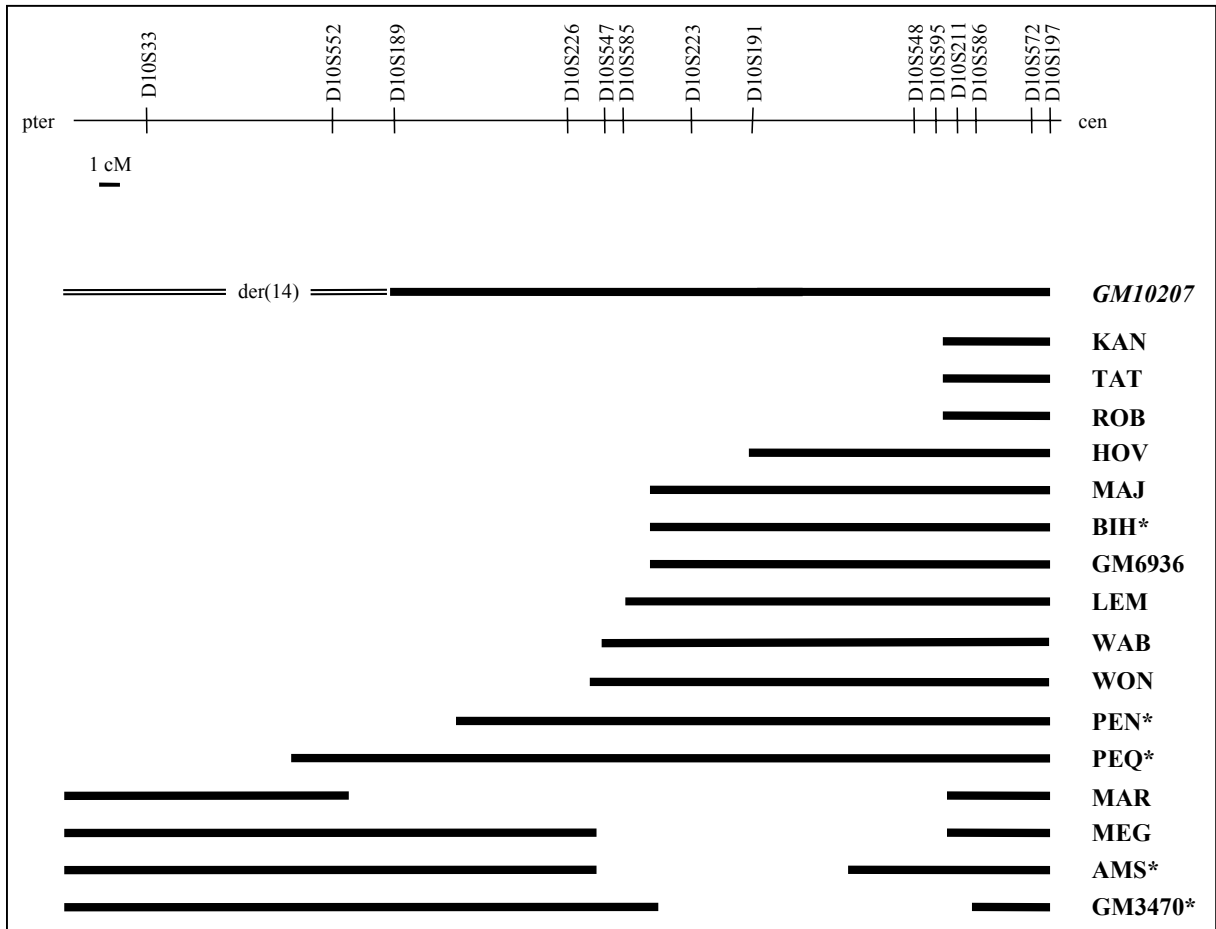


Abbildung 4: Bruchpunktkartierung von Patienten mit Chromosom 10p-Aberrationen.

* - Patienten ohne typische DiGeorge-Syndrom-Symptome. GM10207 besitzt eine balancierte Translokation. Die übrigen Patienten zeigen ein DiGeorge-Syndrom. Schwarze Balken zeigen nicht deletierte Regionen des Chromosoms.

3.1.4. Genotyp-Phänotyp-Analyse

Zur Definition einer Haploinsuffizienzregion für das DiGeorge-Syndrom auf 10p wurden die Deletionsbruchpunkte bei 16 Patienten mit einer Monosomie 10p molekulargenetisch kartiert und damit die jeweiligen Deletionsregionen bestimmt. Die hohe Variabilität des Phänotyps und die verminderte Penetranz des DGS zwingen dazu, daß für die Kartierung einer kritischen Region nur Patienten herangezogen werden können, die von ihrer klinischen Ausprägung in das DGS-Spektrum fallen. Ein Ausschluß von genomischen Regionen anhand von Patienten mit einer Monosomie 10p ohne Symptome des DGS ist nicht möglich. Unter Beachtung dieser Voraussetzung sind 11 Patienten für die Bestimmung einer kritischen DGS-Region informativ (LEM, MAJ, HOV, ROB, TAT, KAN, MEG, MAR, WON, WAB, GM6936). Die kritische DGS-Region ist definiert als kleinstes gemeinsames Deletionsintervall innerhalb

dieser Patientengruppe (SRO). Die einzelnen Symptome der Patienten können der Tabelle 2 (s. 2.1.) entnommen werden. Die Daten bereits veröffentlichter Fälle (MEG, MAR, GM6936, BIH, MAJ, TAT, WAB, GM10207) wurden aus der Literatur entnommen (Cowchock 1989; Greenberg et al. 1986; Hasegawa et al. 1997; Koenig et al. 1985; Lipson et al. 1996; Obregon et al. 1992; Schuffenhauer et al. 1995; Shapira et al. 1994a). Alle übrigen Patienten wurden im Rahmen dieser Arbeit publiziert (Lichtner et al. 2000; Schuffenhauer et al. 1998).

Der distale Bruchpunkt der interstitiellen Deletion im Patienten MEG definiert die distale Grenze der kritischen Region. Die proximale Grenze der kritischen DGS-Region wird durch die terminalen Deletionen der Patienten LEM, WON und WAB bestimmt. Die Deletionsbruchpunkte dieser vier Patienten kartieren in einem engen Intervall und wurden zur genauen Lokalisation der kritischen DGS-Region feinkartiert. Dabei wurden FISH-Experimente mit PAC- bzw. BAC-Sonden durchgeführt, um bruchpunktüberspannende Klone zu identifizieren. Das Hybridisierungssignal eines solchen Klons zeigt auf dem deletierten Chromosom 10 ein Signal von deutlich schwächerer Intensität als auf dem intakten Chromosom 10. Bei jedem der vier Patienten MEG, LEM, WON und WAB wurden zwischen 7 und 12 Klone hybridisiert und für jeden Patienten mindestens ein bruchpunktüberspannender Klon identifiziert (Abb. 5). Der Bruchpunkt bei Patient WON kartiert auf den PAC-Klonen PL196 und PL232, während der Bruchpunkt in Patient MEG auf den PAC-Klonen PL23, PL24 und PL29 lokalisiert ist. Dies zeigt, daß beide Patienten für eine gemeinsame etwa 300 kb große Region zwischen den PAC-Klonen PL196 und PL23 dizygot sind und keine gemeinsam deletierte Region aufweisen. Eine einzige SRO kann somit nicht definiert werden. Dies weist darauf hin, daß die Pathogenese des DGS auf 10p komplexer ist und mehrere Haploinsuffizienzloci, die durch große Intervalle voneinander getrennt sind, zum DGS-Phänotyp beitragen. Patient WAB wurde ursprünglich als Patient mit HDR-Syndrom beschrieben (Hasegawa et al. 1997). Dieses Syndrom wurde zum ersten Mal in einer Familie von Bilous et al. (Bilous et al. 1992) publiziert und beinhaltet einen Hypoparathyreoidismus, eine sensorineurale Taubheit und Nierenfehlbildungen. Auch Patient WON zeigt einen Hypoparathyreoidismus bzw. eine Hypokalzämie, eine sensorineurale Taubheit und eine Niereninsuffizienz und kann daher in das HDR-Symptomenspektrum eingeordnet werden. Die für das DGS typischen Symptome wie Herzfehler und T-Zelldefekt wurden bei WON nicht beobachtet. Neben WAB und WON zeigen acht weitere Patienten aus der Studie einen Hypoparathyreoidismus mit Hypokalzämie (MAR, LEM, GM6936, MAJ, HOV, ROB, TAT, KAN), drei eine Taubheit (BIH, MAJ, HOV) und sieben einen Nierendefekt (MAR, LEM,

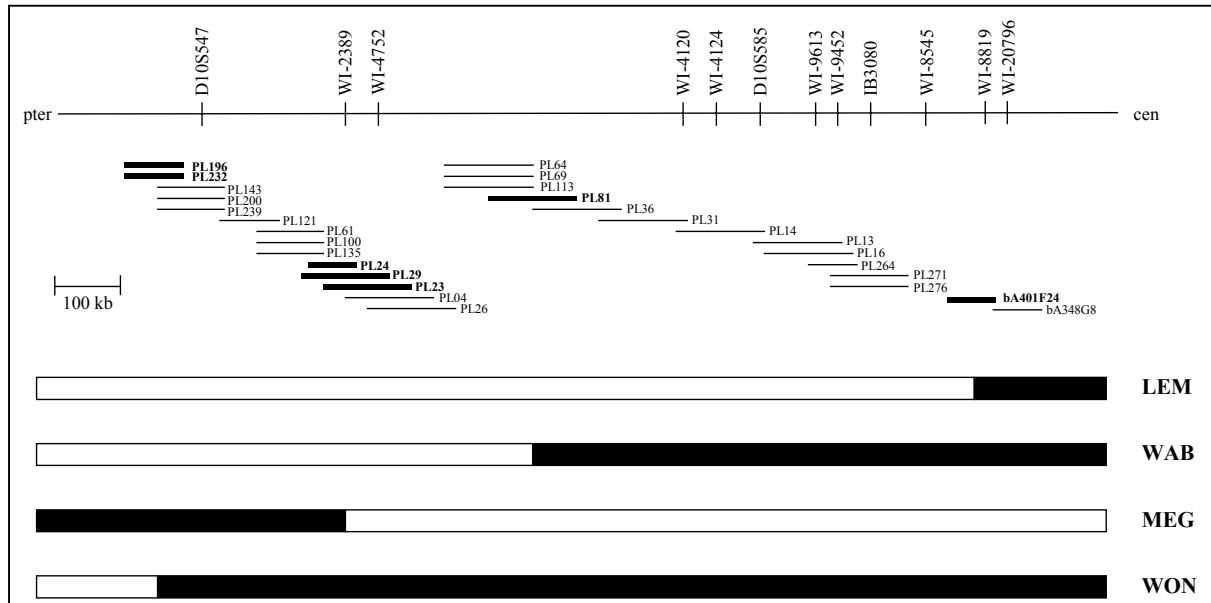


Abbildung 5: Kartierung von bruchpunktüberspannenden PAC/BAC-Klonen.

Ein Ausschnitt des PAC-Contigs ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die bruchpunktüberspannenden Klone sind durch breite Linien hervorgehoben. Deletierte Chromosomenbereiche sind durch weiße Balken, nicht deletierte Chromosomenbereiche durch schwarze Balken dargestellt.

GM6936, BIH, MAJ, HOV, KAN). Damit kartiert auf 10p ein Haploinsuffizienzlocus für das HDR-Syndrom (Abb. 6). Die HDR-Region ist distal durch den distalen Bruchpunkt der interstitiellen Deletion von Patient MAR und proximal durch den Bruchpunkt von Patient WON definiert. Patient MEG zeigt keine Symptome des HDR-Syndroms, hat aber einen Herzfehler, ebenso wie sieben weitere Patienten (MAR, GM6936, BIH, MAJ, ROB, WAB). Dies läßt darauf schließen, daß proximal zum distalen Bruchpunkt von Patient MEG eine zweite Haploinsuffizienzregion kartiert, die mit einem Herzfehler und einem T-Zelldefekt assoziiert ist (DGCR2).

Im Ergebnis der Deletionskartierung konnte das mit 10p-Monosomie assoziierte DGS als *contiguous gene syndrome* charakterisiert werden, das durch mindestens zwei Haploinsuffizienzregionen verursacht wird. Einer distalen Region (HDR1), verantwortlich für den Hypoparathyreoidismus, die sensorineurale Taubheit und die Nierenfehlbildungen, und einer proximalen Region (DGCR2), verantwortlich für den Herzfehler und den T-Zelldefekt (Abb. 6).

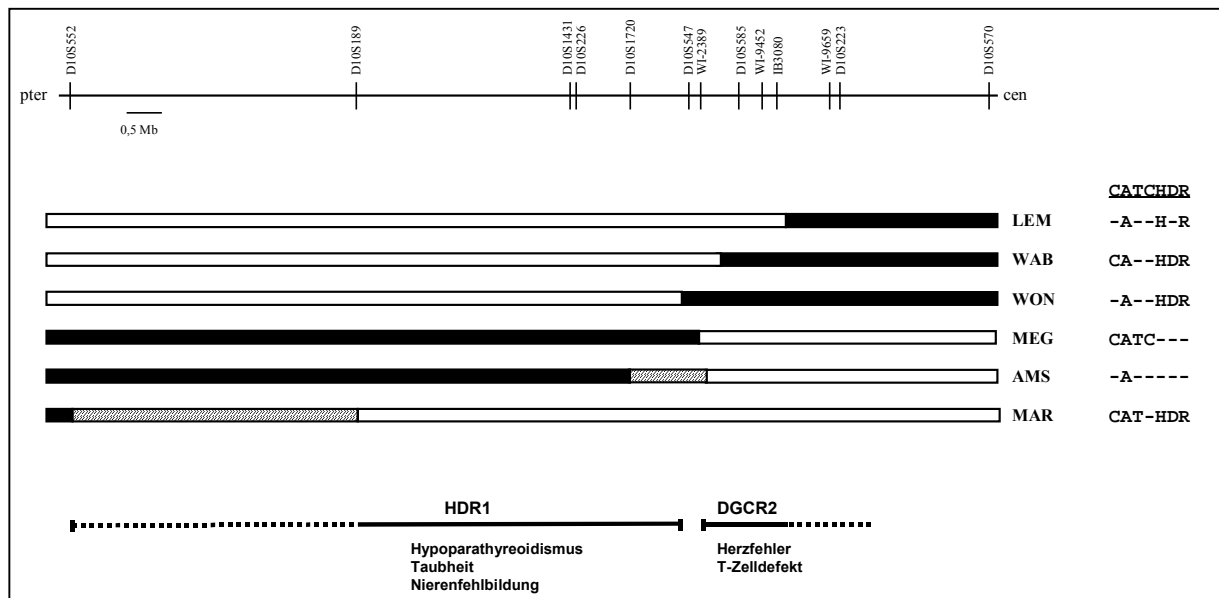


Abbildung 6: Definition der zwei am DGS-Spektrum beteiligten Haplinsuffizienzregionen.

Die deletierten Chromosomenregionen sind durch weiße Balken, die nicht deletierten Chromosomenregionen durch schwarze Balken dargestellt. Gestreifte Balken bezeichnen die Regionen, in denen die Bruchpunkte in den Patienten AMS und MAR kartiert wurden. Der Phänotyp der Patienten ist auf der rechten Seite durch Angabe der entsprechenden Akronyme zu ersehen: C - Herzfehler, A - faziale Dysmorphien, T - T-Zelldefekt, C – Gaumenspalte (*cleft palate*), H - Hypoparathyreoidismus, D - sensorineurale Taubheit (*deafness*), R – renale Anomalien.

3.1.5. Mikrodeletionsanalysen in der DGCR2 und in der HDR1-Region bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom und HDR-Syndrom

Mit FISH wurden Patienten nach Mikrodeletionen in der DGCR2 durchsucht. Als Sonden dienten die zwei nichtüberlappenden PAC-Klone PL04 und PL14, die in der DGCR2 kartieren (Abb. 8, Kapitel 3.2.1.). Für die Suche nach Mikrodeletionen standen in München 22 Patienten zur Verfügung, bei denen ein DiGeorge-Syndrom diagnostiziert wurde. Bei diesen Patienten wurden wenigstens zwei der drei Hauptsymptome des DiGeorge-Syndroms beobachtet: ein konotrunkaler Herzfehler, ein T-Zelldefekt und eine Hypokalzämie bzw. ein Hypoparathyreoidismus (Tab. 8). Eine Mikrodeletion 22q11 war durch FISH mit einer D22S75-Cosmid-Sonde (Oncor) ausgeschlossen worden. Alle Patienten zeigten mit den PAC-Klonen auf beiden Chromosomen 10 jeweils gleich starke Hybridisierungssignale. Ein Hinweis auf eine Deletion 10p wurde in keinem Fall gefunden.

Tabelle 8: Klinische Befunde von 22 DGS-Patienten ohne nachweisbare 22q11 Deletion.

Patient	Alter (Jahre)	Geschlecht	Hypokalzämie/ Hypoparathyreoidismus	T- Zelldefekt	angeborener Herzfehler	mentale Retardierung	kraniofaziale Dysmorphien	weitere Merkmale
01	1/12	w	-	+	+	zu jung	+	spitz zulaufende Finger
02	5	m	+	-	+	+	+	Gaumenspalte, taub
03	7	w	+	-	+	+	+	Velopharyngeale Insuffizienz
04	2	m	+	+	+	+	+	Lippen- /Gaumenspalte, Choanalatresie
05	3/12	m	+	-	+	zu jung	+	
06	3/12	w	-	+	+	zu jung	+	Choanalatresie
07	4/12	m	+	+	+	zu jung	+	
08	1	m	+	-	+	+	+	Nierendysplasie
09	1	w	+	?	+	+	+	
10	5/12	w	+	+	+	zu jung	+	doppelte Niere links
11	1	m	+	-	+	+	+	taub, Mikrostomie
12	6	w	+	+	-	+	+	taub
13	1	m	+	+	+	+	+	
14	1	m	-	+	+	zu jung	+	polycystische Niere
15	3	w	+	-	+	+	+	hoher Gaumen, taub
16	8	w	+	-	+	+	+	
17	5	w	+	?	+	+	+	Hydrozephalus
18	3/12	m	-	+	+	zu jung	+	
19	3	m	+	?	+	+	+	
20	0, verstorben	w	?	+	+	zu jung	+	Thymusaplasie
21	1	m	+	+	+	zu jung	+	CHARGE Assoziation
22	6/12	?	+	+	-	zu jung	+	Aplasie der Nebenschilddrüsen

Zusätzlich wurden in Dresden 120 Patienten untersucht, die mit Verdacht auf DGS zum Nachweis einer Mikrodeletion 22q11 eingesandt worden waren. Bei zehn Patienten wurde eine Mikrodeletion 22q11 nachgewiesen. Eine Mikrodeletion 10p mit dem PAC PL14 wurde dagegen in keinem der 120 Patienten gefunden (Bartsch et al. 1999). Die beiden PAC-Klone wurden darüberhinaus an weitere Labors gesandt, um dort nach Deletionen bei DGS-Patienten zu suchen. Eine Mikrodeletion 10p wurde bisher aus keinem Labor gemeldet (T. Haaf, A. Schinzel, C. Buys, K. Zerres, M. Vekemans, M. Sutcliffe, G. Novelli, A. Mavrou, E. Kjeldsen, mündliche Mitteilungen)

13 Patienten mit HDR-Syndrom wurden mit FISH auf eine Deletion in der HDR1-Region untersucht. Als Sonde wurde der BAC 49M24 (Research Genetics) (Abb. 17, Kapitel 3.5.2.1.) eingesetzt, auf dem das für das HDR-Syndrom verantwortliche Gen GATA-3 kartiert. In zwei Patienten wurde eine Mikrodeletion nachgewiesen (s. 3.5.2.2.).

3.2. Etablierung von PAC-Contigs über die 10p-Haploinsuffizienzregionen DGCR2 und HDR1

Über die beiden Haploinsuffizienzregionen DGCR2 und HDR1 wurden Contigs aus PAC-Klonen etabliert. Diese Contigs wurden im Rahmen des Humangenomprojekts sequenziert und dienten damit als Grundlage zur Identifizierung von potentiellen Kandidatengen. Außerdem erfolgte mit Hilfe der PAC-Klone die weitere Feinkartierung von 10p-Deletionen. Die PAC-Klone wurden aus den Bibliotheken RPCI1,3-5 (Ioannou und de Jong 1996) identifiziert. Die einzelnen Klone wurden vom Ressourcenzentrum des deutschen Humangenomprojekts (Zehetner und Lehrach 1994) bzw. vom UK Human Genome Mapping Project Resource Centre (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/>) bezogen.

3.2.1. Etablierung eines PAC-Contigs über die DGCR2

Die Deletionskartierung von Patienten mit Monosomie 10p und die anschließende Genotyp-Phänotyp-Analyse identifizierte die Haploinsuffizienzregion DGCR2, die für die Herzfehler und T-Zelldefekte bei den Patienten verantwortlich ist. Über diese Region wurde ein PAC-Contig etabliert. Als Startpunkt diente die genomische Karte des Whitehead-Instituts (http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/phys_map) zwischen den Markern D10S1720 und IB3080. Diese über 3 cM große Region beinhaltete 14 Marker. Mit 11 dieser Marker wurden die PAC-Bibliotheken durchsucht und 39 Klone identifiziert. Für jeden Marker wurde mindestens ein Klon erhalten. Um die PAC-Klone möglichst genau in die Whitehead-Karte integrieren zu können, wurden sie mit PCR auf das Vorhandensein weiterer Marker getestet.

Außerdem wurden von ausgewählten PAC-Klonen Restriktionsspaltungen durchgeführt, diese auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembranen übertragen (Southern-Blots). Durch Hybridisierungsexperimente mit diesen Southern-Blots und PAC-Klonen als Sonden konnten überlappende Klone identifiziert werden. Die 39 PAC-Klone wurden in sechs nichtüberlappende Contigs angeordnet.

Die fünf Lücken zwischen den Contigs sollten zunächst mit Hilfe eines PAC-*walking*-Ansatzes geschlossen werden. Dafür mußten neue Marker generiert werden, mit denen weitere PAC-Klone identifiziert werden konnten. Als neue Marker dienten PAC-Randfragmente, die über drei verschiedene Methoden isoliert wurden, der direkten Sequenzierung der PAC-Klone mit dem T7- bzw. SP6-Vektorprimer, der Alu-Vektor-PCR (Breukel et al. 1990; Lengauer et al. 1994) und der DOP-Vektor-PCR (Wu et al. 1996). Es wurden acht Marker über die Sequenzierung, 18 Marker über Alu-Vektor-PCR und 29 Marker über DOP-Vektor-PCR generiert. In die Sequenzen wurden PCR-Primer gelegt. Die PCR-Produkte dienten als Hybridisierungssonden, mit denen die PAC-Bibliotheken hybridisiert wurden. Die mit Hilfe der beiden PCR-Methoden gewonnenen Marker wurden meist ohne Sequenzierung direkt zum Durchsuchen der PAC-Bibliotheken eingesetzt. Mit insgesamt 13 neuen Markern wurden 59 weitere PAC-Klone identifiziert, die über PCR, Dot-Blot-Hybridisierungen und Southern-Blot-Analysen in die bestehenden Contigs integriert wurden. Mit diesen PAC-Klonen konnten die schon vorhandenen Contigs verlängert werden. Zudem konnten zwei vorher noch getrennte PAC-Contigs zu einem Contig verbunden werden. Vier Lücken zwischen den Contigs blieben erhalten.

Für die weitere Contig-Etablierung wurde eine *Fingerprinting*-Strategie verfolgt. Weitere PAC-Klone wurden mit Hilfe eines YAC-Klons isoliert, der die kritische Region (DGCR2) überspannte. Aus der Datenbank (http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/phys_map) wurde der CEPH-Mega-YAC 918H11 ausgewählt, da er für alle Marker zwischen D10S1720 und D10S547 positiv war und alle Lücken zwischen den fünf vorhandenen PAC-Contigs überspannte. Der YAC hatte eine Größe von 1760 kb und wurde aus einem Wechselfeldgel von den Hefechromosomen abgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Mit der so gewonnenen gesamten YAC-DNA wurden die PAC-Bibliotheken hybridisiert und 131 PAC-Klone identifiziert. 22 der Klone waren bereits im Rahmen des PAC-*walking*-Ansatzes isoliert worden, 109 PAC-Klone waren neu. Um diese 109 Klone in die schon bestehende PAC-Contig-Karte zu integrieren, wurde ein *Fingerprinting*-Protokoll durchgeführt (Marra et al. 1997). Alle 109 PAC-Klone und eine repräsentative Auswahl an 40 früher bereits isolierten Klonen wurden mit Hilfe dieser Methode analysiert. Die PAC-Klone wurden mit einem

Restriktionsenzym (HindIII) gespalten, auf einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 7) und die Restriktionsfragmente anschließend mit dem Programm Image (Sulston et al. 1989) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Image/>) bearbeitet und digitalisiert. Die so erhaltenen Daten wurden in das Programm FPC (Soderlund et al. 1997) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/fpc/>) übertragen. Dieses Programm erkennt aufgrund von identischen Fragmentgrößen der Restriktionsspaltungen überlappende PAC-Klone und ordnet diese in Contigs an. Die Parameter entsprachen den Empfehlungen aus Marra et al. (Marra et al. 1997), wurden jedoch während der halbautomatischen Auswertung zum Teil variiert (weniger stringente Bedingungen), um keine überlappenden Klone zu übersehen. Von den 109 mit dem YAC 918H11 isolierten PAC-Klonen wurden jeweils zwei Einzelkolonien dem *Fingerprinting*-Protokoll unterzogen. Bei einem Vergleich der Einzelkolonien eines PAC-Klons wurden in 11 Fällen (10 %) Deletionen beobachtet (Abb. 7). Die Spannbreite der Deletionen reichte von einer fehlenden Bande bis zu einem Klon ohne Insert. Außerdem waren bei sechs PAC-Klonen (6 %) die jeweiligen beiden Einzelkolonien völlig verschieden. Insgesamt waren bei 109 PAC-Klonen in 17 Fällen die beiden Einzelkolonien nicht identisch, was einem Anteil von 16 % entspricht. Mit Hilfe des *Fingerprinting*-Ansatzes konnten die neu gewonnen PAC-Klone in die bestehenden PAC-Contigs integriert werden. Es wurden alle Contigs verlängert, sowie eine Lücke zwischen zwei Contigs geschlossen. Die computergestützte Contig-Bildung wurde experimentell mit Southern-Blot- und Dot-Blot-Hybridisierungen, sowie PCR-Experimenten verifiziert. Es wurden nur fünf fehlerhaft integrierte PAC-Klone identifiziert, bei den übrigen Klonen wurde die Computerauswertung bestätigt.

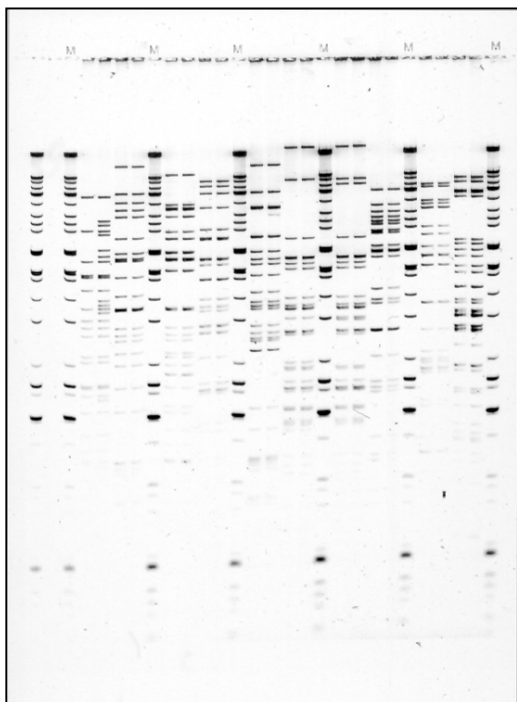


Abbildung 7: *Fingerprinting*-Agarosegel.

Gezeigt wird die Auftrennung von HindIII-Restriktionsfragmenten verschiedener PAC-Klone. Es wurden jeweils zwei Einzelklone eines PACs analysiert. Man sieht deutlich, daß beim ersten PAC-Klon von links die beiden Einzelklone nicht identisch sind. Bei einem der Klone fehlen einige Restriktionsbanden, was auf eine Deletion dieses Klons hindeutet. M - DNA-Längenstandard (jede 5. Spur).

Als Ergebnis des PAC-walking-Ansatzes und des *Fingerprinting*-Protokolls wurden annähernd 200 PAC-Klone isoliert und in vier Contigs geordnet. Die Contigs haben eine ungefähre Länge von 850 kb, 650 kb, 400 kb und 300 kb, so daß eine genomische Region von etwa 2,2 Mb mit PAC-Klonen überspannt wurde. Ausgehend von einer Durchschnittslänge eines PAC-Klons von 120 kb erhält man eine 18fache Repräsentation der Region mit genomischen Klonen. Zusätzlich wurden 29 neue Marker in die Contig-Karten integriert. Mit 41 PAC-Klonen wurde eine Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung durchgeführt, wobei alle Klone auf Chromosom 10p13-14 kartierten. Die Contigs wurden dem Sanger Centre zur Verfügung gestellt. 18 PAC-Klone wurden im Rahmen des Chromosom 10-Sequenzierprojekts vom Sanger Centre für die Sequenzierung ausgewählt und sequenziert. Abbildung 8 zeigt die PAC-Contig-Karte, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit nur 109 PAC-Klone aufgeführt sind. Die vom Sanger Centre sequenzierten Klone sind fett dargestellt. Die DGCR2-Haploinsuffizienzregion kartiert auf das proximale 850 kb große PAC-Contig 4 und ist ebenfalls eingezeichnet.

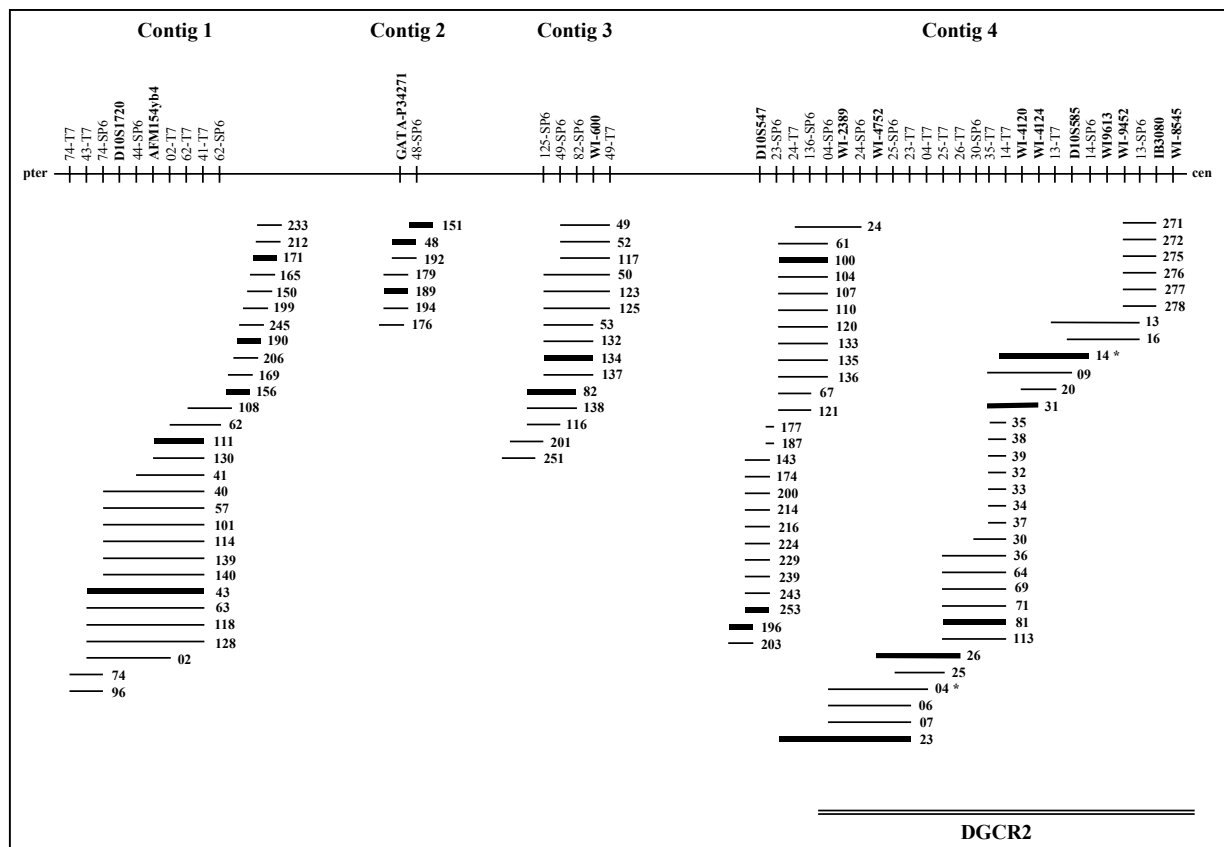


Abbildung 8: PAC-Contig-Karte über die Region D10S1720-WI-8545.

Die vier Contigs sind durch Lücken unbekannter Größe getrennt. Öffentliche Marker sind in fetter Schrift, selbst generierte Marker in normaler Schrift dargestellt. Der Abstand der Marker entspricht nicht dem realen Zustand, sondern die Marker sind in einem äquidistanten Abstand eingezeichnet. Die durch breite Balken hervorgehobenen PAC-Klone wurden im Rahmen des Humangenomprojekts im Sanger Centre sequenziert. Die mit einem Stern bezeichneten Klone 04 und 14 wurden als FISH-Sonden bei der Suche nach Mikrodeletionen eingesetzt. DGCR2 - kritische DiGeorge-Syndrom-Region 2.

3.2.2. Etablierung eines PAC-Contigs über die HDR1-Region

In Zusammenarbeit mit Hilde van Esch (Leuven) wurde über die HDR1-Region ein Contig aus PAC- und BAC-Klonen etabliert. Mit Hilfe des Patienten 5/99, der eine Translokation $t(8q;10p)$ besaß (Van Esch et al. 1999), konnte die HDR1-Region auf eine Größe von etwa 1 Mb eingegrenzt werden (s. 3.5.2.1.). Dieser Patient besaß eine kryptische Deletion in der 10p-Translokationsregion zwischen den Markern D10S189 und WI-5574. Da der YAC 927G5 diese Region fast vollständig überspannte, wurde er als geeignete Sonde für das Durchsuchen von PAC-Bibliotheken ausgewählt. Die PAC-Bibliotheken wurden mit der aus einem Wechselfeldgel isolierten gesamten YAC-DNA hybridisiert. Zusätzlich wurden die PAC-Bibliotheken mit einem neu generierten Marker, HVE10.9, durchsucht. Die Hybridisierung identifizierte 55 positive PAC-Klone. Mit Hilfe eines *Fingerprinting*-Protokolls (Marra et al. 1997) wurden 44 dieser Klone in zwei nicht überlappende Contigs von etwa 660 kb und 250 kb Länge angeordnet (Abb. 9). Analog der Vorgehensweise bei der Contig-Etablierung für die Region DGCR2 (s. 3.2.1., S. 53ff) wurden die Ergebnisse durch Hybridisierungen und PCRs bestätigt.



Abbildung 9: PAC-Contigs über die HDR1-Region.

Die Darstellung der Contigs stammt aus dem Fingerprint-Programm FPC. Beide Contigs sind nicht überlappend und haben eine Größe von etwa 250 kb (links) bzw. 660 kb (rechts).

3.3. In-silico-Analysen der genomischen Sequenzdaten

Die Sequenzdaten von 18 PAC-Klonen der DGCR2 wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Tim M. Strom, Abteilung für Medizinische Genetik, LMU München) automatisch analysiert. Zum einen wurden Exon-Vorhersageprogramme (MZEF, Genscan, Grail) eingesetzt und zum anderen wurde mit der Sequenz eine Datenbanksuche durchgeführt. Hierbei wurde eine cDNA-Datenbank sowie eine EST-Datenbank (Unigene) und eine STS-Datenbank (UniSTS) durchsucht. Außerdem wurde die translatierte Sequenz mit einer Proteindatenbank (Swissprot) abgeglichen. Darüberhinaus wurden repetitive Sequenzen und CpG-Inseln identifiziert. Die Ergebnisse wurden grafisch dargestellt (Abb. 10). Bei 11 PAC-Klonen konnte die vollständige Sequenz analysiert werden, bei sieben Klonen lag nur eine

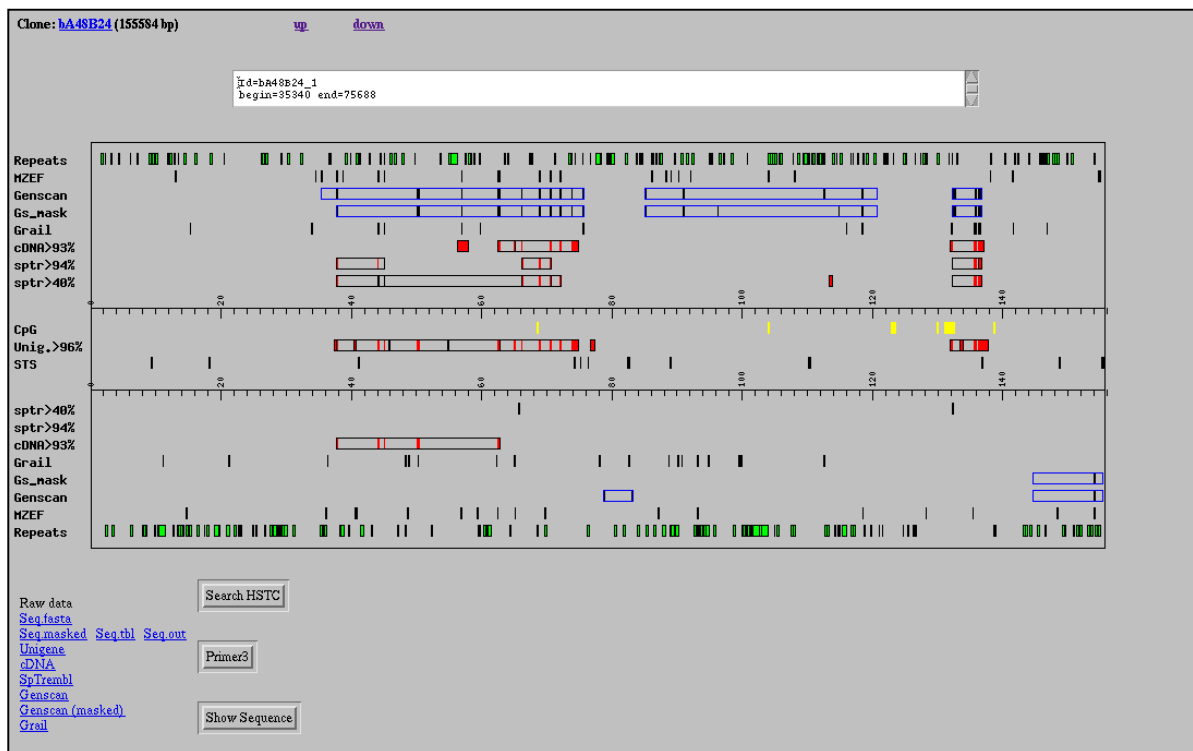


Abbildung 10: Analysewerkzeug für genomische Sequenzen (Tim M. Strom, Abteilung für Medizinische Genetik, LMU München).

Grafische Darstellung der Sequenzanalyse des BAC-Klons bA48B24. Der obere Teil entspricht dem (+)-Strang, der untere Teil dem (-)-Strang der Sequenz. In der Mitte sind CpG-Inseln, unigene-Cluster und STS dargestellt. Im oberen und unteren Drittel sind die Ergebnisse der Exon-Vorhersageprogramme und der Datenbankanalysen aufgeführt.

unvollständige Sequenz vor. Neben den PAC-Klonen wurden auch zwei BAC-Klone, die das PAC-Contig 4 proximal verlängerten (bA48A13, bA120C13), aus der Karte des Sanger Centre in die In-silico-Analyse miteinbezogen. So wurden Sequenzdaten über fast die gesamte DGCR2 analysiert. Tabelle 9 faßt die Ergebnisse der Sequenzanalysen zusammen, wobei nur die Resultate der Datenbankanalysen berücksichtigt sind. Insgesamt wurden bei der

Analyse vier verschiedene cDNAs identifiziert, AL114141, DKFZp566L0824, NAPOR-1, 2, 3 und KIAA0019. PAC PL190 enthält die Sequenz AL114141. Dies ist keine humane cDNA, sondern wurde aus dem Pilz *Botrytis cinerea* isoliert. Auf Aminosäureebene entspricht die Sequenz einer Transposase. Dies wurde auch bei der Datenbanksuche in einer Proteindatenbank mit der translatierten genomischen Sequenz bestätigt, die Transposasen verschiedener Prokaryonten identifizierte. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Klonierungsartefakt, welches während der Klonierung der PAC-Bibliothek durch Rekombination von *E.coli*-DNA mit humaner DNA gebildet wurde. Der Klon DKFZp566L0824 (PAC PL253) ist keine vollständige cDNA, d.h. es fehlt ihm ein durchgehender offener Leserahmen mit entsprechendem Start-Codon. Er ist im Rahmen einer großangelegten Klonierung von gewebe- und chromosomenspezifischen cDNAs des deutschen Humangenomprojekts aus foetaler Niere isoliert worden und gehört damit eher in die Klasse der EST-Klone. Die einzigen identifizierten Gene der DGCR2 sind NAPOR und KIAA0019. Ersteres ist auf den Klonen PL81, PL14, bA120C13 und bA48A13 lokalisiert, KIAA0019 liegt auf Klon bA48A13. Von NAPOR sind drei humane Isoformen bekannt (Choi et al. 1999), die sich hauptsächlich im 5'UTR unterscheiden und für Proteine von 490, 509 und 508 Aminosäuren kodieren. Es handelt sich um ein sehr großes Gen von etwa 550 kb Länge (s. 3.5.1.2., S. 79ff). KIAA0019 kartiert in der anderen Leserichtung proximal von NAPOR und kodiert für ein Protein von 828 Aminosäuren. Beide Gene sind im Contig 4 bzw. proximal davon lokalisiert (Abb. 11). In den distalen Contigs 1-3, die außerhalb der DGCR2 liegen, wurden keine cDNAs identifiziert. Auch die Suche in der Unigene-Datenbank ergab nur sehr wenige unigene-Cluster. Diese enthielten mit Ausnahme der Cluster für NAPOR und KIAA0019 zudem nie mehr als sieben EST-Sequenzen. Offene Leserahmen oder Homologien mit bekannten cDNAs wurden nicht gefunden. Der Datenbankabgleich der translatierten genomischen Sequenz mit einer Proteindatenbank ergab vier verschiedene Homologien, die bereits als Klonierungsartefakt erwähnte Transposase, sowie ein RNA-Polymerase-Elongationsfaktor SIII, P15 Untereinheit, und die beiden 60S Ribosomalen Proteine L29 und L39. Die beiden letztgenannten haben nur eine Homologie von 49 bzw. 31 %. Der RNA-Polymerase-Elongationsfaktor SIII, P15 Untereinheit, hat eine Homologie von 86 %.

Tabelle 9: In-silico-Analysedaten der PAC/BAC-Sequenzen.

Contig	PAC-Klon	Status	cDNA>93%	sptr>94%	sptr>50%	unigene
Contig 1	PL43	fertig	-	-	-	-
	PL111	fertig	-	-	-	-
	PL156	21 ctgs.	-	-	-	AW074085 (3)
	PL190	12 ctgs.	AL114141 (Bortrytis cinerea; Transposase)	Transposase (E.coli)	Transposase (E.coli)	AW074085 (3), AI472128 (2)
	PL171	fertig	-	-	-	AI472128 (2), AI003576 (2), AI761698 (2)
Contig 2	PL189	13 ctgs.	-	-	-	-
	PL48	29 ctgs.	-	-	-	AI612853 (1)
	PL151	fertig	-	-	60S Ribosomales Protein L29	-
Contig 3	PL82	fertig	-	RNA Polymerase Elongationsfaktor SIII	RNA Polymerase Elongationsfaktor SIII	-
	PL134	fertig	-	-	-	-
Contig 4 (DGCR2)	PL196	19 ctgs.	NAPOR-1 (Maus)	-	60S Ribosomales Protein L39	H29490 (5)
	PL253	14 ctgs.	NAPOR-1 (Maus), DKFZp566L0824	-	60S Ribosomales Protein L39	H29490 (1), AI120241 (1)
	PL100	10 ctgs.	-	-	-	-
	PL23	fertig	-	-	-	-
	PL26	fertig	-	-	-	AA909055 (5), AW205124 (1), H11238 (1), D59372 (2)
	PL81	fertig	NAPOR-3	-	NAPOR-3	AI652988 (8), AW298034 (3)
	PL31	fertig	-	-	-	AI67946 (2)
	PL14	fertig	NAPOR-1, 2, 3	NAPOR	NAPOR	H29796 (2), AI274943 (1)
	bA120C13	22 ctgs.	NAPOR-1, 2, 3	NAPOR	NAPOR	AI056198 (1), AI0649450 (6), R40515 (4), AW296773 (1), AF007147 (7), AI760279 (3), AI540204 (4), AA677963 (3), AI274943 (1), H29796 (2), AI266647 (2)
	bA48A13	13 ctgs.	NAPOR-1, 2, 3, KIAA0019	NAPOR	NAPOR	AI701553 (3)

Die PAC-Klone stammen aus den Contigs 1-4 (s. 3.2.1., S. 53ff), wobei Contig 1 das distalste und Contig 4 das proximalste Contig ist; Contig 4 beinhaltet die Haploinsuffizienzregion DGCR2; bA48A13 und bA120C13 sind BAC-Klone und wurden vom Sanger Centre proximal zu Contig 4 kartiert. Die PAC/BAC-Klone sind von distal (oben) nach proximal (unten) angeordnet. Der Sequenzier-Status zeigt an, ob die Sequenz vollständig ist (fertig) oder ob sie in Form mehrerer Contigs vorliegt (Anzahl ctgs.). cDNA>93%: Datenbankabgleich der genomischen Sequenz mit einer cDNA-Datenbank; sptr>94%, sptr>50%: Datenbankabgleich der translatierten genomischen Sequenz mit einer Proteindatenbank, Ergebnisse mit Homologien >94% bzw. >50%; unigene: Datenbankabgleich der genomischen Sequenz mit der unigene-Datenbank, es ist jeweils ein EST-Klon aus einem unigene-Cluster angegeben, die Anzahl der EST-Sequenzen im jeweiligen unigene-Cluster ist in Klammern vermerkt.

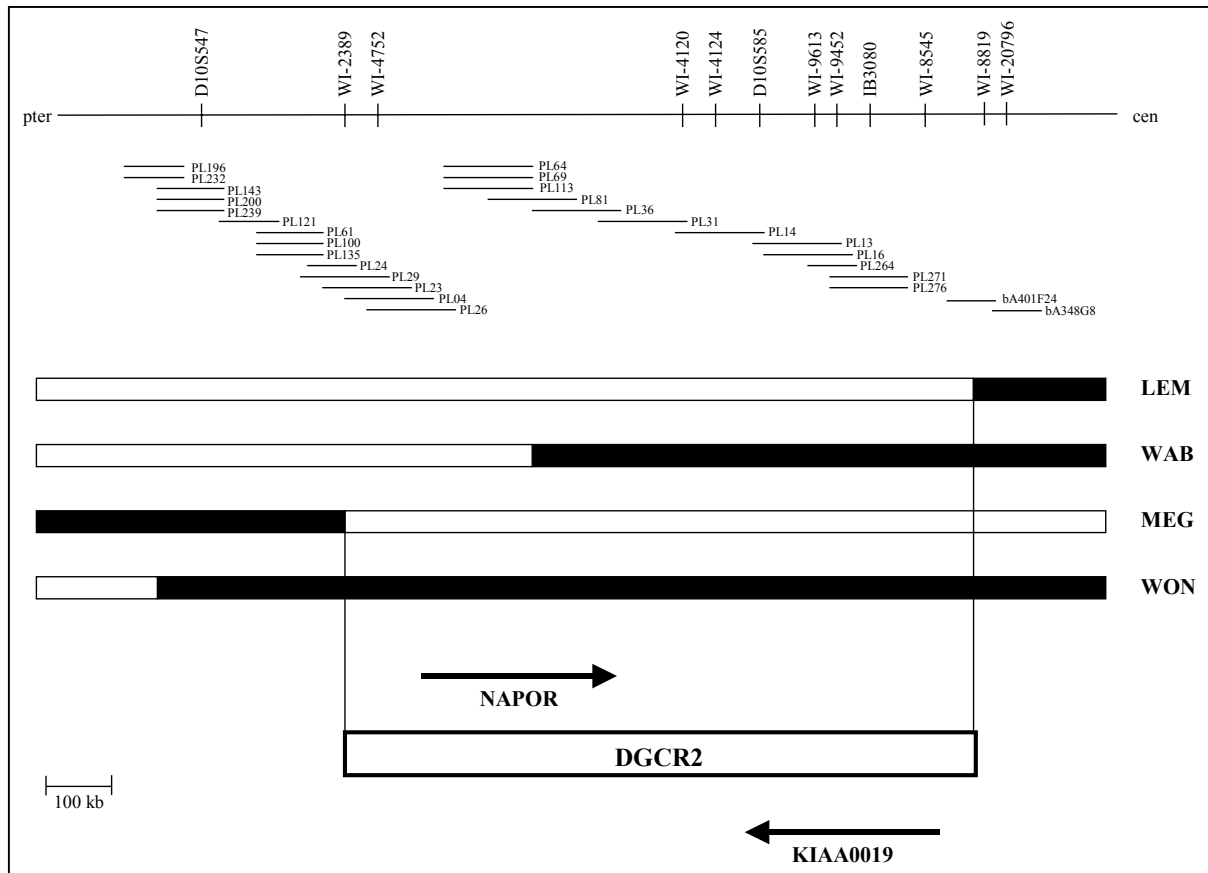


Abbildung 11: Identifizierte Gene in der Region DGCR2.

Die Region DGCR2 wurde durch die Patienten MEG und LEM definiert. Deletierte Chromosomenregionen sind durch weiße, nicht deletierte Regionen durch schwarze Balken dargestellt. NAPOR wird von Telomer zu Zentromer, KIAA0019 von Zentromer zu Telomer transkribiert. Ein Ausschnitt des PAC-Contigs ist oben dargestellt.

3.4. Identifizierung von Transkripten aus der Region DGCR2

Noch bevor die genomische Sequenz der PAC-Klone aus den Contigs 1-4 zur Verfügung stand, wurden Transkripte aus dieser Region isoliert. Dabei wurden die Ressourcen des Humangenomprojekts genutzt, in dessen Rahmen ständig neue exprimierte Sequenzen (ESTs) isoliert und mit Hilfe von Mensch-Nager-Hybridzellen im menschlichen Genom kartiert werden. EST-Klone, die in die Nähe der DGCR2 kartiert worden waren, wurden aus öffentlichen Transkriptionskarten ausgewählt und auf die etablierten vier PAC-Contigs 1-4 zurückkartiert. Die zurückkartierten Klone wurden vollständig sequenziert und *in silico* analysiert. Mit einem Teil der Klone wurden weitere cDNA-Bibliotheken durchsucht.

3.4.1. Kartierung von EST-Klonen aus der Gene Map 96 und Gene Map 98

Es wurden 57 EST-Klone aus den Transkriptionskarten Gene Map 96 und Gene Map 98 (Deloukas et al. 1998) ausgewählt. 41 der Klone stammten aus den Intervallen D10S226-D10S191, D10S547-D10S223 und D10S546-D10S191 der Gene Map 96. Diese Intervalle deckten die Region ab, in die auch die PAC-Contigs 1-4 kartiert wurden. Zusätzlich wurden 16 neu kartierte Klone aus der Gene Map 98 in die Untersuchung miteinbezogen. Die EST-Klone wurden vom Ressourcenzentrum des deutschen Humangenomprojekts (Zehetner und Lehrach 1994) bezogen. Von jedem Klon wurden zwei Einzelkolonien gepickt und DNA präpariert. In einer PCR wurden die Inserts mit Vektorprimern amplifiziert und die Insertgrößen mit der Datenbankangabe verglichen. Bis auf zwei Ausnahmen (est19, est23) stimmten bei allen EST-Klonen die experimentell mit PCR ermittelten Insertgrößen mit denen aus der Datenbank überein. Auf eine Kontrollsequenzierung der EST-Klone im Vorfeld der Kartierung wurde verzichtet. Die Details zu den für die Rückkartierung ausgewählten 57 EST-Klonen können der Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Aus der Gene Map 96 und Gene Map 98 für die Rückkartierung auf PAC-Contigs ausgewählte EST-Klone.

Laborname	IMAGp998	GenBank	Vektor	Gewebe	Insert [bp]
est01	C0557	T64641	pBluescript	Leber	651 (+)
est02	I17150	R41885	Lafmid BA	Gehirn	1404 (+)
est03	F2355	T70190	pBluescript	Lunge	431 (+)
est04	L04272	H09354	Lafmid BA	Gehirn	1537 (+)
est05	M23275	H11238	Lafmid BA	Gehirn	1967 (+)
est06	E16517	H91053	pT7T3D	Leber, Milz	1658 (+)
est07	O10370	R90964	pT7T3D	Leber, Milz	240 (+)
est08	J0887	T90775	pT7T3D	Leber, Milz	780 (+)
est09	D17154	R43292	Lafmid BA	Gehirn	1300 (+)
est10	C063	T40711	pBluescript	Milz	k.D. (300)
est11	I1474	T77188	Lafmid BA	Gehirn	2219 (+)
est12	E12439	H91832	pT7T3D	Retina	778 (+)
est13	F2373	R39268	Lafmid BA	Gehirn	1500 (+)
est14	K07154	R43535	Lafmid BA	Gehirn	1899 (+)
est15	I09147	R42092	Lafmid BA	Gehirn	1058 (+)
est16	O2345	T56175	pBluescript	Ovarium	1005 (+)
est17	I0257	T67691	pBluescript	Leber	1058 (+)
est18	N1317	R16220	Lafmid BA	Gehirn	k.D. (1500)
est19	F19101	T89613	pT7T3D	Leber, Milz	1773 (-)
est20	I13266	H05895	Lafmid BA	Gehirn	1234 (+)
est21	I22177	R60145	Lafmid BA	Gehirn	k.D. (1600)
est22	J20217	R78587	pT7T3D	Plazenta	478 (+)
est23	O11737	W52336	pT7T3D	Fibroblasten	1219 (-)
est24	O03172	R55907	Lafmid BA	Gehirn	1641 (+)

Labornamen	IMAGp998	GenBank	Vektor	Gewebe	Insert [bp]
est25	L08112	T96467	pT7T3D	Leber, Milz	765 (+)
est26	L03329	H50000	pT7T3D	Gehirn	726 (+)
est27	C05163	R25288	Lafmid BA	Gehirn	1439 (+)
est28	D2037	T48337	pT7T3D	Milz	542 (+)
est29	D12167	R49146	Lafmid BA	Gehirn	1840 (+)
est30	M12210	R70617	pT7T3D	Plazenta	1026 (+)
est31	G09666	N70172	pT7T3D	Lunge	1757 (+)
est32	B19167	R36308	Lafmid BA	Gehirn	4500 (k.D.*)
est33	I21288	H29489	Lafmid BA	Gehirn	1018 (+)
est34	C10143	R40515	Lafmid BA	Gehirn	1714 (+)
est35	N0151	T62527	pBluescript	Lunge	
est36	E1470	T66289	Lafmid BA	Gehirn	1758 (+)
est37	M2118	T67149	pT7T3D	Leber, Milz	
est38	E08145	R40342	Lafmid BA	Gehirn	3073 (k.D.*)
est39	I24837	AA020935	pT7T3D	Retina	
est40	A08158	R20162	Lafmid BA	Gehirn	1397 (+)
est41	H24138	R12053	Lafmid BA	Gehirn	1596 (+)
est42	H091481	AA176360	pBluescript	Neuroepithel	k.D. (3000)
est43	P24670	N70895	pT7T3D	Lunge	k.D. (2000)
est44	L18185	R26015	pT7T3D	Plazenta	830 (+)
est45	G07466	H92287	pT7T3D	Epiphyse	1171 (+)
est46	I101477	AA180285	pBluescript	Retina	k.D. (k.D.*)
est47	F22298	R89729	pT7T3D	Gehirn	1340 (+)
est48	D03317	H23916	pT7T3D	Gehirn	738 (+)
est49	K03172	R56179	Lafmid BA	Gehirn	1581 (+)
est50	H12162	R21357	Lafmid BA	Gehirn	2058 (+)
est51	N01178	R59360	Lafmid BA	Gehirn	k.D. (k.D.*)
est52	K13652	N69395	pT7T3D	Leber, Milz	k.D. (900)
est53	N081426	AA156188	pBluescript	Endothel	k.D. (k.D.*)
est54	J09652	N69378	pT7T3D	Leber, Milz	k.D. (1600)
est55	A15655	N69648	pT7T3D	Leber, Milz	k.D. (900)
est56	C02280	H16594	Lafmid BA	Gehirn	1427 (+)
est57	N22271	H08409	Lafmid BA	Gehirn	1118 (+)

Labornamen - interner Klonname; IMAGp998 - Klonname des Ressourcenzentrums des deutschen Humangenomprojekts; GenBank - Klonname in Genbank; Vektor - EST-Klonierungsvektor; Gewebe - Gewebe, aus dem der EST-Klon isoliert wurde; Insert - aus der Datenbank entnommene Länge des Inserts in bp (k.D. - keine Daten über die Größe des Klons in der Datenbank vorhanden), (+) - Länge des Insert-PCR-Amplifikats stimmt mit den Angaben der Datenbank überein, (-) - Länge des Insert-PCR-Amplifikats stimmt mit den Angaben der Datenbank nicht überein, (k.D.*) - keine Daten über die Größe des Insert-PCR-Amplifikats erhoben. EST-Klone, die auf PAC-Klone zurückkartiert wurden, sind in fetter Schrift hervorgehoben.

Die EST-Klone wurden auf Southern-Blots der PAC-Klone hybridisiert. Um die genomische Region aller vier Contigs abzudecken, wurden insgesamt 19 PAC-Klone hybridisiert, wobei das größte Contig 4 mit 14 PAC-Klonen höher repräsentiert war als die drei distaleren Contigs 1-3. Dies entspricht der Bedeutung von Contig 4, in das durch Deletionskartierung die Haploinsuffizienzregion DGCR2 kartiert worden war (s 3.1.4.). Es wurden 12 der 57 EST-Klone (23 %) auf PAC-Klone zurückkartiert, die ausschließlich zum proximalen Contig 4

gehören. (Abb. 12). Die 12 EST-Klone des Contigs 4 wurden vollständig sequenziert. Die Sequenzen hatten eine Länge von 608 bp bis 3131 bp. Mit den Sequenzen wurden die folgenden vier Datenbanken durchsucht: dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>), EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>), unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html>) und THC (<http://www.tigr.org/tdb/hgi/hgi.html>). Die dbEST-Datenbank enthält nur EST-Klone, die EMBL-Datenbank enthält alle DNA-Sequenzen mit Ausnahme von EST-Klonen und die beiden Datenbanken unigene und THC enthalten Cluster von überlappenden EST-Klonen. Neben der Datenbank-Suche wurde jede Sequenz mit dem Programm Repeatmasker (http://ftp.genome.washington.edu/RM/RM_details.html) auf die Anwesenheit von repetitiven Elementen durchsucht. Poly(A)-Signale wurden anhand der Consensus-Sequenz AATAAA identifiziert und offene Leserahmen mit Hilfe des Programms ORF-Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) erkannt. Die Daten der zurückkartierten EST-Klone sind in der Tabelle 11 zusammengefaßt.

In einer Datenbanksuche wurden mit den 12 sequenzierten EST-Klonen außer weiteren ESTs keine zusätzlichen Sequenzhomologien gefunden. Neun der 12 zurückkartierten ESTs enthalten repetitive Elemente, nur zwei EST-Klone besitzen ein poly(A)-Signal. In keinem Klon wurde ein signifikanter offener Leserahmen gefunden.

Tabelle 11: Charakterisierung der zurückkartierten EST-Klone.

Klon	Länge [bp]	EMBL	EST	unigene	THC	Gewebe	repetitive Elemente	ORF [bp]	poly(A)
est11	1838	-	5	1	2	Gehirn Testis	MER1	354 (+2) 345 (+1) 261 (+3)	-
est12	608	-	3	-	1	Retina Testis	-	-	-
est15	999	-	2	-	-	Gehirn	-	-	-
est20	1102	-	1	-	-	Gehirn	MIR	144 (+3) 136 (+3) 117 (+3)	-
est21	1663	-	6	1	1	Gehirn	MIR MER1	141 (+2) 111 (+2)	-
est24	1467	-	23	1	2	Gehirn Herz Testis	-	216 (+3) 156 (+3) 141 (+1)	-
est26	644	-	14	1	2	Gehirn Herz Lunge Nase	LTR- Retrov.	168 (+1) 117 (+1)	+
est29	1712	-	6	1	2	Gehirn	-	276 (+3) 192 (+2) 159 (+1)	-
est45	1470	-	3	-	-	Gehirn Glioma	simple repeat MIR	201 (+1) 192 (+2) 147 (+2)	-
est46	3131	-	3	-	1	Retina	Alu MER5A LTR	300 (+3) 231 (+2) 165 (+2)	-
est48	644	-	16	1	2	Gehirn Nase Lunge Herz	LTR1	168 (+1) 117 (+1)	+
est51	1663	-	11	1	2	Gehirn	-	384 (+1) 243 (+3) 180 (+1)	+

Die GenBank-Nummern der EST-Klone können der Tabelle 10 entnommen werden. Die Sequenzen sind im Anhang II aufgeführt. EMBL - Anzahl an gefundenen Einträgen in der EMBL-Datenbank nach einer Blast-Suche (alle DNA-Sequenzen ausschließlich ESTs), EST - Anzahl an gefundenen Sequenzeinträgen in der dbEST-Datenbank (nur ESTs) nach Blast-Suche, unigene - Anzahl an gefundenen Einträgen in der unigene-Datenbank nach Blast-Suche (EST-Cluster), THC - Anzahl an gefundenen Einträgen in der THC-Datenbank nach Blast-Suche (EST-Cluster). Gewebe - Gewebe, aus denen die in den Datenbank-Suchen gefundenen EST-Klone isoliert wurden. Die repetitiven Elemente wurden mit Hilfe des Programms Repeatmasker (http://ftp.genome.washington.edu/RM/RM_details.html) identifiziert. ORF - die drei längsten offenen Leserahmen, ermittelt mit dem Programm ORF-Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) (offene Leserahmen kleiner als 50 bp wurden nicht aufgeführt; es wurden nur Leserahmen auf dem (+)-Strang berücksichtigt; (+1), (+2), (+3) – Leserahmen des ORF). poly(A) - Identifizierung des poly(A)-Signals AATAAA 11-30 bp 5' vom Beginn der Polyadenylierung, (-) - kein poly(A)-Signal vorhanden, (+) - poly(A)-Signal vorhanden. Stand Oktober 1999.

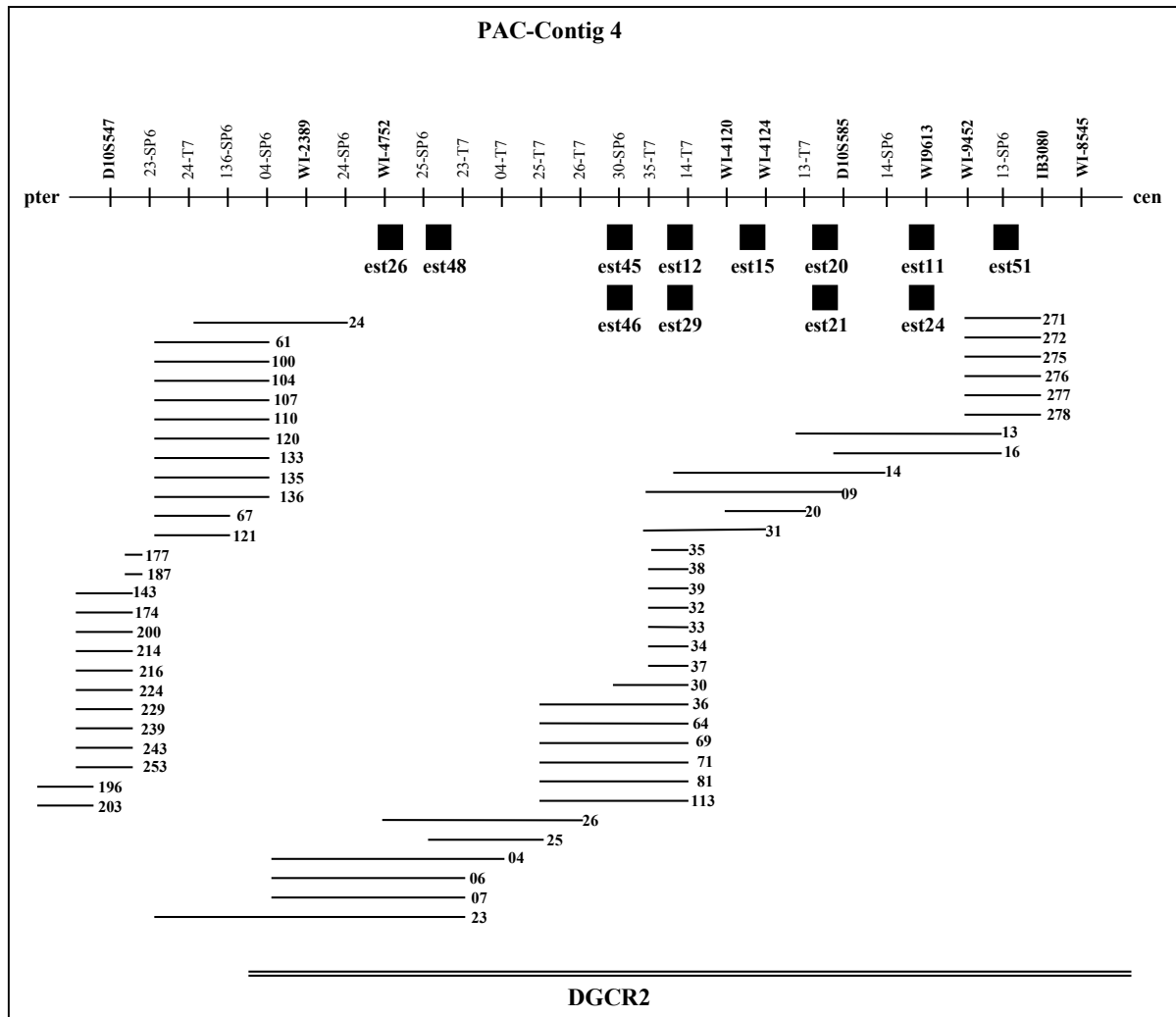


Abbildung 12: Kartierung von EST-Klonen auf das PAC-Contig 4. EST-Klone sind als schwarze Quadrate, PAC-Klone sind als Linien dargestellt. Die Marker sind in einem äquidistanten Abstand eingezeichnet, d.h. die Länge der Linien entspricht nicht der tatsächlichen Größe der PAC-Klone. DGCR2 - kritische DiGeorge-Syndrom-Region 2.

3.4.2. Durchsuchung von cDNA-Bibliotheken mit zurückkartierten EST-Klonen

Die Sequenzierung und anschließende In-silico-Analyse der 12 auf das PAC-Contig 4 zurückkartierten EST-Klone ergab keinen Hinweis darauf, daß es sich um funktionelle Gene handelte. Da alle 12 EST-Klone aus cDNA-Bibliotheken isoliert wurden, die mittels eines poly(T)-Primers generiert worden waren, handelte es sich bei den Sequenzen jeweils um die 3'Regionen der mutmaßlichen cDNAs. Um auch die 5'Regionen der cDNAs zu erhalten, wurden mit neun zurückkartierten EST-Klonen weitere cDNA-Bibliotheken durchsucht. In acht der Klone wurden interne PCR-Primer gelegt und mit diesen zwei Lambda gt11 cDNA-

Bibliotheken durchsucht. Die Bibliotheken stammten aus adultem Thymus (clontech Cat.# HL5041t) und foetalem Herz (clontech Cat.# HL5017b). Mittels PCR wurde bei zwei Klonen eine Expression im Thymus und bei sechs Klonen eine Expression im foetalen Herzen nachgewiesen. In vier Fällen waren dafür zwei PCR-Runden nötig. Mit den beiden im Thymus expremierten EST-Klonen (est11, est20) wurde die ausplattierte Lambda gt11 Thymus cDNA-Bibliothek hybridisiert. Est20 identifizierte einen positiven Klon, der in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert und sequenziert wurde. Mit einer 5'Sonde dieses Klons wurde die Bibliothek ein zweites Mal hybridisiert und ein weiterer cDNA-Klon erhalten, der jedoch die cDNA-Sequenz nicht verlängerte. Mit dem est11 wurde kein cDNA-Klon in der Thymus cDNA-Bibliothek identifiziert. Mit drei der sechs im foetalen Herzen expremierten EST-Klone (est11, est12, est15) wurde die foetale Herz cDNA-Bibliothek hybridisiert. Ein positiver cDNA-Klon wurde in keiner der drei Hybridisierungen erhalten (Tab. 12).

Neben den zwei Lambda-cDNA-Bibliotheken standen des weiteren vier humane Marathon Ready™ RACE-cDNA-Bibliotheken zur Verfügung (adulte Herz-cDNA-Bibliothek, clontech Cat.# 7404-1; foetale Gehirn-cDNA-Bibliothek, clontech Cat.# 7402-1; Embryo-cDNA-Bibliothek, clontech Cat.# 7438-1; adulte Retina-cDNA-Bibliothek, clontech Cat.# 7449-1), die mittels 5'RACE durchsucht wurden. Für die 5'RACE-Experimente wurden für neun der zurückkartierten EST-Klone Primer bestimmt und damit verschachtelte PCRs (*nested PCR*) durchgeführt. Die Herz-, Gehirn- und Embryo- cDNA-Bibliotheken wurden mit allen neun Klonen, die Retina-cDNA-Bibliothek wurde mit dem EST-Klon est12 durchsucht. Von sechs EST-Klonen wurden dabei insgesamt 11 neue cDNA-Klone erhalten (Tab. 12).

Alle cDNA-Klone wurden in den Vektor pGEM-T kloniert und anschließend vollständig sequenziert. Es schloß sich eine In-silico-Analyse an, wobei die längsten offenen Leserahmen, mögliche poly(A)-Signale und repetitive Elemente identifiziert wurden. Außerdem wurden mehrere DNA-Datenbanken (EMBL, GenBank, dbEST, unigene) mit den cDNA-Sequenzen durchsucht. Die Analyse der sechs verlängerten EST-Klone wird im folgenden für jeden Klon einzeln beschrieben.

est15: Aus einer foetalen Gehirn-cDNA-Bibliothek wurden mittels 5'RACE zwei Klone von 1254 bp und 1812 bp Länge isoliert. Der kürzere Klon überlappt vollständig mit dem längeren Klon. Im Vergleich zu est15 alleine wurden in einer Datenbanksuche keine zusätzlichen homologen Sequenzen identifiziert. Die Klone enthalten keine repetitiven Sequenzen, keine poly(A)-Signale und keine signifikant großen offenen Leserahmen.

est20: Es wurden zwei cDNA-Klone aus einer in Lambda-Phagen klonierten Thymus-cDNA-Bibliothek (2216 bp und 902 bp) und ein Klon aus der Embryo-RACE-cDNA-Bibliothek (3317 bp) isoliert. Alle drei Klone stimmen in der Sequenz überein, wobei der RACE-Klon den est20 am weitesten in 5' Richtung verlängerte. Eine Datenbanksuche mit der verlängerten est20-Sequenz fand einen neuen EST-Klon, der aus einem T Zell-Lymphom stammt, und der mit dem Ausgangsklon est20 nicht entdeckt wurde. Weitere homologe Sequenzen wurden nicht gefunden. Die auf 3317 bp verlängerte EST-Sequenz enthält an repetitiven Sequenzen ein vollständiges Alu-Element in der 5' Region und zusätzlich L2- und MIR-Elemente. Ein poly(A)-Signal ist nicht vorhanden. Der größte offene Leserahmen hat eine Größe von 291 bp.

est21: Der est21 wurde durch zwei RACE-Klone auf 2319 bp und 2521 bp verlängert. Beide RACE-Klone stammten aus einer adulten Herz cDNA-Bibliothek und überlappen vollständig. Mit der verlängerten Sequenz des est21-Klons wurden in einer Datenbanksuche nur homologe EST-Sequenzen identifiziert, die auch mit dem unverlängerten est21 gefunden wurden. Die auf 2521 bp verlängerte Sequenz enthält zwei repetitive Elemente (MIR, MER1) und kein poly(A)-Signal. Der größte offene Leserahmen ist 174 bp lang.

est24: Der est24 wurde mit Hilfe eines 5'RACE-Klons auf 2021 bp verlängert. Der RACE-Klon stammte aus einer Embryo-cDNA-Bibliothek. Mit der neuen Sequenz wurden in einer Datenbanksuche keine neuen homologen Sequenzen gefunden. Die neue 554 bp große Sequenzverlängerung enthält ein 330 bp langes Alu-Element. Der verlängerte est24-Klon besitzt kein poly(A)-Signal, und der größte offene Leserahmen hat eine Länge von 216 bp.

est26: Mit dem est26 wurden insgesamt vier RACE-Klone erhalten. Zwei der Klone stammten aus einer Embryo cDNA-Bibliothek (785 bp und 811 bp), zwei aus einer foetalen Gehirn-cDNA-Bibliothek (821 bp und 1082 bp). Ein Klon wurde als Klonierungsartefakt verworfen, da in seiner Sequenz der cDNA-Synthese-Primer gefunden wurde. Die Analyse der übrigen drei Klone zeigte, daß zwei Klone vollständig überlappten und ein Klon eine 141 bp lange Insertion in der 5' Region von est26 enthält. Eine Datenbanksuche mit den verlängerten Klonen fand keine homologen Sequenzen, mit Ausnahme der EST-Sequenzen, die auch mit est26 identifiziert worden waren. Der verlängerte est26-Klon enthält ein LTR-Retrovirales Element und besitzt ein poly(A)-Signal. Der größte offene Leserahmen hat eine Länge von 222 bp.

est29: Der est29 konnte mit einem RACE-Klon aus einer Embryo-cDNA-Bibliothek auf 3917 bp verlängert werden. Mit der verlängerten Sequenz wurden in einer Datenbanksuche keine

neuen homologen Sequenzen identifiziert. Die verlängerte Sequenz enthält in der 5'Region Alu-Elemente, die eine Länge von insgesamt 602 bp haben. Weitere repetitive Sequenzen wurden nicht gefunden. Der verlängerte est29-Klon besitzt kein poly(A)-Signal. Der größte offene Leserahmen hat eine Länge von 291 bp.

Die Sequenzanalyse der verlängerten EST-Klone ergab in keinem Fall einen Hinweis auf funktionelle Gene.

Tabelle 12: Durchsuchung von cDNA-Bibliotheken mit zurückkartierten EST-Klonen.

EST-Klon	Marathon Ready™ cDNA-Bibliotheken (clontech)				Lambda gt11 cDNA-Bibliotheken (clontech)	
	Herz (ad.)	Gehirn (fe.)	Embryo	Retina (ad.)	Thymus (ad.)	Herz (fe.)
est11	-	-	-		PCR: + (2. Runde) Hyb.: -	PCR: + (1. Runde) Hyb.: -
est12	-	-	-	-	PCR: -	PCR: + (1. Runde) Hyb.: -
est15	-	2 Klone	-		PCR: -	PCR: + (1. Runde) Hyb.: -
est20	-	-	1 Klon		PCR: + (2. Runde) Hyb.: 2 Klone	PCR: + (1. Runde)
est21	2 Klone	-	-			PCR: + (2. Runde)
est24	-	-	1 Klon			PCR: -
est26	-	2 Klone	2 Klone			PCR: -
est29	-	-	1 Klon			PCR: + (2. Runde)
est48	-	-	-			

Die GenBank-Nummern der EST-Klone können der Tabelle 10 entnommen werden. Mit den Marathon Ready™ cDNA-Bibliotheken (Clontech) wurden 5'RACE-Experimente durchgeführt: - = mit der PCR keine cDNA-Klone erhalten; 1 Klon/2Klone - mit der PCR 1 bzw. 2 cDNA-Klone erhalten; leere Zelle - keine PCR durchgeführt. Die Lambda gt11 cDNA-Bibliotheken (clontech) wurden mit PCR getestet und gegebenenfalls hybridisiert: PCR - mit PCR wurde getestet, ob der EST in der cDNA-Bibliothek expremiert wird (gegebenenfalls 2 PCR-Runden durchgeführt); Hyb. - die ausplattierten cDNA-Bibliotheken wurden mit dem EST-Klon hybridisiert (- = bei der Hybridisierung keine cDNA-Klone erhalten; leere Zelle - es wurde keine PCR und/oder Hybridisierung durchgeführt). ad. - adult, fe. - foetal.

3.5. Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenem aus den Haploinsuffizienzregionen DGCR2 und HDR1

Die Analyse der DGCR2 wurde in München durchgeführt. Die Charakterisierung der HDR1-Region verlief in Zusammenarbeit mit Hilde Van Esch (Leuven) in München und Leuven.

3.5.1. Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengen aus der Haploinsuffizienzregion DGCR2

Die Sequenzierung des PAC-Contigs 4 und weiterer großer Bereiche auf 10p im Rahmen des Humangenomprojekts erleichterte die Identifizierung von Genen in der Region erheblich (s.3.3, S. 57ff). Die DGCR2 wurde durch Deletionskartierung zwischen die Bruchpunkte der beiden Patienten MEG und LEM kartiert (s. 3.1.4., S. 48ff). Auch wenn die Region noch nicht als vollständige, d.h. lückenlose Sequenz vorliegt, so kann man anhand der *Fingerprint*-Daten der PAC- bzw. BAC-Klone aus dem Contig und der bekannten bruchpunktüberspannenden PAC- bzw. BAC-Klone in den Patienten MEG und LEM die Größe der DGCR2 abschätzen. Die DGCR2 hat eine Länge von etwa 250 HindIII-Restriktionsfragmenten. Ausgehend von einer durchschnittlichen Länge von 4,1 kb pro HindIII-Fragment, ergibt dies für die DGCR2 eine Größe von etwa 1 Mb. Die In-silico-Analyse identifizierte in dieser Region zwei Gene, NAPOR und KIAA0019 (s. 3.3., S. 57ff). NAPOR lokalisiert im distalen Bereich der DGCR2 und umspannt eine genomische Region von etwa 550 kb, KIAA0019 kartiert proximal von NAPOR und hat eine Größe von etwa 400 kb. Die Gengröße von KIAA0019 wurde anhand von *Fingerprint*-Daten abgeschätzt, die Gengröße von NAPOR wurde aus der genomischen Sequenz abgeleitet. Die Richtung der Transkription verläuft beim NAPOR-Gen in Telomer-Zentromer-Richtung, beim KIAA0019-Gen in Zentromer-Telomer-Richtung (Abb. 13, Kapitel 3.3.). NAPOR ist ein RNA bindendes und während der Apoptose induziertes Gen. Dies macht es zu einem potentiellen Entwicklungsgen und damit zu einem möglichen Kandidatengen für Herzfehler und T-Zelldefekt.

3.5.1.1. Expressionsanalyse von NAPOR

Eine EST-Datenbanksuche mit der NAPOR-cDNA ergab mehr als 200 Einträge, wobei die identifizierten EST-Klone aus 25 verschiedenen Geweben isoliert worden waren. Dies weist auf eine beinahe ubiquitäre Expression des Gens hin. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, zu welcher Zeit der humanen Entwicklung und in welchen Organen NAPOR expremiert wird. Dies wurde über eine Northern-Blot-Hybridisierung sowie über In-situ-Hybridisierungen bestimmt. Für solche Untersuchungen stand eine Sammlung von humanen Embryoschnitten aus verschiedenen Entwicklungsstadien zur Verfügung (M. Vekemans, Paris). Mit diesen Präparaten wurden mit einer NAPOR-Sonde RNA-in situ-Hybridisierungen durchgeführt.

Als Hybridisierungssonde wurde ein Teil des 3'UTRs ausgewählt, der in allen bisher bekannten Isoformen des Gens vorhanden ist. Es handelte sich um ein 410 bp langes

Fragment, das mittels PCR aus einer humanen adulten Herz-cDNA-Bibliothek (clontech Cat.# 7404-1) amplifiziert wurde (Primer: NAPOR_insitu2f (4062): 5'CAA CCC ACC TGC ATG CAT CTC CC 3', NAPOR_3RTr (4044): 5'CAG AGT AGC ACA AGC CAA CTA TAA CCC 3'). Die exakte Lokalisation dieses 3'UTR-Fragments in den drei NAPOR-Isoformen ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Lokalisation der für die In-situ-Hybridisierung klonierten NAPOR-Sonde in den drei Isoformen NAPOR-1, -2 und -3.

Isoform	GenBank	Position
NAPOR-1	AF036956	4383-4792
NAPOR-2	AF090694	4251-4660
NAPOR-3	AF090693	5640-6050

In der Spalte GenBank ist die GenBank Accession No. angegeben. Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf diese Einträge. Die Isoformen wurden bei Choi et al. beschrieben (Choi et al. 1999).

Eine Computeranalyse mit dem Programm Repeatmasker (http://ftp.genome.washington.edu/RM/RM_details.html) zeigte keine repetitiven Elemente in der 410 bp großen Sequenz.

Expressionsanalyse durch Northern-Blot-Hybridisierung:

Mit der NAPOR-Hybridisierungssonde wurde ein kommerzieller Northern-Blot aus verschiedenen kardiovaskulären Geweben hybridisiert (clontech Cat.# 7791-1). In allen Geweben wurde ein identisches Hybridisierungsmuster erhalten. Das Hauptsignal hat eine Größe von etwa 6 kb. Daneben sind noch vier weitere Signale (9 kb, 5 kb, 4 kb und 1,5 kb) mit geringerer Intensität zu identifizieren (Abb. 13), bei denen es sich wahrscheinlich um verschiedene Isoformen des Gens handelt.

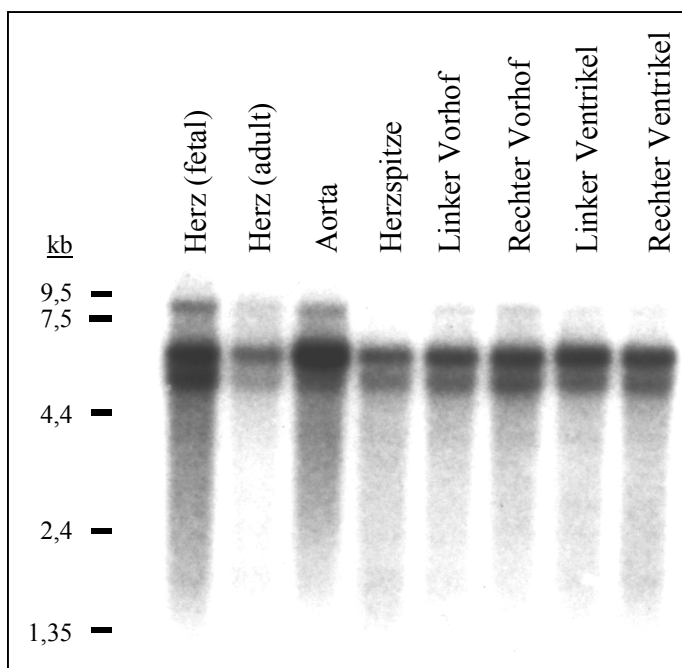


Abbildung 13: Kardiovaskulärer Northern-Blot (Clontech).

Der Blot wurde mit einer NAPOR-Sonde aus dem 3' UTR des Gens hybridisiert. Starke Signale sind bei 6 kb und 5 kb zu sehen, schwächere Signale sind bei 9 kb, 4 kb und 1,5 kb zu identifizieren.

Expressionsanalyse durch In-situ-Hybridisierungen:

Zur Isolierung einer RNA-Hybridisierungssonde über In-vitro-Transkription wurde das PCR-Produkt in den RNA-Transkriptionsvektor pGEM-T (Promega) kloniert. Die Orientierung des klonierten PCR-Produkts im Vektor wurde durch Sequenzierung mit den Vektorprimern T7 und SP6 bestimmt. Die RNA-Sonden wurden in vitro mit der SP6-RNA-Polymerase (*Antisense*-Sonde) bzw. der T7-RNA-Polymerase (*Sense*-Sonde) hergestellt. Als Markierung für die Sonden diente ³⁵S-UTP. Es wurden Embryoschnitte der Carnegie-Stadien C10, C12, C14, C16 und C18 hybridisiert. Außerdem wurden Präparate von Foeten der Schwangerschaftswochen 8, 9, 15 und 18 (p. c.) hybridisiert. Die dargestellten Organstrukturen variierten bei den eingesetzten Schnitten. Als Kontrolle wurde bei allen Schnitten neben der *Antisense*-Sonde auch die *Sense*-Sonde hybridisiert. Die Ergebnisse der Expressionsstudien sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefaßt.

Tabelle 14: Expression von NAPOR während der Embryogenese.

Carnegie-Stadium	Alter des Embryos	Expression
C10	22-23 Tage	-
C12	26-30 Tage	Urnieren (Mesonephros)
		Myotom
		dorsale Ganglien
C14	31-35 Tage	Myotom
		dorsale Ganglien
C16	37-42 Tage	Neuralrohr
		distale Segmente der Gliedmaßen
		Ohr- und Augenanlagen
		dorsale Ganglien
C18	44-48 Tage	Thymus
		Myotom
		Neuralrohr
		distale Segmente der Gliedmaßen
		Ohr- und Augenanlagen
		dorsale Ganglien
externe Muskelschicht des Darms		

Die Auswahl der Schnitte richtete sich an die beim DiGeorge-Syndrom betroffenen Strukturen, insbesondere dem entwickelnden Herzen und Thymus. Die abgebildeten Organe waren abhängig von den ausgewählten Schnitten und sind in keinem Entwicklungsstadium vollständig erfaßt

Table 15: Expression von NAPOR im Foetus.

Alter des Foetus	Expression
8. Woche (p. c.)	Thymus
	neurale Retina
	Enzephalon
9. Woche (p. c.)	Herz
	Thymus
	Lunge
	Niere
	externe Muskelschicht des Darms
	externe Muskelschicht des Magens
15. Woche (p. c.)	neurale Retina
	Großhirnrinde
	Hippokampus
	Rückenmark (dorsale Hörner)
	Niere (Nephron)
18. Woche (p. c.)	neurale Retina
	Großhirnrinde
	Rückenmark (dorsale Hörner)
	Niere (Nephron)
	Thymus

Die Auswahl der Schnitte richtete sich an die beim DiGeorge-Syndrom betroffenen Strukturen, insbesondere dem entwickelnden Herzen und Thymus. Die abgebildeten Organe waren abhängig von den ausgewählten Schnitten und sind in keinem Entwicklungsstadium vollständig erfaßt. p. c. - post conceptionem.

Eine Expression des NAPOR-Gens wurde ab dem Carnegie-Stadium C12 in der Urniere, im Myotom, im Neuralrohr, in den proximalen und distalen Segmenten der entwickelnden Gliedmaßen, in den Ohr- und Augenanlagen, im Thymus, in der externen Muskelschicht des Darms und in den dorsalen Ganglien beobachtet. Im Herz konnte praktisch keine NAPOR-Expression nachgewiesen werden (Abb. 14a-d). Die Kontrollhybridisierungen mit der *Sense*-Sonde ergaben mit einer Ausnahme (pigmentierte Retina, Abb. 14d) keine spezifischen Signale. Die Organe wurden durch eine Hämalaun-Eosinfärbung (H&E) sichtbar gemacht. Die Hybridisierungssignale heben sich durch ihre helle Färbung in den Autoradiogrammen von der Umgebung ab.

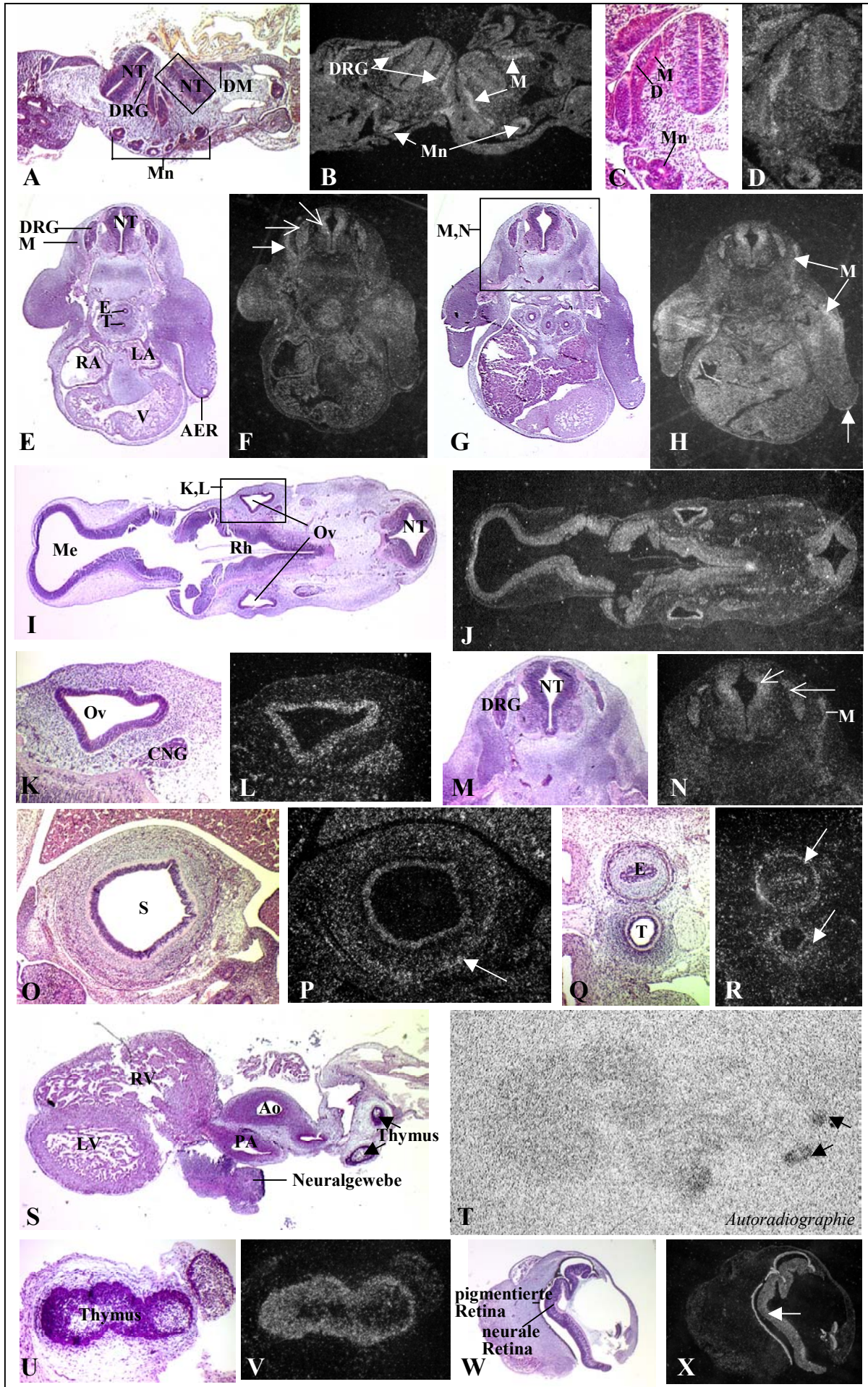


Abbildung 14a: NAPOR-Expression während der Embryogenese.

Dargestellt sind die H&E-Färbungen und die dazugehörigen In-Situ-Hybridisierungen mit der NAPOR-Antisense-Sonde.

A-D: Carnegie-Stadium C12 (26-30 Tage): Expression im Myotom (M), in den dorsalen Ganglien (DRG) und im Mesonephros (Mn).

E-N: Carnegie-Stadium C16 (37-42 Tage): Expression im Neuralrohr (NT), in den dorsalen Ganglien (DRG) und den cranialen Ganglien (CNG), im Myotom, in den proximalen (migrierende Myotomzellen (M)) und distalen (AER) Gliedmaßenknospen, im Enzephalon (Rh, Me) und im Ohrbläschen (Ov).

O-R: Carnegie-Stadium C18 (44-48 Tage): Expression im Ösophagus (E), im Magen (S) und im Bereich der Trachea (T).

S-X: 8. Woche (p.c.): Expression im Thymus und in der Retina.

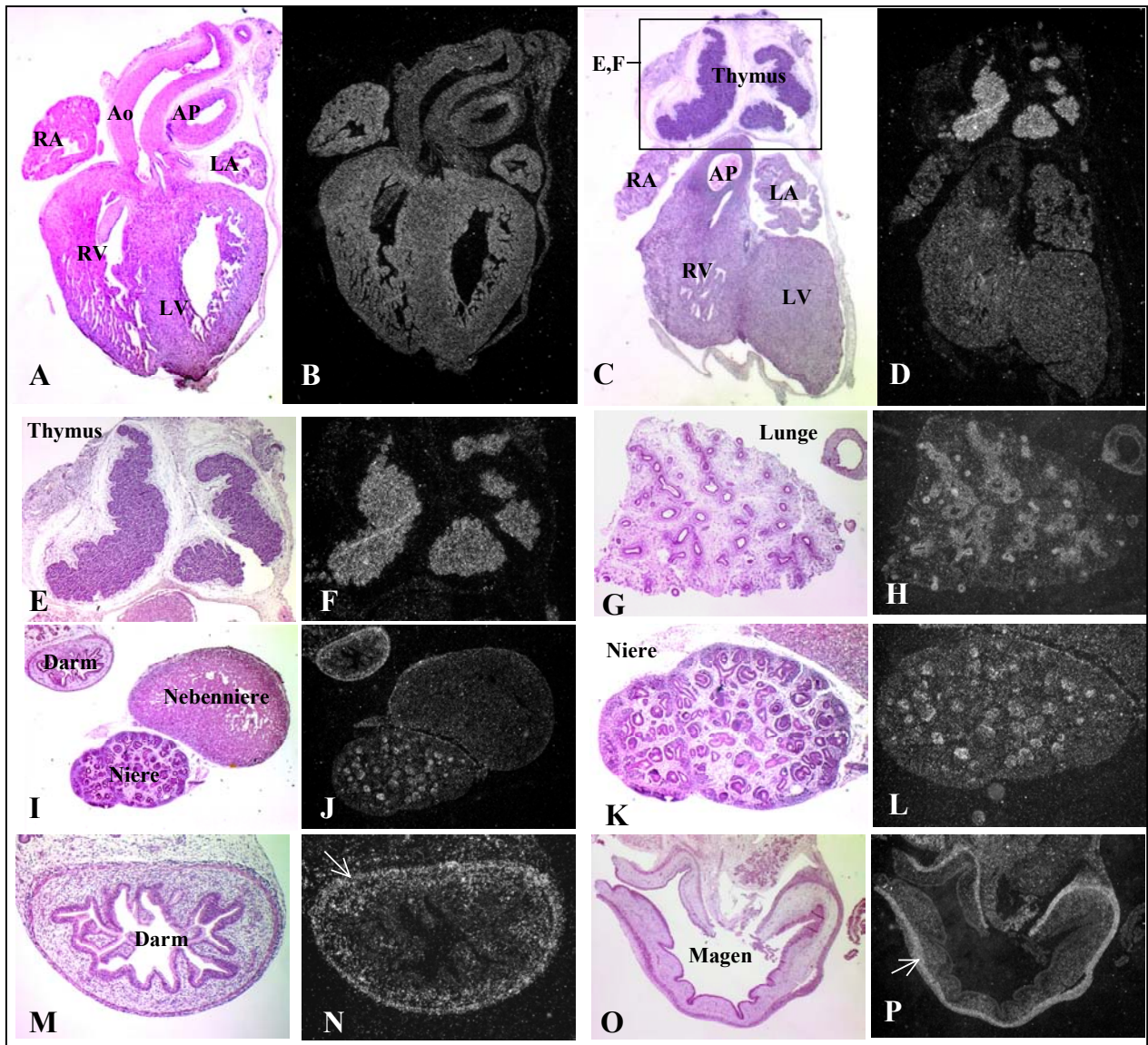


Abbildung 14b: NAPOR-Expression in einem humanen Foetus der 9. Woche (p.c.).

Dargestellt sind die H&E-Färbungen und die dazugehörigen In-Situ-Hybridisierungen mit der NAPOR-Antisense-Sonde.

A-D: Frontaler Schnitt des Herzens. Expression im Herzen in beiden Ventrikeln und Aurikeln (nicht aber in den großen Gefäßen) und im Thymus (E,F: Vergrößerung von C,D).

G,H: Expression in den Bronchialknospen der Lunge.

I,J: Expression in den Nephronen der Niere und in der äußeren Muskelschicht des Darms (K,L und M,N: Vergrößerungen von I,J).

O,P: Expression in der äußeren Muskelschicht des Magens.

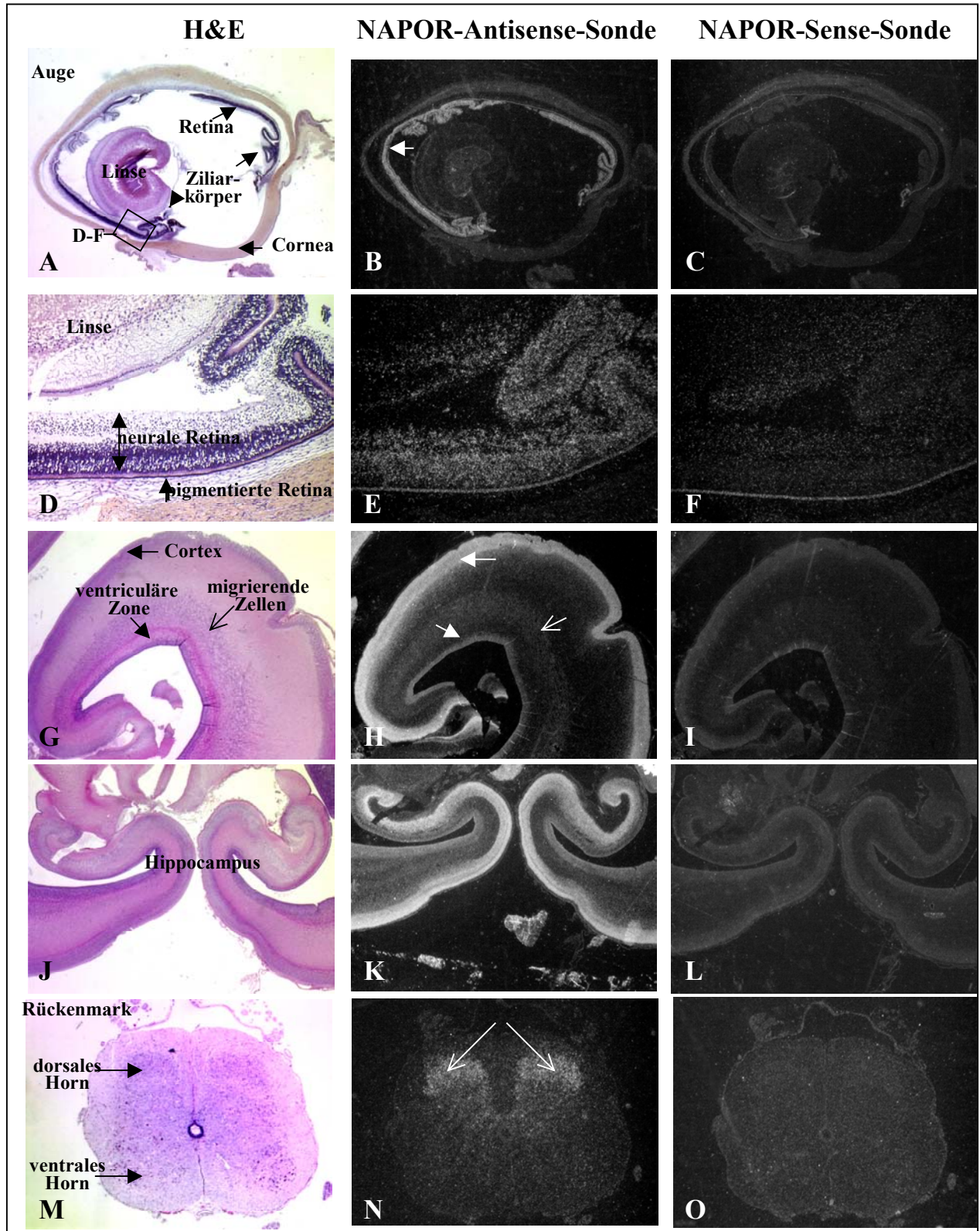


Abbildung 14c: NAPOR-Expression in einem humanen Foetus der 15. Woche (p.c.).

Dargestellt sind die H&E-Färbungen und die dazugehörigen In-Situ-Hybridisierungen mit der NAPOR-Antisense-Sonde und der NAPOR-Sense-Sonde als Negativkontrolle (C,F,I,L,O).

A-C: parasagittaler Schnitt durch das Auge: Expression in der neuralen Retina.

D-F: Vergrößerung von A-C (falsch positives Signal in der pigmentierten Retina).

G-I: Expression im Cortex und der ventriculären Zone.

J-L: frontaler Schnitt durch den Hippocampus. Expression im Hippocampus.

M-O: transversaler Schnitt durch das Rückenmark: Expression in den dorsalen Hörnern.

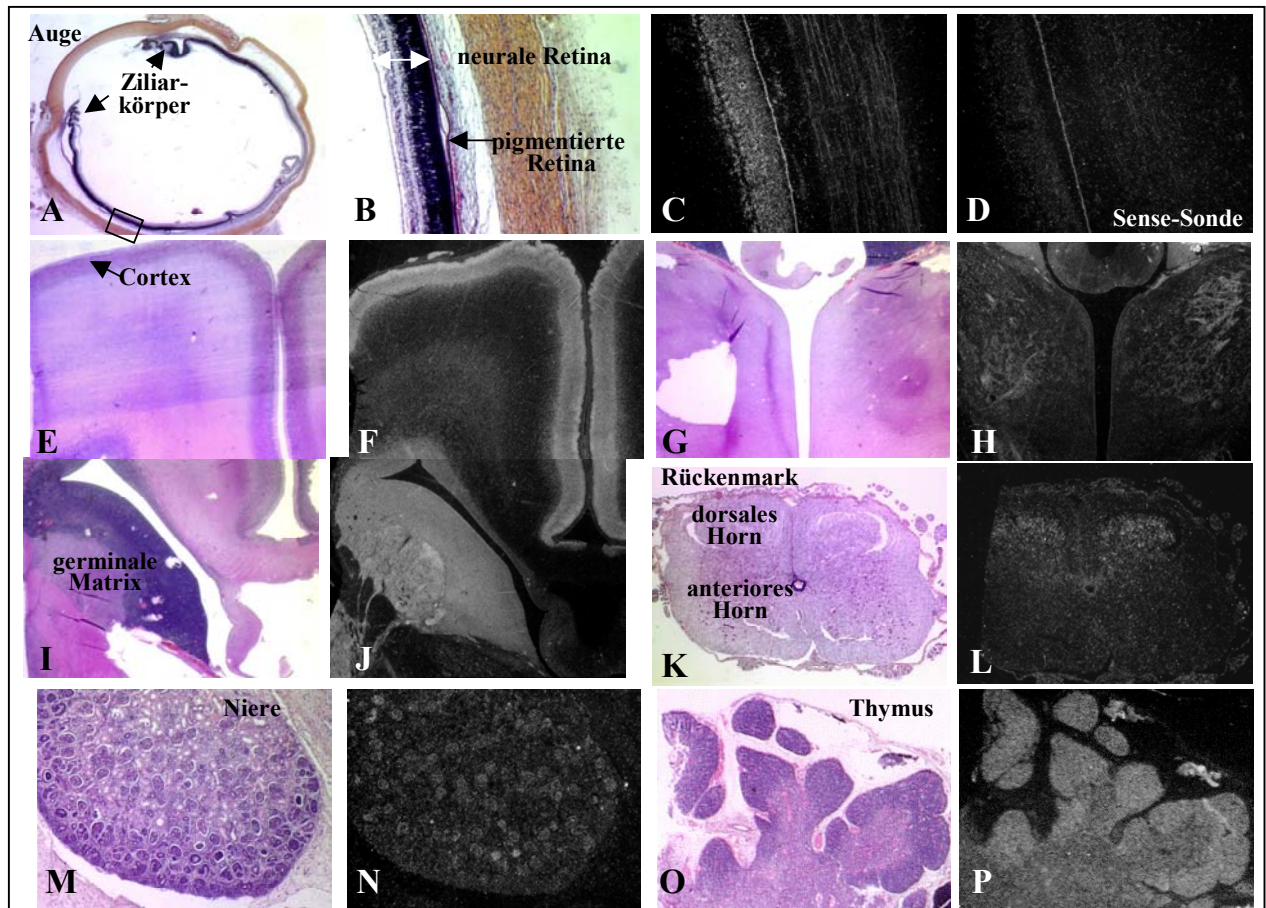


Abbildung 14d: : NAPOR-Expression in einem humanen Foetus der 18. Woche (p.c.).

Dargestellt sind die H&E-Färbungen und die dazugehörigen In-Situ-Hybridisierungen mit der NAPOR-Antisense-Sonde.

A-D: parasagittaler Schnitt durch das Auge: Expression in der neuralen Retina (B-D: Vergrößerungen von A).

E-J: frontaler Schnitt durch die cerebrale Hemisphäre: Expression im gesamten cerebralen Cortex, in den basalen Ganglien und in der germinalen Matrix.

K,L: transversaler Schnitt durch das Rückenmark: Expression in den dorsalen Hörnern.

M,N: Expression in den Nephronen der Niere.

O,P: Expression im Thymus.

3.5.1.2. Bestimmung der genomischen Struktur von NAPOR

Die genomische Struktur des Gens wurde *in silico* durch Vergleich der bekannten cDNA-Sequenzen mit der genomischen Sequenz der Region (Contig NT_008698.1) bestimmt. Die Suche mit der cDNA in der EMBL-Datenbank identifizierte drei Isoformen des Gens, NAPOR-1, -2 und -3. Zusätzlich wurde das Gen ETR-3 gefunden, das jedoch mit NAPOR-2 identisch ist. Alle Isoformen bestehen aus 13 Exons. Der Hauptunterschied der drei Isoformen liegt in den jeweils 1. Exons, die untereinander keine Sequenzähnlichkeiten aufweisen und unterschiedliche potentielle Translationsstartpunkte besitzen. Der Translationsstartpunkt von NAPOR-1 liegt dabei nicht im Exon 1 sondern im Exon 2 (Abb. 15).

NAPOR-1	AGCCAGGGTAGGGCTGATAAGGCGCTGATGCGTTGATGGCAGCCTTGCAGAGC	
NAPOR-2		
NAPOR-3		
NAPOR-1	TAGACCTGCACTTAACTTGCAGCTGCCTCCCGAGCCTCCAAGATGTCCACGCC	
NAPOR-2		
NAPOR-3		CGACTGTGGCATTGATGTTTTGA
NAPOR-1	CTGGGTGACAGGCGGCAGGGCGCTGCCCGTGTCTCCCCGGCTCTGCTCGACA	
NAPOR-2		<i>CCGGCCGGAATTCCGGCTGGATTTCTT</i>
NAPOR-3	GCATACTTCTGAACTGGCTTTTGTGAGACTATCAGTATAGAAGCATGCGCTG	
NAPOR-1	GCAGCACGCAGTGAGAGCCTCGCCGCCCGAGGAGCAACTCATG	TAACGG
NAPOR-2	CCCGGACATGACGGTCGAGGGCCGCTGCTCGTTCCTGACAGAAT	TAACGG
NAPOR-3	TCCCAAATCCGCTGTTACTATGAGAAATGAAGAGCTGCTTTTAAG	TAACGG

Abbildung 15: cDNA-Sequenzen der Exons 1 in den NAPOR-Isoformen NAPOR-1-3.

Die Sequenzen der Exons 1 zeigen bei den drei NAPOR-Isoformen keine Ähnlichkeiten. Der Beginn des Exons 2 ist fett hervorgehoben. Potentielle Translationsstartpunkte sind unterstrichen (der Translationsstartpunkt von NAPOR-1 liegt im Exon 2). Die cDNA-Sequenz der ersten 15 Basenpaare des Exons 1 von NAPOR-2 weicht von der genomischen Sequenz ab (kursiv hervorgehoben).

Zwei weitere Unterschiede betreffen eine 18 bp Deletion in Exon 11 von NAPOR-3, was zu einem Verlust von sechs Aminosäuren im Protein führt. Daneben besitzt NAPOR-3 eine 1359 bp Insertion im 3'UTR des Exons 13. Die drei Isoformen NAPOR-1, -2 und -3 kodieren für Proteine mit 490, 509 bzw. 508 Aminosäuren. Die Basen 1-15 des 1. Exons von NAPOR-2 wurden in der genomischen Sequenz nicht gefunden. Bei allen anderen Exons wurden keine Sequenzabweichungen zwischen cDNA-Sequenz und genomischer Sequenz beobachtet. Das Gen überspannt eine genomische Region von über 550 kb. Dies liegt zum großen Teil an fünf besonders großen Introns von 32.786 kb Länge bis zu 265.632 kb Länge. Das Intron zwischen Exon 1C und Exon 2 ist mit 168 bp das kürzeste. Die Größe der übrigen acht Introns liegt im Bereich von 2471 bp und 8827 bp. Die Sequenzen aller Exon-Intron-Übergänge sind in

Übereinstimmung mit der AG-GT-Consensus-Sequenz. Tabelle 16 und Abbildung 16 fassen die Ergebnisse der Exon-Intron-Struktur zusammen.

Tabelle 16: Genomische Struktur des Gens NAPOR.

Exon	Position (NAPOR-1)	Länge (nt)	Intron	Länge (nt)
1A	1-120 (NAPOR-3)	120	1A	160 041
1B	16-72 (NAPOR-2)	72	1B	147 33
1C	1-204	204	1C	168
2	205-401	197	2	51 779
3	402-484	83	3	32 786
4	485-533	49	4	8827
5	534-668	135	5	8722
6	669-748	80	6	3985
7	749-907	159	7	4231
8	908-971	64	8	2471
9	972-1106	135	9	265 632
10	1107-1226	120	10	6938
11	1227-1424	198 (NAPOR-3: 180)	11	4446
12	1425-1568	144	12	2944
13	1569-5644	4076 (NAPOR-3: 5434)		

Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die Positionen der Exon-Intron-Grenzen auf die Isoform NAPOR-1 (GenBank: AF036956).

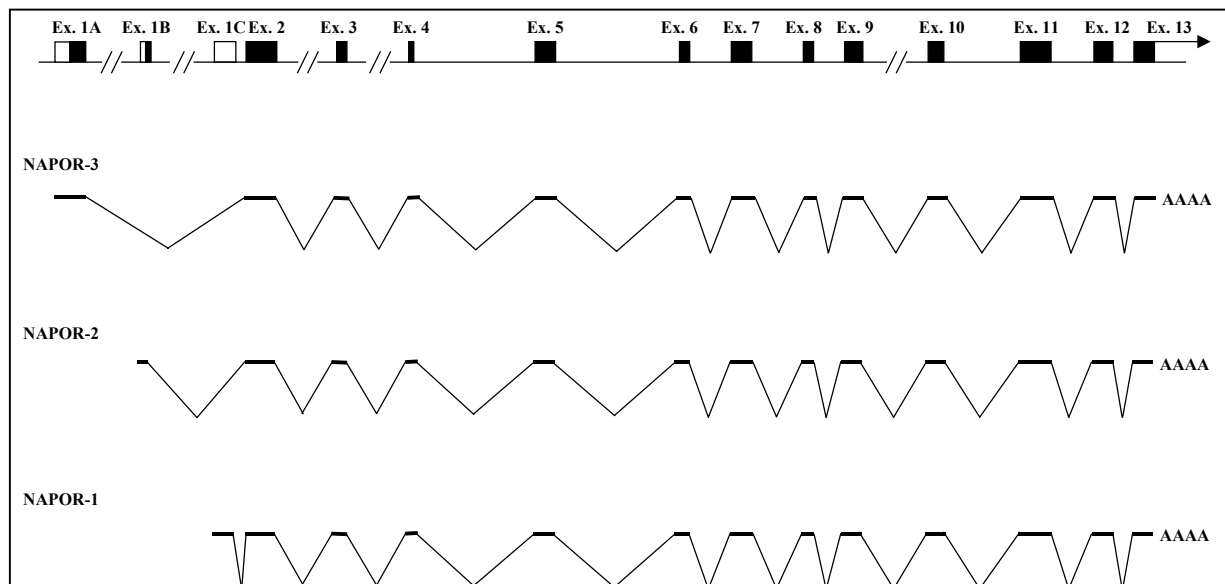


Abbildung 16: Exon-Intron-Struktur der drei Isoformen des NAPOR-Gens. Schwarze Vierecke bezeichnen kodierende Regionen, weiße Vierecke bezeichnen nicht kodierende Regionen.

3.5.1.3. Mutationsanalyse des NAPOR-Gens

Es wurden 109 Patienten auf Mutationen im NAPOR-Gen untersucht. Die meisten Patienten wurden aufgrund ihres Phänotyps in das DGS/VCFS-Spektrum eingeordnet und hatten fast immer einen angeborenen Herzfehler. Eine Deletion des DGS-Hauptlocus auf 22q11 war in allen Patienten ausgeschlossen worden. Ein Teil der Patienten wurde früher schon auf Mutationen in Genen aus der 22q11-Deletionsregion untersucht. Eine Mutation konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von Exon 1B wurden alle Exons des NAPOR-Gens mit PCR amplifiziert und mittels DHPLC (WAVE, Transgenomic) nach Sequenzvarianten untersucht. Die DHPLC-Bedingungen wurden über praktische Schmelzkurven und Computeranalyse (Wavemaker, Transgenomic) optimiert (Tab. 17). Bei einem auffälligen DHPLC-Muster wurde das Exon des entsprechenden Patienten erneut mit PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. In sieben der 14 untersuchten PCR-Fragmente (Exons mit benachbarten Intronsequenzen) wurden Sequenzvarianten identifiziert. Dabei handelte es sich um drei 1 bp-Austausche im kodierenden Teil des Gens, die keinen Aminosäureaustausch zur Folge hatten. In intronischen Regionen sowie im 5' UTR wurden sieben Varianten gefunden, davon fünf 1 bp-Austausche. Daneben wurde in einem Intron eine 1 bp-Deletion und im 5' UTR eine 1 bp-Insertion beobachtet. Bei allen Sequenzvarianten handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Polymorphismen. Tabelle 18 faßt die Ergebnisse der NAPOR-Mutationsanalyse in den 109 Patienten zusammen.

Tabelle 17: Bedingungen für die NAPOR-Mutationsanalyse mittels DHPLC (WAVE, Transgenomics).

Exon	Primer forward	Primer reverse	Größe (nt)	DHPLC
1A	CAG CAG ACA TCT AGC TCT GCC	GGC AAA GTG CCT AAT GAG TCG	297	(52-62)63 (51-61)65
1C	AGA GGG CGC GTT AGT GAG C	CAG CTC TAG AAA CTA GAA AAG CG	195	(51-61)57 (48-58)60 (43-53)62
2	CTT CCT GTC CCT CAT CGT GCC	CCA CCT GGA CGC CTG GCG	293	(54-64)62 (49-59)64 (39-49)67
3	AGC ATT CAC AGA AAT TTC TAA AAC C	TGA TTC TGG TAC AAA AGT AAA CCG	157	(48-58)57 (44-54)59
4	TCA ATC TGC CTT TAC TTT CTC CC	AGC AAG ACA GTT GGT TAC CAC C	111	(44-54)57 (44-54)58
5	GAA ATG GCC TTT GCT CAT TCG	AGC TCC AAT TAG CAC TGA AGG G	222	(51-61)58 (48-58)60 (45-55)62
6	GTT TAA CAA GCG TCC AAC CC	GAA AGG GCA GAT GAT ACA GTA C	176	(49-59)59 (46-56)61
7	TCC ACT TTC CAA TGT GTC TGA CC	AGT CAG TTT GCA GAG TTT CAG CG	243	(52-62)62 (50-60)64 (47-57)66
8	TCT CAC CAT CTC CAC TTT GCC	AGC ACG GTC AAA AGG AGA GGC	141	(47-57)61 (47-57)63 (43-53)65
9	TGC TGA AAG TAA CTT TCT CTT CCC	ACC TGC AAG GGA AGA GCA CCC	198	(51-61)61 (49-59)65
10	ACT CAC CTC GTG TCT TCT CTC CC	GAA GGC TGT CCA CCA GAG CAG C	212	(50-60)61 (48-58)62
11	TGC TGT TTC TCT TCT CTA TTG TTG GG	AGT GCT GCC TGT TGG GCT GGG	264	(52-62)66
12	ACT TTG GAA ACT AAG ACT CAA GGG	TGG GAA CCT ACT GCA ATA TAC TAG C	244	(53-63)57 (49-59)59
13	AGG CTG ACT CCC TCT CTC GG	ACT GGG TAG GGG AAG TGG G	330	(54-64)60 (52-62)61 (49-59)62

Die Primersequenzen sind von 5' nach 3' angegeben. In der Größe-Spalte ist die Länge des PCR-Produkts und in Klammern die Länge des kodierenden Teils des PCR-Produkts angegeben. Die letzte Spalte (DHPLC) zeigt die Laufbedingungen auf der DHPLC-Anlage (WAVE, Transgenomic). Die Zahlen in Klammern geben den Acetonitril-Gradienten an, die nachgestellte Zahl die Temperatur der Säule. Für alle Exons wurde die PCR mit AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) und einer Primeranlagerungstemperatur von 60°C durchgeführt.

Table 18: Sequenzvarianten im NAPOR-Gen.

Exon	Sequenzvarianten	Varianten/wt	%
1A	keine Varianten	0/109	-
1C	c.-133--132insC	19/90	17
	c.-172G>A	1/108	1
	c.-133--132insC+c.-172G>A	1/108	1
2	IVS2+6G>T	1/108	1
	IVS2+6G>A	1/108	1
3	keine Varianten	0/109	-
4	keine Varianten	0/109	-
5	c.345T>A	29/80	27
	c.348G>A	1/108	1
6	keine Varianten	0/109	-
7	IVS7+28C>A	3/106	3
8	keine Varianten	0/109	-
9	IVS9+10G>A	48/80	44
10	c.1165C>T	37/72	34
11	keine Varianten	0/109	-
12	IVS11-18del(T)	48/72	44
13	keine Varianten	0/109	-

Die Numerierung der Nukleotidposition in der Spalte Sequenzvarianten bezieht sich auf die cDNA-Sequenz der NAPOR-Isoform NAPOR-1 (GenBank: AF036956). Die Nomenklatur richtet sich nach den Empfehlungen der *Nomenclature Working Group* (Antonarakis 1998). Die Spalten Varianten/wt bzw. % geben die Häufigkeit der Varianten in absoluten Zahlen bzw. in Prozent wieder.

3.5.2. Identifizierung von Kandidatengenen aus der HDR1-Region

Distal von der DGCR2 wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Haploinsuffizienzregion für die Symptomenkombination Hypoparathyreoidismus, sensorineurale Taubheit und Nierenfehlbildungen (HDR-Syndrom) kartiert (HDR1-Region, Kapitel 3.1.4.).

3.5.2.1. Feinkartierung der kritischen HDR1-Region

Die Analyse von zwei HDR-Patienten mit polymorphen Markern und mit PAC- und BAC-Klonen mittels FISH identifizierte in beiden Fällen Mikrodeletionen auf 10p. Patient 5/99 (Van Esch et al. 1999) zeigte eine scheinbar balancierte komplexe Translokation t(8q;10p). Die FISH-Analyse mit dem YAC 927G5 zeigte jedoch nur ein Signal auf dem normalen Chromosom 10 und nicht auf dem derivaten Chromosom 10. Es lag daher in diesem Patienten eine kryptische 10p-Deletion vor. Der YAC 927G5 diente als Sonde zum Durchsuchen einer PAC-Bibliothek und anschließender Etablierung eines PAC/BAC-Contigs über die Deletionsregion (s. 3.2.2., S. 56f). Mit Hilfe von bruchpunktüberspannenden PAC-Klonen (PACs dJ29M21 und dJ119O21) konnten die Bruchpunkte genau kartiert werden. Die Größe

der Mikrodeletion im Patienten 5/99 wurde damit auf etwa 900 kb geschätzt. Bei dem zweiten HDR-Patienten handelt es sich um die Familie 23/91 mit einem autosomal dominanten Erbgang (Bilous et al. 1992). Eine Haplotyp-Analyse mit polymorphen Markern, die bei Patient 5/99 deletiert waren, zeigte auch hier bei den betroffenen Familienmitgliedern das Vorliegen einer Deletion. Die anschließende FISH-Untersuchung mit PAC- und BAC-Klonen aus dem Contig identifizierte bruchpunktüberspannende Klone. Die Größe der Deletion in dieser Familie wurde zu etwa 250 kb bestimmt. Die Mikrodeletionen in beiden Patienten 5/99 und 23/91 überlappten und ermöglichten damit die Eingrenzung der kritischen HDR1-Region auf etwa 200 kb (Abb. 17).

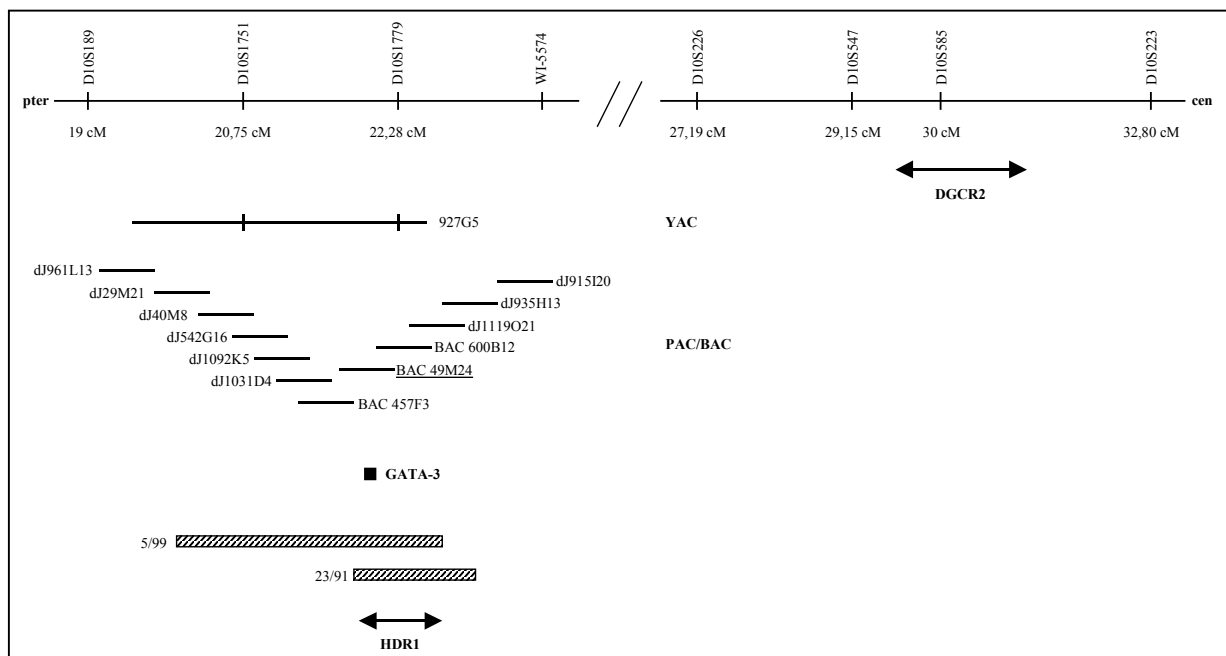


Abbildung 17: Eingrenzung der HDR1-Region.

In der Karte ist ein Ausschnitt des PAC/BAC-Contigs dargestellt. Der unterstrichene Klon BAC 49M24 wurde als FISH-Sonde bei Mikrodeletionsuntersuchungen eingesetzt. Die deletierten Chromosomenregionen der Patienten 5/99 und 23/91 sind als gestreifte Balken dargestellt. Die Haploinsuffizienzregion DGCR2 kartiert proximal zur HDR1-Region.

3.5.2.2. Identifizierung und Mutationsanalyse des Kandidatengens GATA-3

Die kritische HDR1-Region ist in der Region 10p14/15 lokalisiert. Dorthin sind nur wenige Gene kartiert worden, u.a. das Gen GATA-3 (Schuler et al. 1996). Es handelt sich um einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der in einer Vielzahl von embryonalen Geweben expremiert wird, darunter in den Parathyreoideae, dem Innenohr und der Niere. Dies machte GATA-3 zu einem guten Kandidatengen für das HDR-Syndrom. Über PCR konnte gezeigt werden, daß

GATA-3 auf BAC-Klonen aus der kritischen HDR1-Region lokalisiert ist. Mit einem BAC-Klon (BAC 49M24), der GATA-3 vollständig enthält, wurden die beiden Mikrodeletionsfälle 5/99 und 23/91 über FISH analysiert. Eine hemizygot Deletion wurde in beiden Fällen nachgewiesen. 11 weitere Patienten wurden mittels FISH auf Deletionen untersucht. In diesen Fällen konnte keine Deletion nachgewiesen werden. Zum Beweis einer direkten Beteiligung des GATA-3-Gens mit dem HDR-Syndrom wurde in diesen Fällen eine Mutationsanalyse initiiert. Alle fünf kodierenden Exons wurden über PCR amplifiziert und sequenziert bzw. über eine DHPLC-Anlage (WAVE, Transgenomic) analysiert (Tab. 19). In den drei Patienten 26/99, 3/99 und 12/99 wurden Mutationen gefunden (Tab. 20). Patient 26/99 besitzt eine 49 bp Deletion im Exon 3, die zu einer Leserasterverschiebung mit anschließendem vorzeitigem Stop führt. Patient 12/99 hat einen C nach T-Austausch im Exon 4, der zu einem Stop-Codon führt. Bei beiden Patienten wird ein verkürztes Protein gebildet. Bei Patient 3/99 wurde eine 12 bp-Deletion im Exon 5 gefunden, was einem Verlust von vier Aminosäuren im Protein entspricht. Alle drei Sequenzvarianten wurden in 110 Allelen von 55 gesunden Kontrollpersonen nicht gefunden. In den übrigen Patienten konnten außer zwei Polymorphismen in den Intronbereichen keine weiteren Mutationen nachgewiesen werden.

Tabelle 19: Bedingungen für die GATA-3-Mutationsanalyse mittels DHPLC (WAVE, Transgenomics).

Exon	Primer forward	Primer reverse	Größe (nt)	DHPLC
2a	CCG CGC TCC CGT GCG GGT CT	GGT CCG CCG TCA CTT CCA T	501 (19)	-
2b	CCC AGG CGG ACC GCC CTT C	TGG GGC TTT CGC TTG ACC TCT	421 (241)	-
3a	ACA CTC ACC CTC CTT CTC TCT CC	TGG GGT GGA CAG CGA TGG GTC CG	316 (269)	-
3b	CGC ACC TCT TCA CCT TCC C	AGG CTC CAG GGA AGA GCT GGC	363 (336)	-
4	GTG TTT TCC TTC CCT AAG TGG C	TGG TCA GCA TGG AAT CCA TCC C	227 (143)	(49-59)63 (46-56)65 (42-52)67
5	GAT TTC ACC CTC TCC TCT CTC CC	TGG TCA CCA TCA GGA AGC GAG CC	209 (126)	(50-60)62 (47-57)64
6	AGA GCC TGT GCA TTT CAG AGG C	CTG TGA GCA TCG AGC AGG GC	372 (285)	(54-64)59 (50-60)65 (47-57)67

Die Primersequenzen sind von 5' nach 3' angegeben. In der Größe-Spalte ist die Länge des PCR-Produkts und in Klammern die Länge des kodierenden Teils des PCR-Produkts angegeben. Die letzte Spalte (DHPLC) zeigt die Laufbedingungen auf der DHPLC-Anlage (WAVE, Transgenomic). Die Exons 2 und 3 wurden sequenziert. Die Zahlen in Klammern geben den Acetonitril-Gradienten an, die nachgestellte Zahl die Temperatur der Säule. Für alle Exons wurde die PCR mit der AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) und einer Primeranlagerungstemperatur von 60°C durchgeführt.

Table 20: Varianten im GATA-3-Gen in HDR-Patienten.

Familie/Patient	Phänotyp	Lokalisation	Mutation	Aminosäureaustausch
5/99	H, D, R	D10S1751- D10S1779	900 kb Deletion	Deletion eines Allels
a.d. Familie 23/91 (4 Betroffene)	H, D, R	D10S1779	250 kb Deletion	Deletion eines Allels
26/99	H, D, R	Exon 3	465-513 Deletion	Leserahmenverschiebung 156- 177, 178 Stop
3/99	H, D, R	Exon 5	946-957 Deletion	Deletion der Codons 316-319, Verlust von vier Aminosäuren (TSCA)
12/99 (2 Patienten)	H, D	Exon 4	828 C-T	R277X

H - Hypoparathyreoidismus, D - sensorineurale Taubheit, R - Nierenfehlbildung. Die Nukleotid- und Aminosäurepositionen beziehen sich auf die GATA-3-cDNA-Sequenz (Genbank Acc. No. X55122). a.d. – autosomal dominanter Erbgang; die Familie 23/91 wurde von Bilous et al. beschrieben (Bilous et al. 1992).

3.6. De novo Deletion (14)(q11q13) in zwei Patienten: PAX-9 und TTF-1 als DiGeorge-Syndrom-Kandidatengene

Der homozygote Verlust von Pax9 in Mäusen führt zu einer Vielzahl von Fehlbildungen, darunter eine Aplasie des Thymus und der Nebenschilddrüsen (Peters et al. 1998). Damit ähnelt der Maus-Phänotyp dem DiGeorge-Syndrom beim Menschen. Es ist daher zu vermuten, daß ein Verlust des humanen PAX-9-Gens beim Menschen ebenfalls einen DiGeorge-Syndrom-Phänotyp verursachen kann. Das humane PAX-9 wäre demnach ein DiGeorge-Syndrom-Kandidatengene. PAX-9 wurde in die Region 14q12-13 kartiert (Stapleton et al. 1993). Im Rahmen dieser Arbeit sind zwei Patienten (SAN, MAL) molekulargenetisch untersucht worden, die auf Chromosom 14q in diesem Bereich interstitielle Deletionen aufwiesen.

3.6.1. Molekulargenetische Eingrenzung der 14q-Deletionen in den Patienten SAN und MAL

Die Patienten SAN (Schuffenhauer et al. 1999) und MAL zeigen beide ein komplexes Fehlbildungs-/Retardierungssyndrom. Chromosomenanalysen aus peripheren Lymphozyten ergaben den Karyotyp 46,XX,del(14)(q11.2q13). Die elterlichen Karyogramme waren normal. Von den Patienten SAN und MAL stand sowohl Patienten-DNA als auch DNA der Eltern für molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung. Die Eingrenzung der Deletionen erfolgte durch die Analyse polymorpher Marker des Chromosoms 14q. Die

Marker mit den entsprechenden Primerpaaren wurden der Whitehead-Karte (Dib et al. 1996) entnommen. Bei Patient SAN wurden sieben, bei Patient MAL wurden 13 Marker getestet. Sowohl SAN als auch MAL haben eine interstitielle de novo Deletion 14q paternalen Ursprungs. Der proximale Bruchpunkt in Patient SAN kartiert in das 4,3 cM Intervall zwischen D14S264 und D14S80, der distale Bruchpunkt kartiert in das 3,4 cM Intervall zwischen D14S70 und D14S75. SAN besitzt demnach eine etwa 16 cM (12,3 cM - 20 cM) große interstitielle Deletion. Die Deletion in Patient MAL liegt zwischen dem proximalen Intervall D14S80-D14S1034 (4,7 cM) und dem distalen Intervall D14S1057-D14S980 (4,0 cM). Sie ist mit einer Größe von etwa 26 cM größer als die Deletion von SAN. Beide Deletionen überlappen im proximalen Bereich, wobei die Deletion von MAL etwa 12 cM weiter Richtung Telomer reicht als die Deletion von SAN (Abb. 18).

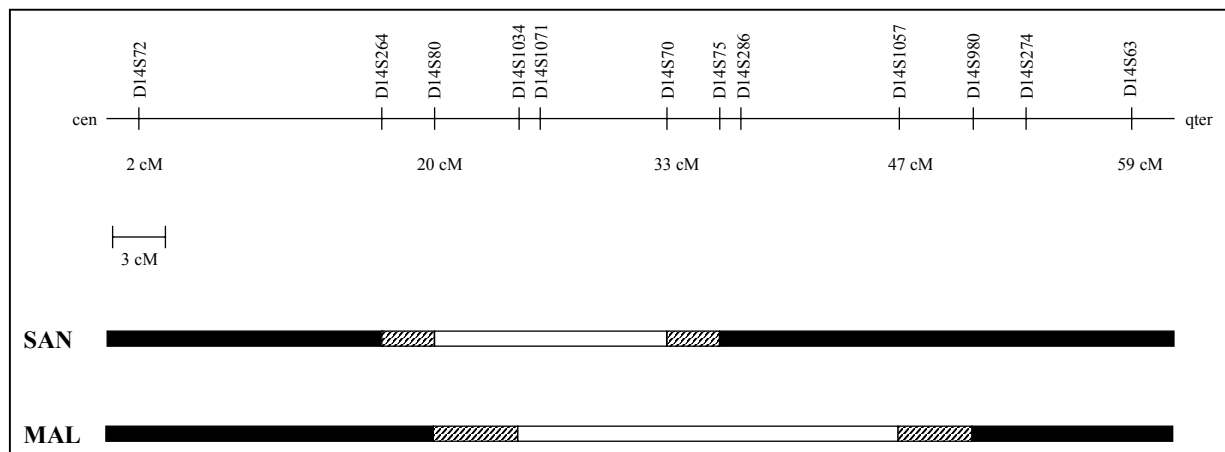


Abbildung 18: Kartierung der interstitiellen 14q-Deletionen der Patienten SAN und MAL. Deletierte Chromosomenregionen sind als weiße Balken, nicht deletierte Chromosomenregionen sind als schwarze Balken dargestellt. Die Bruchpunkte kartieren in die als gestreifte Balken gezeichneten Regionen.

3.6.2. Deletionsanalysen der Gene PAX-9 und TTF-1 bei den Patienten SAN und MAL

Die Patienten wurden mit FISH auf Deletionen in den Genen PAX-9 und TTF-1 untersucht. Für PAX-9 wurden PAC-Klone aus einer PAC-Bibliothek isoliert. Als Sonde diente ein 227 bp großes PAX-9 spezifisches PCR-Produkt aus der 5'Region der kodierenden Sequenz, welches durch Amplifikation aus genomischer DNA gewonnen wurde. Die folgenden Primer wurden eingesetzt:

PAX-9F: 5'-GCT GTG TGT TCA TTT TGC AGA GCC A-3'

PAX-9R: 5'-TGG CTC CTG GCA AGA TCG AGC CC-3'.

Hybridisiert wurde die auf Filtern aufgetragene PAC-Bibliothek des Ressourcenzentrums des deutschen Humangenomprojekts, bei der es sich um eine Kopie der RPCII, 3-5 PAC-Bibliotheken von P. de Jong handelte. Die folgenden fünf positiven PAC-Klone wurden identifiziert und vom Ressourcenzentrum bezogen: RPCIP704C14833, RPCIP704K12630, RPCIP704J18615, RPCIP704M22554 und RPCIP704B02531. Alle Klone waren in einer PCR mit den PAX-9F/PAX-9R-Primern positiv. Bei vier Klonen (RPCIP704C14833, RPCIP704K12630, RPCIP704M22554, RPCIP704B02531) wurde mit einer Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung die chromosomale Lokalisation bestimmt. Alle vier PAC-Klone gaben ausschließlich Signale auf Chromosom 14q12-13. Chromosomenpräparationen des Patienten SAN wurden mit den drei PAX-9-PAC-Klonen RPCIP704K12630, RPCIP704M22554 und RPCIP704B02531 hybridisiert. In allen drei Fällen wurden Signale nur auf dem intakten Chromosom 14q detektiert, nicht aber auf dem deletierten Chromosom 14. Die Chromosomen des Patienten MAL wurden mit dem PAX-9-PAC-Klon RPCIP704M22554 hybridisiert. Auch hier zeigte die Sonde nur Signale auf dem intakten Chromosom 14q. Auf dem deletierten Chromosom 14q wurden keine Signale beobachtet. Beide Patienten sind somit für PAX-9 hemizygot. Zur Bestätigung wurde beim Patienten SAN auch eine Gendosis-Analyse durchgeführt. Es wurde ein quantitativer Southern-Blot (Dosisblot) hergestellt, in dem DNA des Patienten SAN, DNA seiner Eltern und zwei Kontroll-DNAs mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten wurden. Der Blot wurde mit einer 1,1 kb langen PAX-9 cDNA-Sonde (Schenkung von H. Peters, GSF Neuherberg) hybridisiert. Bei der Sonde handelte es sich um den fast vollständigen kodierenden Teil des PAX-9-Gens. Die Sonde detektierte eine 6 kb-Bande, die beim Patienten SAN eine deutlich geringere Intensität aufwies als bei den Eltern und den beiden Kontroll-DNA-Proben (Abb. 19). Die Gendosis-Analyse bestätigte damit das Ergebnis der FISH-Untersuchung.

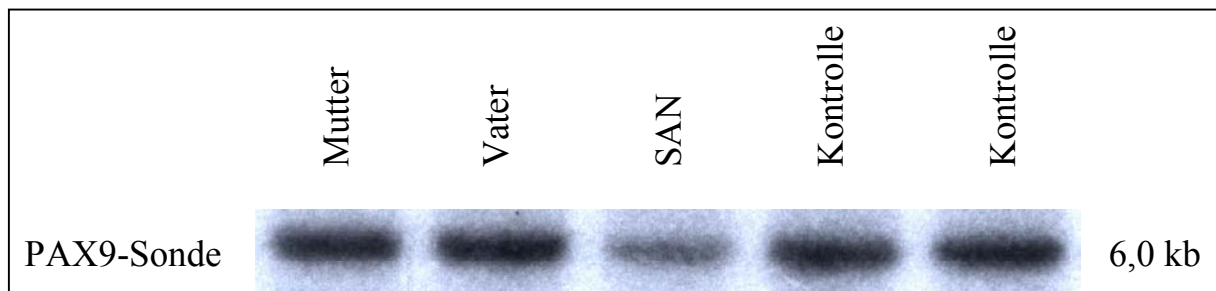


Abbildung 19: Gendosisanalyse des PAX-9-Gens.

Patient SAN zeigt eine verminderte Dosis des 6,0 kb großen EcoRI-Fragments, das mit einer PAX-9-cDNA-Sonde detektiert wird. Die Eltern und zwei unabhängige nicht verwandte Kontrollpersonen haben eine normale Gendosis. Die aufgetragene DNA-Menge wurde anhand einer Ethidiumbromidfärbung und einer Kontrollhybridisierung mit einer Sonde aus 10p bestimmt und war in allen Spuren annähernd gleich (Daten nicht gezeigt).

Eine Haploinsuffizienz von TTF-1 könnte bei den beiden Patienten SAN und MAL für die Ausprägung ihres Phänotyps mitverantwortlich sein. Es wurde daher in einem FISH-Experiment untersucht, ob SAN und MAL auch für TTF-1 deletiert sind. Als Sonde wurde ein Cosmid verwendet, das das Gen TTF-1 enthielt (K. Devriendt, Leuven, Belgien). Die Hybridisierung zeigte bei beiden Patienten nur Signale auf dem intakten Chromosom 14q. Auf dem deletierten Chromosom waren keine Signale zu beobachten. Es liegt daher sowohl bei SAN als auch bei MAL eine Hemizygotie für das Gen TTF-1 vor.

4. Diskussion

4.1. Kartierungsarbeiten auf Chromosom 10p

Die Bruchpunkte bei Patienten mit partieller Monosomie 10p wurden mit Hilfe von FISH eingegrenzt. Mit dem Beginn der Bruchpunktkartierung wurden genomische Karten veröffentlicht, in denen fast das gesamte Genom mit einzelnen überlappenden YAC-Klonen kartiert worden war (Chumakov et al. 1995; Dib et al. 1996). Diese Karten erwiesen sich als sehr hilfreich, da die Isolierung genomischer Klone aus Bibliotheken von da an nicht mehr nötig war. Die kartierten YAC-Klone konnten direkt aus den Karten ausgewählt und von Ressourcenzentren bezogen werden, um damit über FISH die Bruchpunktregionen in den Patienten zu bestimmen. YAC-Klone haben den Vorteil, sehr große Inserts zu besitzen (mehrere 100 kb bis zu weit über 1 Mb). Damit waren verhältnismäßig wenig YAC-Klone nötig, um das über 3 Milliarden Basenpaar große humane Genom abzudecken. Das war auch bei der hier durchgeführten Bruchpunktkartierung von Vorteil, da mit wenigen YAC-Klonen eine große Region auf 10p abgedeckt wurde und sich damit die Anzahl der FISH-Experimente in Grenzen hielt. Mit 90 Hybridisierungsexperimenten konnten 15 Deletionspatienten charakterisiert werden. Es war jedoch nur bei einem Patienten möglich, anhand eines bruchpunktüberspannenden YAC-Klons den Bruchpunkt auf einen bestimmtem genomischen Klon zu kartieren. Bei den 14 anderen Patienten konnten keine Intensitätsunterschiede bei der Hybridisierung zwischen deletiertem und intaktem Chromosom 10p festgestellt werden. Dies kann zum einen daran gelegen haben, daß die Bruchpunkte in Regionen lagen, die nicht mit den YAC-Klonen abgedeckt wurden, oder zum anderen daß die Bruchpunkte in den einzelnen YAC-Klonen so am Rand lagen, daß mit der FISH-Methode keine Signalintensitätsunterschiede auszumachen waren. Beide Möglichkeiten trafen wahrscheinlich zu, da die Bruchpunkte einiger Patienten mit überlappenden YAC-Klonen kartiert wurden und daher zumindest ein Klon den Bruchpunkt überspannen sollte, während bei anderen Patienten die Bruchpunkte mit YAC-Klonen bestimmt wurden, die keine Überlappung aufwiesen. Dem Vorteil ihrer Größe steht auch ein bekannter Nachteil gegenüber. YAC-Klone sind nicht stabil, d.h. sie weisen Deletionen und andere Strukturveränderungen auf. Damit spiegeln sie in vielen Fällen nicht die wahre genomische Situation wider. Dies wurde in dieser Studie bestätigt. Von den 38 über FISH charakterisierten YAC-Klonen, waren knapp die Hälfte chimär. Sie zeigten neben Signalen auf Chromosom 10p, wo sie laut Karte hinkartiert worden waren, auch Signale auf anderen Chromosomen. Z.T. wurden bei einzelnen Klonen

Hybridisierungssignale auf fünf verschiedenen Chromosomen identifiziert. Dieses Problem war der Grund dafür, daß von 38 getesteten YAC-Klonen nur 15 bei der Deletionskartierung zum Einsatz kamen. Für den Bereich 10p erwies sich die YAC-Karte dennoch als zuverlässig, da nur drei YAC-Klone kein Signal auf 10p zeigten. Bei 92 % der Klone konnte ein Signal auf 10p nachgewiesen werden, wenngleich bei fast der Hälfte davon auch Kreuzhybridisierungssignale auf anderen Chromosomen auftraten.

Für weiterführende Arbeiten, insbesondere der Identifizierung von Kandidatengenen, waren die YAC-Klone aus den oben genannten Gründen nicht zuverlässig genug. Eine genomische Karte aus kleinen bakteriellen Klonen (PAC- bzw. BAC-Klone) war zu dieser Zeit jedoch noch nicht verfügbar. Es wurde daher begonnen über die zuerst identifizierte Haploinsuffizienzregion DGCR2 ein PAC-Contig zu etablieren. Dies war möglich, da die PAC-Bibliotheken RPCII,3-5 (Ioannou und de Jong 1996) kurze Zeit vorher allgemein verfügbar gemacht wurden. Die Bibliotheken lagen sowohl in Form von PCR-Pools als auch in Form von Filtern vor. Sie wurden mit STS-Markern durchsucht, die in die Nähe der Region DGCR2 kartiert worden waren. Es wurden 14 Marker aus der genetischen Karte des Whitehead Instituts (http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/phys_map) für die Durchsuchung der Bibliotheken ausgewählt. Die Marker deckten mit 3 cM dabei einen größeren Bereich ab, als die Größe der DGCR2 von geschätzter 1 Mb Länge nötig erscheinen ließ. Damit sollte die Klonierung der Region DGCR2 sichergestellt werden. Die 14 Marker waren auf eine 3 cM große genomische Region verteilt. Bei einer Durchschnittsgröße von etwa 120 kb pro PAC-Klon, war klar, daß selbst im günstigsten Fall einer gleichmäßigen Verteilung der Marker kein vollständiges Contig erhalten werden konnte. Es ergaben sich verschiedene Teilcontigs, die durch Lücken unbekannter Größe voneinander getrennt waren. Über einen PAC-*walking*-Ansatz wurde versucht, diese Lücken zu überbrücken. Zu diesem arbeits- und zeitaufwendigen Verfahren gab es damals noch keine Alternative. Erst mit der Veröffentlichung eines *Fingerprint*-Protokolls (Marra et al. 1997) und der verfügbaren Software, konnte die Contig-Etablierung effizienter gestaltet werden. Bis dahin waren *Fingerprint*-Protokolle sehr aufwendig und beinhalteten den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen und Polyacrylamidgelen. Bei dem von Marra et al. vorgestellten Protokoll war lediglich eine Restriktionsspaltung der PAC-Klone nötig. Die Auftrennung der Restriktionsbanden wurde mit einem normalen Agarosegel vorgenommen. Die Identifizierung überlappender Klone anhand von Restriktionsbanden gleicher Größe wurde mit Hilfe einer Software ermöglicht (Soderlund et al. 1997). Vor dem Einsatz dieser Methode wurden in mehr als eineinhalb Jahren 98 Klone isoliert und in verschiedene Contigs geordnet. Mit dem

Fingerprint-Protokoll war es möglich, mehr als 100 Klone in zwei Monaten zu kartieren. Die Methode war nicht nur sehr schnell, sondern auch sehr genau. Die Contig-Bildung per Computer wurde durch PCR und Hybridisierung bestätigt. Es wurden nur fünf fehlerhaft eingeordnete Klone identifiziert, was weniger als 4 % der bearbeiteten Klone entspricht. Insgesamt wurden etwa 200 PAC-Klone in vier Contigs von etwa 300 bis 850 kb Länge angeordnet. Die Gesamtgröße der klonierten Region belief sich auf etwa 2,2 Mb. In das proximalste und größte Contig 4 wurde die Region DGCR2 kartiert. Über die später identifizierte zweite Haploinsuffizienzregion HDR1 wurde von Beginn an mit Hilfe des *Fingerprint*-Protokolls innerhalb von etwa drei Monaten ein PAC/BAC-Contig etabliert. Dies verdeutlichte nochmals die Effizienz dieser Kartierungstechnik.

4.2. Identifizierung von Haploinsuffizienzregionen auf Chromosom 10p mit Deletionskartierung

4.2.1. Deletionskartierungen bei Patienten mit partieller Monosomie 10p

Die partielle Monosomie 10p gehört zu den seltenen Chromosomenaberrationen. Bis 1995 wurden 34 Fälle in der Literatur beschrieben (Schuffenhauer et al. 1995), bei denen als einzige chromosomale Auffälligkeit eine Deletion auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 vorlag. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 16 Patienten mit Deletionen untersucht. 10 Patienten wurden hier das erste Mal beschrieben, bei sechs Patienten handelte es sich um bereits publizierte Fälle, wobei von keinem der Patienten molekulargenetische Daten vorlagen. Bei allen Patienten lagen zytogenetisch sichtbare Deletionen vor. Der Phänotyp der partiellen Monosomie 10p ähnelt häufig dem des DiGeorge-Syndroms, das meist mit einer Mikrodeletion 22q11 assoziiert ist. Dies wies darauf hin, daß es auf Chromosom 10p einen zweiten Locus für das DiGeorge-Syndrom geben mußte, der allerdings wegen der Seltenheit nicht die klinische Bedeutung hat wie die Mikrodeletion 22q11.

Zur genauen Eingrenzung einer DGS-Haploinsuffizienzregion auf 10p wurden in dieser Studie 16 Patienten mit partieller Monosomie 10p molekulargenetisch mit Hilfe polymorpher Marker und zytogenetisch über FISH analysiert. Zwölf Patienten hatten eine terminale, vier Patienten eine interstitielle Deletion. Die Deletionsgrößen in den Patienten schwankten zwischen 10 und 47 cM. Ein Bruchpunktcluster, d.h. eine Region, in der mehrere Bruchpunkte kartieren wurde nicht identifiziert. Die Bruchpunktregionen sind über den gesamten kurzen Arm von Chromosom 10 verteilt. Dies ist in Übereinstimmung mit Deletionen auf anderen Chromosomen, bei denen im allgemeinen auch keine Clusterung von

Bruchpunkten beobachtet wird. Der parentale Ursprung der Deletionen wurde bei sechs Patienten bestimmt. Vier Patienten wiesen eine Deletion paternalen Ursprungs, zwei eine Deletion maternalen Ursprungs auf. Die Zahlen sind jedoch zu klein, um den Phänotyp mit dem parentalen Ursprung der Deletion zu korrelieren.

Es ist aus mehreren Studien bekannt, daß Deletionen oder Duplikationen des gleichen Chromosomensegments eine hohe Variabilität in der klinischen Ausprägung aufweisen. Beispiele hierfür sind das Wolf-Hirschhorn-Syndrom mit einer partiellen Monosomie 4p und das Cri-du-Chat-Syndrom mit einer partiellen Monosomie 5p. Aus diesem Grund können bei der Definition einer kritischen Region nur die Patienten herangezogen werden, die einen dem DiGeorge-Syndrom ähnlichen Phänotyp zeigen. Ein Ausschluß von Chromosomenregionen anhand von Patienten ohne den untersuchten Phänotyp ist aus dem oben genannten Grund problematisch, da bei der großen Variabilität des Phänotyps mit einer verminderten Penetranz gerechnet werden muß. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Bruchpunktkartierung bei einer Auswahl der in dieser Studie untersuchten Patienten. Es zeigte sich, daß auch bei Patienten mit partieller Monosomie 10p, die eine Hemizygotie für die gleichen chromosomalen Regionen aufwiesen, eine Variabilität des Phänotyps vorliegt. So waren die drei Patienten KAN, TAT und ROB für die gleiche etwa 47 cM große Region deletiert. Allerdings zeigte nur ROB mit einer Aortenstenose einen angeborenen Herzfehler, während sich bei den anderen beiden Patienten das Herz normal entwickelte. Noch deutlicher wurde die phänotypische Heterogenität bei den Patienten MAJ, BIH und GM6936, deren terminale 10p-Bruchpunkte in dieselbe Region kartiert wurden. Alle Patienten waren für einen über 30 cM großen Bereich von 10p deletiert, doch während MAJ und GM6936 die drei DGS-Leitsymptome Herzfehler, T-Zelldefekt und Hypoparathyreoidismus aufwiesen, zeigte BIH nur einen Herzfehler. Dieser war zudem für DiGeorge-Syndrom-Patienten nicht typisch. Schließlich wurde auch bei den beiden interstitiell deletierten Patienten MEG und AMS ein deutlicher Unterschied im Phänotyp registriert. Obwohl beide Patienten eine große gemeinsame hemizygoten Region aufwiesen, zeigte nur MEG mit einer Thymus-Hypoplasie und einem Herzfehler Symptome des DiGeorge-Syndroms. Diese Beispiele verdeutlichen, daß auch bei der partiellen Monosomie 10p eine deutliche Variabilität in der klinischen Ausprägung beobachtet wird. Dies war der Grund dafür, daß in dieser Studie nur 11 der 16 Patienten zur Kartierung einer kritischen Haploinsuffizienzregion herangezogen werden konnten, da nur sie in das DGS-Spektrum eingeordnet werden konnten. Fünf Patienten zeigten keinen DGS-Phänotyp bzw. die verfügbaren klinischen Daten waren nicht ausreichend, um sie als DGS-Patienten bezeichnen zu können.

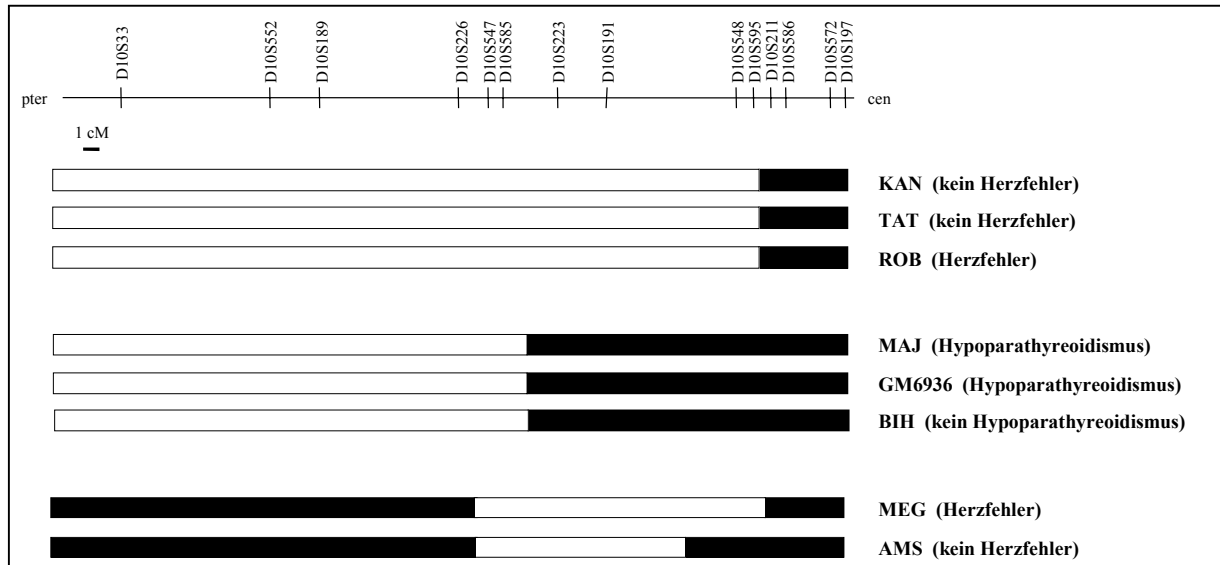


Abbildung 20: Phänotypvariabilitäten bei Patienten mit sehr ähnlichen Deletionen.

Deletierte Chromosomenregionen sind als weiße, nicht deletierte Regionen als schwarze Balken dargestellt. Die variablen Symptome der Patienten sind in Klammern angegeben. Obwohl die Patienten innerhalb der drei Gruppen sehr ähnliche Deletionen besitzen, zeigen sie auch bei den sog. DGS-Leitsymptomen (Herzfehler, Hypoparathyreoidismus und T-Zelldeekt) z.T. deutliche Unterschiede (Herzfehler bzw. keinen Herzfehler und Hypoparathyreoidismus bzw. keinen Hypoparathyreoidismus).

Als kritische Region wird der kleinste chromosomale Bereich definiert, für den alle phänotypisch auffälligen Patienten eine Hemizygotie aufweisen. Die proximale Grenze dieser Region konnte anhand der drei Patienten LEM, WAB und WON charakterisiert werden, deren Bruchpunkte bei der ersten Bruchpunktanalyse in dieselbe Region kartiert worden waren (Abb. 4, Kapitel 3.1.3.). Die übrigen DGS-Patienten mit terminalen Deletionen (KAN, TAT, ROB, HOV, MAJ und GM6936), sowie die beiden Patienten mit interstitiellen Deletionen (MAR, MEG) waren im Vergleich zu LEM, WAB und WON auch für weiter proximal liegende Regionen deletiert und waren damit für die Bestimmung der proximalen Grenze der kritischen Region ohne Bedeutung. Die distale Grenze der kritischen Region wurde durch den distalen Bruchpunkt des interstitiell deletierten Patienten MEG vorgegeben, da sich die Deletion des zweiten interstitiellen Deletionspatienten MAR noch weiter in distale Richtung ausdehnte. Eine detaillierte Bruchpunktanalyse der vier Patienten LEM, WAB, WON und MEG wurde mit dem Ziel durchgeführt, die kritische Region möglichst genau zu kartieren. Als Grundlage diente das etablierte PAC-Contig. Mit FISH wurden für alle vier Patienten Klone identifiziert, die die Bruchpunkte überspannten (Abb. 5, Kapitel 3.1.4.). Die vier Bruchpunkte kartierten in eine etwa 1,2 Mb große Region um die polymorphen Ankermarker D10S547 und D10S585, die einen genetischen Abstand von 1 cM aufwiesen. Eine kleinste gemeinsame Deletionsregion für alle vier Patienten wurde nicht erhalten. Nur die drei

Patienten LEM, WAB und MEG besaßen eine etwa 300 kb große gemeinsame Deletionsregion. Daw et al. (Daw et al. 1996) beschrieben in einer ähnlichen Studie ebenfalls eine kritische Region anhand von Patienten mit partieller Monosomie 10p. In deren Studie konnte eine kritische Deletionsregion von etwa 2 Mb definiert werden. In Anlehnung an die Mikrodeletionsregion auf Chromosom 22q11, die für mehr als 90 % der DiGeorge-Syndrom-Fälle verantwortlich ist, wurde vorgeschlagen, die neu identifizierte Region auf 10p zweite kritische DiGeorge-Syndrom-Region, DGCR2, zu nennen (Schuffenhauer et al. 1998; Daw et al. 1996).

4.2.2. Das HDR-Syndrom und partielle Monosomie 10p

Die Patientin WON, die aufgrund ihres distalen Bruchpunkts eine gemeinsame kritische Haploinsuffizienzregion in der hier durchgeführten Studie ausschloß (Kapitel 4.2.1.), zeigte die für Patienten mit partieller Monosomie 10p typischen Symptome: Entwicklungsverzögerung, Epikanthus, Hypertelorismus, Ptosis, flache breite Nase, Mikrognathie, dysmorphe, tief sitzende Ohren und Anomalien an Händen und Füßen. Weitere ganz typische Symptome des DiGeorge-Syndroms wie Herzfehler, Gaumenspalte oder T-Zelldefekt waren bei dieser Patientin jedoch nicht vorhanden. Dafür wurde eine Hypokalzämie bzw. ein Hypoparathyreoidismus, eine sensorineurale Taubheit und eine Nierendysplasie beschrieben. Es wurde später vorgeschlagen, das Auftreten dieser drei Symptome als Leitsymptome für ein eigenes Syndrom anzunehmen und es HDR-Syndrom zu nennen, wobei die drei Buchstaben dieses Akronyms für die drei Symptome (in englischer Sprache) Hypoparathyreoidismus, Taubheit (*deafness*) und Nierenfehlbildungen (*renal defects*) stehen (Hasegawa et al. 1997). Zwei Betroffene aus einer von Bilous et al. beschriebenen Familie zeigten zystische Nieren mit normaler Glomerulumfiltrationsrate, während drei betroffene Familienmitglieder eine bilaterale Nierendysplasie mit reduzierter Filtrationsrate und eine anomale Serum-Kreatinin-Konzentration aufwiesen (Bilous et al. 1992). Die morphologischen Nierenfehlbildungen in dieser Familie wurden bei der Patientin WON nicht beobachtet. Ihre Nieren zeigten im Ultraschall lediglich eine diffuse kortikale Begrenzung. Allerdings wies sie wiederholt eine reduzierte Glomerulumfiltrationsrate und eine anormale Serum-Kreatinin-Konzentration auf. Dieser Nierendefekt zusammen mit dem Hypoparathyreoidismus und der sensorineuralen Taubheit ließ es möglich erscheinen, daß WON ein HDR-Syndrom aufwies. Der auch in dieser Studie untersuchte aber bereits früher beschriebene Patient WAB zeigte ebenfalls ein HDR-Syndrom (Hasegawa et al. 1997). Weitere vier Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p, die alle drei Leitsymptome des

HDR-Syndroms aufwiesen, sind in der Literatur zu finden (Fryns et al. 1981; Hon et al. 1995; Schuffenhauer et al. 1998; Schuffenhauer et al. 1995). Die Nierendefekte können asymmetrisch sein und sind in ihrer Ausprägung variabel (Tab. 21). Man findet dysplastische Nieren, zystische Nieren, aplastische Nieren und Hydronephrosen. Die Taubheit ist auf sensorineurale Ursachen zurückzuführen. Neben den erwähnten sechs Patienten, die alle drei Symptome des HDR-Syndroms aufwiesen, wurden in der Literatur mindestens 14 weitere Patienten mit partieller Monosomie 10p beschrieben, die wenigstens zwei der drei Leitsymptome des HDR-Syndroms zeigten (HD n - 4, HR n - 8, DR n - 2). Diese Ergebnisse legen nahe, daß auf Chromosom 10p eine Haploinsuffizienzregion für das HDR-Syndrom kartiert.

Tabelle 21: Symptome des DiGeorge-Syndroms und des HDR-Syndroms bei 9 Patienten mit 10p-Strukturaberrationen.

Patient	WAB	WON	C2	DW	CH92-092
Literatur	(Hasegawa et al. 1997; Lichtner et al. 2000)	(Lichtner et al. 2000)	(Fryns et al. 1981; Van Esch et al. 1999)	(Dasouki et al. 1997)	(Gottlieb et al. 1998)
Geschlecht	m	w	w	m	w
10p-Aberration	del(10)(p13)	del(10)(p13)	del(10)(p13)	del(10)(p13)	del(10)(p13)
Herzfehler 1)	VSD	-	-	-	-
Faziale Dysmorphien	+	+	+	+	+
T-Zelldefekt	-	-	-	+	+
Gaumenspalte	-	-	-	-	-
Hypokalzämie/ Hypoparathyreoidismus	+	+	+	+	+
Taubheit	+	+	+	+	?
Nierendefekt 2)	DN(r) VR(l)	NI	AN(r) DN(l)	-	DN(r)
DGS-Spektrum HDR-Spektrum 3)	CAH HDR	AH HDR	AH HDR	ATH HD	ATH HR
Molekulare Ergebnisse	DGCR2 partiell deletiert	DGCR2 intakt	DGCR2 intakt	DGCR2 intakt	DGCR2 intakt

Patient	C1	MEG	AMS	MAR
Literatur	(Van Esch et al. 1999)	(Lipson et al. 1996)	(Schuffenhauer et al. 1998)	(Obregon et al. 1992)
Geschlecht	m	w	w	m
10p-Aberration	ins(8;10)ins(10;8)	del(10)(p12p13)	del(10)(p12p13)	del(10)(p11p13)
Herzfehler 1)	-	VSD, ASD	-	ASD
Faziale Dysmorphien	+	+	+	+
T-Zelldefekt	-	+	-	+
Gaumenspalte	-	+	-	-
Hypokalzämie/ Hypoparathyreoidismus	+	-	-	+
Taubheit	+	-	-	+
Nierendefekt 2)	AN(l)	-	-	HN
DGS-Spektrum HDR-Spektrum 3)	A HDR	CATC -	A -	CATH HDR
Molekulare Ergebnisse	DGCR2 intakt	DGCR2 deletiert	DGCR2 deletiert	DGCR2 deletiert

w - weiblich, m - männlich, r - rechte Seite, l - linke Seite

1) ASD - Atriumseptumdefekt, VSD - Ventrikelseptumdefekt

2) AN - aplastische Niere, DN - dysplastische Niere, HN - Hydronephrose, NI - Niereninsuffizienz, VR - vesikoureteraler Reflux

3) Das vollständige DGS-Spektrum beinhaltet die fünf Symptome „CATCH“: C - Herzfehler, A - faziale Dysmorphien, T - T-Zelldefekt, C - Gaumenspalte, H - Hypokalzämie/Hypoparathyreoidismus. Das vollständige HDR-Syndrom beinhaltet die drei Symptome „HDR“: H - Hypoparathyreoidismus, D - Taubheit, R - Nierendefekt.

4.2.3. Kartierung des HDR-Syndrom-Locus auf 10p

Der Bruchpunkt der terminalen Deletion des Patienten WON wurde etwa 300 kb distal zur Region DGCR2 kartiert, dessen distale Grenze durch den distalen Bruchpunkt der interstitiellen Deletion des Patienten MEG bestimmt wurde (Abb. 5, Kapitel 3.1.4.). MEG zeigte einen Herzfehler und einen T-Zelldefekt und konnte daher in das Symptomenspektrum des DiGeorge-Syndroms eingeordnet werden. WON hingegen wies alle drei Leitsymptome des HDR-Syndroms auf. Damit konnte gezeigt werden, daß das HDR-Syndrom distal zur anfangs definierten Haploinsuffizienzregion DGCR2 kartiert. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation der in der Literatur veröffentlichten Fälle von Patienten mit partieller Monosomie 10p bestätigt dieses Ergebnis (Tab. 21). Patient C2 in Abbildung 21 wies alle drei Symptome des HDR-Syndroms auf und besaß einen Bruchpunkt, der ebenfalls distal zur Region DGCR2 kartiert wurde (Van Esch et al. 1999). Ein weiterer Patient (C1, Abb. 21) mit HDR-Syndrom hatte eine zytogenetisch balancierte komplexe Translokation 10p;8q mit Bruchpunkten auf 10p, die distal und proximal zur Region DGCR2 lagen (Van Esch et al. 1999). Die Region DGCR2 war in diesem Patienten intakt. Der Abstand des distalen 10p-Translokationsbruchpunkts zur Region DGCR2 wurde mit mindestens 1-2 Mb angegeben, was einen Positionseffekt unwahrscheinlich erscheinen ließ. Neben diesen beiden Patienten, die alle drei Leitsymptome des HDR-Syndroms aufwiesen, sind zwei weitere Patienten beschrieben worden, die zwei der drei HDR-Syndrom-Symptome zeigten (Patient DW mit einem Hypoparathyreoidismus und einer sensorineuralen Taubheit (Dasouki et al. 1997) und Patient CH92-092 mit einem Hypoparathyreoidismus und einem Nierendefekt (Gottlieb et al. 1998)). Die Deletionsregion bei Patient DW wurde distal zum Marker D10S547 lokalisiert. Dieser Marker kartiert etwa 200 kb distal zur Region DGCR2. Der Bruchpunkt der terminalen Deletion im Patienten CH92-092 wurde in das Intervall D10S1431-D10S226 kartiert und lag damit etwa 2 Mb distal zur Region DGCR2. Damit hatten beide Patienten eine partielle Monosomie 10p, die jedoch die Region DGCR2 intakt ließ.

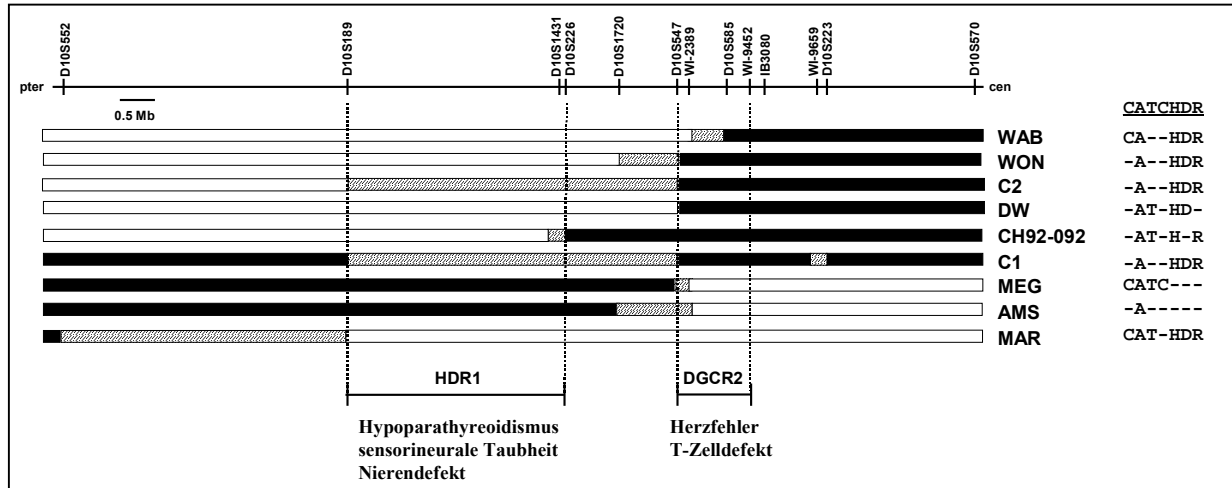


Abbildung 21: Genotyp-Phänotyp-Analyse von ausgewählten Patienten mit partieller Monosomie 10p. Die deletierten Chromosomenregionen sind durch weiße Balken, die nicht deletierten Chromosomenregionen durch schwarze Balken dargestellt. Gestreifte Balken bezeichnen die Regionen, in denen die Bruchpunkte in den Patienten kartiert wurden. Der Phänotyp der Patienten ist auf der rechten Seite durch Angabe der entsprechenden Akronyme zu ersehen: C - Herzfehler, A - faziale Dismorphien, T - T-Zelldefekt, C - Gaumenspalte, H - Hypoparathyreoidismus, D - sensorineurale Taubheit, R - Nierendefekt.

4.2.4. DGS2 als Contiguous Gene Syndrome

Genotyp-Phänotyp-Analysen mit Patienten aus dieser Studie sowie mit publizierten Fällen legten den Schluß nahe, daß das mit partieller Monosomie 10p assoziierte DGS durch eine Haploinsuffizienz von mindestens zwei verschiedenen Regionen verursacht wird, einer distalen HDR1-Region, verantwortlich für den Hypoparathyreoidismus, den Nierendefekt und die sensorineurale Taubheit, und einer proximalen Region DGCR2, verantwortlich für den Herzfehler und T-Zelldefekt (Abb. 21, Kapitel 4.2.3.).

Die proximale Region DGCR2 wurde ursprünglich durch die Patienten MEG und P1/P2, die einen Herzfehler und T-Zelldefekt aufwiesen, auf eine Größe von etwa 2 Mb eingegrenzt (Daw et al. 1996) (Abb. 22). Bevor bekannt war, daß der Phänotyp der partiellen Monosomie 10p durch mehr als eine Haploinsuffizienzregion verursacht wird, wurde die Region von Daw et al. in dieser Arbeit zunächst mit Hilfe des Patienten LEM auf etwa 1 Mb verkleinert. Patient LEM definierte anstelle von P1/P2 die proximale Grenze neu. Die distale Grenze wurde weiterhin durch Patient MEG definiert. Patient LEM zeigte einen Hypoparathyreoidismus und einen Nierendefekt, jedoch weder einen Herzfehler noch einen T-Zelldefekt. Damit hat LEM Symptome des HDR-Syndroms, nicht aber Symptome, die mit der Haploinsuffizienzregion DGCR2 assoziiert sind. Er kam nach den bereits diskutierten Kriterien zur Definition von Haploinsuffizienzregionen (Kapitel 4.2.1.) damit für die

Kartierung der DGCR2 nicht mehr in Frage. Im Rahmen dieser Studie wurde auch der Patient WAB molekulargenetisch untersucht. Die Symptome dieses Patienten, Hypoparathyreoidismus, sensorineurale Taubheit und T-Zelldefekt, sind wahrscheinlich das Ergebnis der Haploinsuffizienz der distalen HDR1-Region. WAB zeigt außerdem einen Herzfehler, der mit der HDR1-Region nicht assoziiert ist, wohl aber mit der Region DGCR2. WAB ist daher ein geeigneter Patient, um die Region DGCR2 weiter einzugrenzen. Der Bruchpunkt wurde etwa 300 kb proximal zur distalen Grenze der DGCR2 kartiert, die durch Patient MEG vorgegeben war. Damit verkleinerte WAB die Größe der Haploinsuffizienzregion DGCR2 auf etwa 300 kb. Ein T-Zelldefekt, der neben dem Herzfehler ebenfalls mit der DGCR2 assoziiert ist, wurde bei WAB nicht beobachtet. Dies ist jedoch nicht ungewöhnlich, da bei Patienten mit partieller Monosomie 10p eine hohe Variabilität in der klinischen Ausprägung sowie eine verminderte Penetranz bekannt ist (Kapitel 4.2.1.).

Die kleinste gemeinsame Deletionsregion, die mit den drei HDR-Syndrom-Leitsymptomen Hypoparathyreoidismus, sensorineurale Taubheit und Nierendefekte assoziiert war, wurde zunächst durch die Deletionen der Patienten WON und C2 (jeweils terminale Deletionen) und MAR (interstitielle Deletion) definiert (Abb. 21, Kapitel 4.2.3.). Dieses große Intervall zwischen den Markern WI-2389 (WON, C2) und D10S552 (MAR) konnte mit den Bruchpunkten der Patienten CH92-092 und C1 weiter eingegrenzt werden. Wenn man davon ausgeht, daß Patient CH92-092 mit einem Hypoparathyreoidismus und einem Nierendefekt in das HDR-Syndrom-Spektrum paßt, kann die HDR-Syndrom-Deletionsregion auf eine Region distal des Markers D10S226 eingegrenzt werden. Der distale Bruchpunkt im Patienten C1, der eine komplexe Chromosomenaberration trug, die mit einem HDR-Syndrom assoziiert war, kartierte zwischen die Marker D10S189 und WI-2389 (Van Esch et al. 1999). Damit konnte die distale Grenze der HDR-Region auf Bereiche proximal des Markers D10S189 beschränkt werden. Die kleinste gemeinsame HDR-Syndrom-Deletionsregion (HDR1) wurde damit durch das Intervall zwischen den Markern D10S189 (distal) und D10S226 (proximal) bestimmt und hatte eine geschätzte Größe von 2-4 Mb (Abb. 21, Kapitel 4.2.3.).

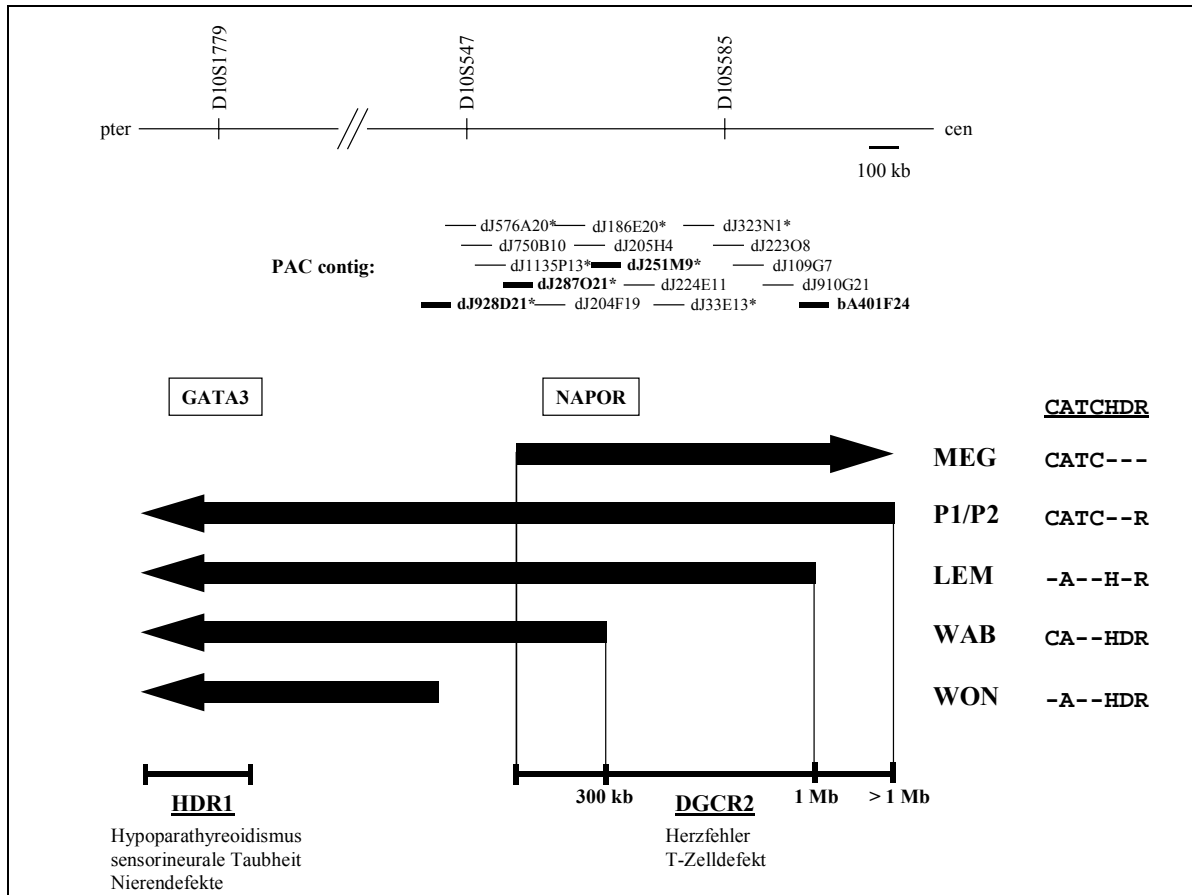


Abbildung 22: Definition der Haploinsuffizienzregion DGCR2.

PAC/BAC-Klone in fetter Schrift sind bruchpunktüberspannend. * - sequenzierte Klone (Sanger Centre). Die Pfeile bezeichnen die deletierten Regionen in den Patienten, wobei sich die Deletionen in Pfeilrichtung fortsetzen. Der Phänotyp der Patienten ist auf der rechten Seite durch Angabe der entsprechenden Akronyme zu ersehen: C - Herzfehler, A - faziale Dysmorphien, T - T-Zelldefekt, C - Gaumenspalte, H - Hypoparathyreoidismus, D - sensorineurale Taubheit, R - Nierendefekt. Die Regionen für das DiGeorge-Syndrom (DGCR2) und das HDR-Syndrom (HDR1) sind dargestellt. Die proximale Grenze der Region DGCR2 wurde in verschiedenen Studien durch die Patienten P1/P2 (Daw et al. 1996), LEM und WAB (diese Arbeit) definiert. Mutationen im GATA-3-Gen sind für das HDR-Syndrom verantwortlich (Kapitel 3.5.2.2.), das Gen NAPOR kartiert in die Region DGCR2 und ist ein Kandidatengen für Herzfehler und T-Zelldefekt (Kapitel 3.1.4.).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Deletionskartierung bei Patienten mit Monosomie 10p und die anschließende Genotyp-Phänotyp-Analyse unter Einbeziehung weiterer publizierter Patienten, zeigte, daß die klinische Ausprägung der Monosomie 10p das Resultat einer Haploinsuffizienz von mindestens zwei unabhängigen Regionen auf 10p ist, die distale Region HDR1, die den Hypoparathyreoidismus, den Nierendefekt und die sensorineurale Taubheit verursacht, und die proximale Region DGCR2, die für den Herzfehler und T-Zelldefekt verantwortlich ist.

4.2.5. Weitere Krankheitsloci auf Chromosom 10p

Der Umfang der in dieser Arbeit beschriebenen Deletionen reichte von wenigstens 10 cM beim Patienten AMS bis zu fast 50 cM bei den Patienten TAT und KAN. Verglichen mit DiGeorge-Syndrom-Patienten mit einer Mikrodeletion 22q11, bei denen meistens eine 3 Mb große Deletion vorliegt, waren die 10p-Deletionen eine Größenordnung umfangreicher. Es ist erstaunlich, daß Patienten mit einer Deletion, die etwa 2/3 des 10p-Arms betrifft und die nicht als Mosaik vorliegt, lebensfähig sind und zum Teil sogar einen verhältnismäßig milden Phänotyp aufweisen. Bei dem Umfang der Deletionen ist es andererseits nicht verwunderlich, daß die meisten Patienten zusätzliche Symptome zeigen, die nicht Teil des DiGeorge-Syndrom-Symptomenspektrums sind. Als häufige Symptome wurden bei vielen Patienten Hand- und Fußanomalien beobachtet. Dabei handelt es sich um ein heterogenes Symptom, das bei einer Reihe von Syndromen auftritt. Daneben zeigen sechs Patienten aus dieser Arbeit eine Ptosis (MAR, MAJ, HOV, ROB, TAT, KAN). Da eine Ptosis nicht so häufig mit chromosomalen Aneuploidie-Syndromen assoziiert ist, kann vermutet werden, daß ein oder mehrere Gene auf 10p dafür verantwortlich sind. Die kritische Ptosis-Region konnte zwischen die Marker D10S552 (distal), welcher den distalen Bruchpunkt der interstitiellen Deletion in Patient MAR flankierte, und D10S223 (proximal), welcher die terminale Deletion in Patient MAJ flankierte, kartiert werden. Die Region hat eine Ausdehnung von 20 cM, was eine Identifizierung des oder der ursächlichen Gene schwierig macht. Da möglicherweise Gene, die für mitochondriale Proteine kodieren, als Ursache der Ptosis in Frage kommen, wären solche Gene gute Kandidaten. Die Verfügbarkeit der genomischen Sequenz könnte helfen, sie aus dem kritischen Intervall zu identifizieren. Die bei fast allen Patienten beobachtete mentale Retardierung und die fazialen Dysmorphien sind wenig spezifisch für die partielle Monosomie 10p, sondern werden ganz allgemein bei Patienten mit großen Deletionen, bei denen viele Gene betroffen sind, beobachtet.

Neben den beiden Haploinsuffizienzregionen HDR1 und DGCR2, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, waren bis Mai 2001 sechs Einzelgenerkrankungen, drei Suszeptibilitätsloci und drei Tumorloci auf den kurzen Arm von Chromosom 10 kartiert (s. Abb. 1, Kapitel 1.2.5.). Von den sechs Einzelgenerkrankungen wurde für zwei Krankheiten, Refsum-Krankheit und Megaloblastische Anämie Typ 1, das mutierte Gen bereits kloniert (Jansen et al. 1997; Mihalik et al. 1997; Aminoff et al. 1999) (Kapitel 1.2.5.1.1.). Außerdem wurden auf 10p mehrere Loci für Tumorsuppressorgene kartiert (Kapitel 1.2.5.1.3.). Das wirft die Frage auf, ob Patienten mit partieller Monosomie 10p Symptome dieser Krankheiten zeigen. Dies ist nicht der Fall, was zum einen daran liegen kann, daß es sich um autosomal

rezessive Krankheiten handelt und man bei einem Haploinsuffizienzsyndrom eher einen dominanten Erbgang erwartet. Bei den wenigen dominanten Erkrankungen (Thrombozytopenie Typ 2, THC2, und Arrhythmische Dysplasie des rechten Ventrikels, ARVD6) muß der pathogenetische Mechanismus nicht unbedingt auf einen Dosiseffekt eines Gens zurückzuführen sein, sondern kann andere Ursachen haben, die bei einer Haploinsuffizienz nicht zum Tragen kommen. Betont werden muß auch, daß es sich bei allen in der Literatur publizierten Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p um Kinder handelt und die Krankheiten sich erst im Erwachsenenalter manifestieren können.

Es wurden verschiedene LOH-Regionen auf 10p in Gliomen identifiziert, was auf ein oder mehrere Tumorsuppressorgen hinweist, welches auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 kartiert. Ein weiterer Locus für ein Tumorsuppressorgen in Prostatakarzinomen wurde auf 10p kartiert. Es wäre interessant zu verfolgen, ob Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p im Laufe ihres Lebens eine höhere Inzidenz für Gliome oder Prostatakarzinome aufweisen. Da es sich bei allen Patienten aus dieser Studie und auch allen publizierten Fällen um Kinder handelt, läßt sich hier noch kein Ergebnis ableiten. Tumorerkrankungen wurden bisher im Symptomenspektrum der Monosomie 10p jedenfalls nicht beobachtet.

4.3. Das HDR-Syndrom und GATA-3

4.3.1. Mutationssuche im GATA-3-Gen bei HDR-Syndrom-Patienten

Die Genotyp-Phänotyp-Analyse von Patienten mit partieller Monosomie 10p führte zur Definition einer eigenen Haploinsuffizienzregion, die für die Ausbildung des HDR-Syndroms verantwortlich ist (Abb. 21, Kapitel 4.2.3.). Die Suche nach Kandidatengenen führte zum Gen GATA-3, das auf 10p14-15 kartiert worden war (Schuler et al. 1996) und das aufgrund seiner Expression u.a. in der humanen embryonalen Niere, den Parathyreoideae und dem Innenohr (Debacker et al. 1999) sehr gut zum HDR-Syndrom-Phänotyp paßte. In einem Translokationspatienten (C1) mit HDR-Syndrom sowie in betroffenen Familienmitgliedern einer autosomal dominanten HDR-Syndrom-Familie (23/91) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Zusammenarbeit mit Hilde van Esch (Leuven) Deletionen identifiziert, die das Gen GATA-3 miteinschlossen. Eine anschließende Mutationsanalyse des Gens GATA-3 in sporadischen HDR-Syndrom-Patienten ergab in zwei Patienten eine kleine Deletion und in einem Patienten einen Basenaustausch, der zu einem Stop-Codon führt. Eine der Deletionen umfaßt 49 Basenpaare und führt zu einer Verschiebung des Leserasters und einem anschließenden vorzeitigen Stop. In beiden Fällen wird ein verkürztes Protein erhalten,

dem beide Zinkfinger-Domänen fehlen (Abb. 23). GATA-3 gehört zur großen Gruppe der Cys₂/Cys₂-Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren. Jede Zinkfinger-Domäne besitzt vier Cysteine, die über ihre Sulfid-Gruppen einen tetraedrischen Komplex mit einem Zinkion eingehen. Das Zinkion liegt in der Mitte einer großen globulären Domäne, die sowohl für die Bindung des Proteins an die DNA als auch für die Dimerisierung des Proteins eine entscheidende Rolle spielt. Das Fehlen der Zinkfingerdomänen führt zu einem inaktiven Protein und als Konsequenz zu einer GATA-3-Haploinsuffizienz. Bei der zweiten Deletion handelte es sich um eine 12 bp-Deletion ohne Verschiebung des Leserasters, was zu einer Deletion von vier Aminosäuren im Protein führt. Eine der deletierten Aminosäuren ist das erste Cystein in der C-terminalen Zinkfinger-Domäne (Abb. 23). Die Vermutung, daß das Fehlen eines Cysteins die korrekte Faltung der Zinkfinger-Domäne verhindert, da ein tetraedrischer Komplex mit dem Zinkion nicht mehr möglich ist, und damit zu einem funktionslosen Protein führt, wurde durch DNA-Bindungsstudien bewiesen. Es zeigte sich, daß das deletierte GATA-3-Protein keine DNA mehr binden kann (Van Esch et al. 2000). Das führt auch bei dieser Deletion zu einem inaktiven Protein und damit zu einer GATA-3-Haploinsuffizienz. Dies ist in Übereinstimmung mit GATA-3-DNA-Bindungsstudien, die zeigten, daß die C-terminale Zinkfinger-Domäne für eine spezifische DNA-Bindung erforderlich ist (Yang et al. 1994). Die beiden großen Deletionen in dem Patienten C1 sowie in der Familie 23/91 mit einer GATA-3-Deletion, sowie die drei GATA-3-Mutationen in zytogenetisch unauffälligen HDR-Patienten, die in allen Fällen zu einem funktionslosen Protein führen, bewiesen, daß der zugrundeliegende Mechanismus für das HDR-Syndrom eine Haploinsuffizienz des GATA-3-Gens ist. Dies unterstreicht die Bedeutung von Zinkfinger-Proteinen als Ursache von Fehlbildungssyndromen. Weitere Beispiele wären die Holoprosenzephalie und das Trichorhino-Phalangeal-Syndrom, bei denen eine Haploinsuffizienz der Zinkfinger-Gene ZIC2 bzw. TRPS1 nachgewiesen wurde (Brown et al. 1998; Momeni et al. 2000). In acht der in Leuven (H. van Esch) und München (P. Lichtner) untersuchten HDR-Patienten wurden weder mittels FISH Deletionen in der HDR1-Region gefunden, noch Mutationen im GATA-3-Gen nachgewiesen. Dabei ist zu bemerken, daß lediglich die fünf kodierenden Exons nach Mutationen durchsucht wurden. Mutationen in regulatorischen Sequenzen sind nicht ausgeschlossen worden. Mit der Möglichkeit einer Mikrodeletion im Gen, die zu klein ist, um mittels einer etwa 100 kb großen FISH-Sonde detektiert zu werden, die aber der Mutationsuntersuchung mit Hilfe der PCR entgeht, muß ebenfalls gerechnet werden. Solche Deletionen können über Dosis-Blots oder quantitative PCR nachgewiesen werden. Beides wurde im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt. Letztendlich ist auch nicht

auszuschließen, daß beim HDR-Syndrom eine genetische Heterogenität vorliegt, oder daß es nicht-genetische Ursachen für die Ausbildung des Syndroms gibt.

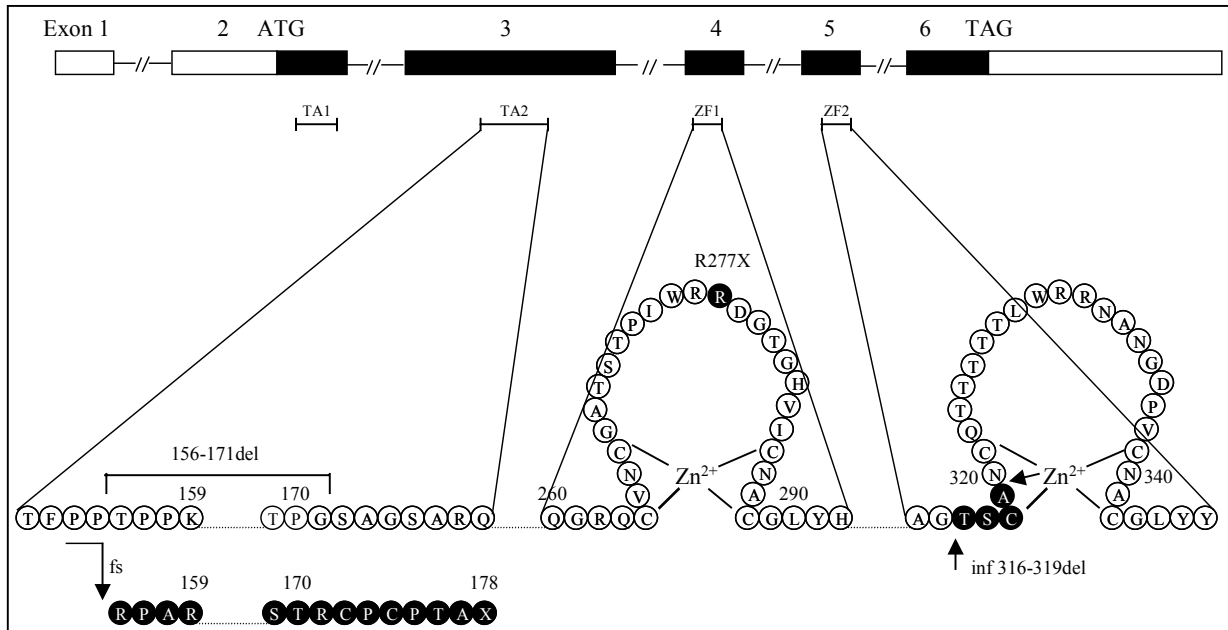


Abbildung 23: Positionen der Mutationen im GATA-3-Gen.

Die Exons 1-6 sind als Balken dargestellt, wobei die kodierende Sequenz in schwarzer Farbe hervorgehoben ist. Die durch Mutationen bzw. Deletionen betroffenen Aminosäuren sind als schwarze Kreise dargestellt. TA1/TA2 - Transaktivierungsdomänen 1 und 2; ZF1/ZF2 - Zinkfingerdomänen 1 und 2; fs - Leserasterverschiebung (frameshift); inf - Deletion im Leseraster (in frame).

4.3.2. GATA-3 als Entwicklungsgen für die Niere, das Innenohr und die Parathyreoideae

Die Nierenfehlbildungen bei Patienten mit partieller Monosomie 10p aufgrund einer GATA-3-Haploinsuffizienz sind sehr variabel und lassen auf einen gemeinsamen pathologischen Mechanismus während der embryonalen Entwicklungsphase schließen. GATA-3 ist an der korrekten Nierenentwicklung beteiligt, da es sowohl in der humanen als auch in der Maus-Ureterknospe exprimiert wird (Labastie et al. 1995). Die Ureterknospe ist eine von zwei Komponenten, aus der sich die Nachniere entwickelt. Sie wächst in die zweite Komponente, dem metanephrogenen Blastem hinein, einem undifferenzierten mesenchymalen Blastem. Gegenseitige Wechselwirkungen dieser beiden Strukturen führen zu Abzweigungen der Ureterknospe, aus denen das Nierenbecken, die Nierenkelche und die Sammelrohre entstehen. Im metanephrogenen Blastem differenzieren sich die Nephrone. Fehler in der Wechselwirkung der Ureterknospe mit dem metanephrogenen Blastem führen zu einem

Spektrum unterschiedlicher Nierenfehlbildungen, je nachdem wann und wo diese fehlerhaften Prozesse ablaufen.

Primärer Hypoparathyreoidismus ist eine endokrine Erkrankung, bei der eine verminderte Produktion des Parathormons vorliegt. Als Folge kommt es zu einer Hypokalzämie mit unterschiedlich starker Ausprägung. Der Hypoparathyreoidismus kann isoliert vorkommen, wird aber auch als Symptom bei verschiedenen Syndromen beobachtet. Die HDR-Syndrom-Patienten bzw. Patienten mit partieller Monosomie 10p und assoziiertem Hypoparathyreoidismus lassen sich normalerweise gut mit Kalzium und Vitamin D behandeln. Die Parathyreoideae entstehen aus der dritten und vierten Schlundtasche und sind damit endodermalen Ursprungs, wobei Teile auch von Zellen der Neuralleiste abstammen. In der Maus und im Menschen ist eine GATA-3-Expression in den Schlundbögen nachweisbar (Debacker et al. 1999; George et al. 1994). Es ist daher möglich, daß eine GATA-3-Haploinsuffizienz eine normale Entwicklung der Parathyreoideae negativ beeinflusst und zu einem Hypoparathyreoidismus führt.

Die Ursachen der sensorineuralen Taubheit liegen häufig im Innenohr. Das Innenohr entwickelt sich aus dem Ohrbläschen, aus dem u.a. durch Umgestaltung die Bogengänge und die Schnecke hervorgehen. GATA-3 wird während der humanen Embryonalentwicklung im Ohrbläschen und in der Schnecke expremiert (Debacker et al. 1999), was die beobachtete sensorineurale Taubheit bei HDR-Syndrom-Patienten und Patienten mit partieller Monosomie 10p aufgrund einer gestörten Innenohrentwicklung erklären kann.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die drei Organe, Niere, Parathyreoideae und Ohr, die beim HDR-Syndrom betroffen sind, zwar eine vollkommen unterschiedliche embryonale Entwicklung durchlaufen, aber die Expression von GATA-3 dabei immer eine Rolle spielt. Eine Haploinsuffizienz als Ursache des HDR-Syndroms kann daher auch aufgrund der GATA-3-Expressionsdaten während der embryonalen Entwicklung bestätigt werden. GATA-3 ist ein Transkriptionsfaktor und es wäre interessant zu wissen, welche Gene von GATA-3 reguliert werden. Dies würde zeigen, ob die molekularen Mechanismen bei der Entwicklung der drei Organe sich grundlegend unterscheiden, oder ob ein gemeinsamer molekularer Entwicklungsweg zugrunde liegt. Eine genaue Untersuchung des HDR-Phänotyps in den Patienten mit nachgewiesener GATA-3-Haploinsuffizienz offenbarte, daß alle Patienten einen Hypoparathyreoidismus und eine sensorineurale Taubheit aufwiesen. Die beiden Patienten 26/99 und 12/99 (Tab. 20, Kapitel 3.5.2.2.), die beide Mutationen hatten, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon im GATA-3-Gen führten, zeigten dagegen keine Fehlbildungen der

Niere, was auf eine verminderte Penetranz der Nierenfehlbildung schließen läßt. Weitergehende Aussagen über die Penetranz einzelner Symptome des HDR-Syndroms bzw. eine Genotyp-Phänotyp-Analyse anhand verschiedener GATA-3-Mutationen ist aufgrund der geringen Zahl, der in dieser Studie identifizierten Patienten, nicht möglich.

Die Expression von GATA-3 während der Embryonalentwicklung beschränkt sich nicht nur auf die drei beim HDR-Syndrom betroffenen Organe, sondern ist viel verbreiteter. So findet man auch eine Expression im Vorderdarm, in der Leber, im entwickelnden Auge, in den Kiemenbögen, im Pharynx und in verschiedenen Regionen des entwickelnden Gehirns und des peripheren Nervensystems (Debacker et al. 1999; George et al. 1994). Da sich diese Organe trotz einer GATA-3-Haploinsuffizienz normal entwickeln, scheint in diesen Organsystemen eine geringere Dosisempfindlichkeit bezüglich des GATA-3-Proteins zu bestehen, oder es liegt eine Kompensation durch andere Faktoren, etwa anderen GATA-Transkriptionsfaktoren, vor. Daneben spielt GATA-3 eine Rolle bei der Hämatopoese, insbesondere bei der Ausdifferenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen zu T-Zellen. Gata-3-Knockout-Mäuse zeigen u.a. schwerste hämatopoetische Defekte und sterben als Embryo zwischen Tag 11 und 12 (p.c.) (Pandolfi et al. 1995; Ting et al. 1996). Bei keinem in dieser Studie untersuchten HDR-Syndrom-Patienten mit einer GATA-3-Mutation bzw. einer Mikrodeletion, die zu einer GATA-3-Haploinsuffizienz führte, konnte klinisch oder biochemisch ein Immundefekt nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, daß die bei Patienten mit partieller Monosomie 10p beobachteten T-Zelldefekte höchstwahrscheinlich durch andere Gene verursacht werden, die, wie im Rahmen dieser Arbeit beschrieben (Kapitel 4.2.4.), in der Haploinsuffizienzregion DGCR2 kartieren sollten. Die Tatsache, daß eine GATA-3-Haploinsuffizienz beim Menschen zum Entwicklungsdefekt des HDR-Syndroms führt, war überraschend, da bei Mäusen kein pathologischer Phänotyp beobachtet wurde (Pandolfi et al. 1995). In der Maus wurde das Gata-3-Exon 2, das den Translationsstart beinhaltet, und die vorangehende 5' Exon-Intron-Grenze durch homologe Rekombination deletiert. Die für diese Mutation heterozygoten Gata-3 +/- Mäuse waren fertil und schienen in allen Belangen normal zu sein. Das zeigt, daß die Maus kein gutes Modell für das HDR-Syndrom darstellt. Dies steht im Gegensatz zur Situation beim GATA-1-Gen, bei dem eine Haploinsuffizienz sowohl beim Menschen wie auch in der Maus zu einer dyserythropoischen Anämie und einer Thrombozytopenie führt (Nichols et al. 2000). Die für Gata-3 heterozygot mutierten Mäuse sollten noch einmal gründlich nachuntersucht werden, da Nierendefekte sehr mild sein können. Außerdem sollten die Kalzium- und Parathormonwerte bestimmt und Hörtests durchgeführt werden und die Ergebnisse mit Wildtyp-Mäusen des gleichen

genetischen Hintergrunds verglichen werden. Der genetische Hintergrund spielt bei Mausmodellen eine wichtige Rolle. Möglicherweise verhindern modifizierende Gene in dem benutzten Mausstamm, daß eine Gata-3-Haploinsuffizienz zu einem schweren Phänotyp führt. In der menschlichen Population mit ihrer viel stärkeren genetischen Heterogenität wirken sich solche Effekte wesentlich schwächer oder überhaupt nicht aus.

4.4. Die Haploinsuffizienzregion DGCR2

4.4.1. Suche nach Kandidatengenen aus der Haploinsuffizienzregion DGCR2

In die Haploinsuffizienzregion DGCR2 wurden die DGS-Symptome Herzfehler und T-Zelldefekt kartiert. Eine Analyse der Region sollte Kandidatengene für diese Symptome identifizieren. Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit etablierten PAC-Contigs war es möglich, über die Zurückkartierung von EST-Klonen auf bestimmte PAC-Klone Transkripte aus der Region DGCR2 zu identifizieren. Die EST-Klone stammten aus den Karten der GeneMap 96 und GeneMap 98 (Deloukas et al. 1998). 13 EST-Klone konnten über Hybridisierungen auf die PAC-Klone des DGCR2-Contigs kartiert werden. Keiner der Klone besaß einen größeren offenen Leserahmen oder zeigte eine Sequenzähnlichkeit mit Genen aus der Datenbank. Dafür wurden teilweise repetitive Elemente in den EST-Klonen identifiziert. Da alle Klone über Poly-T-Primer generiert worden waren, war es wahrscheinlich, daß die EST-Klone nur den nicht-kodierenden 3' UTR der cDNAs beinhalteten. Die EST-Klone wurden daher teilweise über Hybridisierung einer ausplattierten cDNA-Bibliothek oder über RACE aus cDNA-Bibliotheken verschiedener Geweben in 5' Richtung verlängert. Die verlängerten cDNA-Klone zeigten jedoch ebensowenig einen größeren offenen Leserahmen oder Sequenzhomologien mit bereits bekannten Genen. Vielmehr wurden noch mehr repetitive Sequenzen im 5' Bereich nachgewiesen. Es war daher davon auszugehen, daß es sich bei allen zurückkartierten und verlängerten EST-Klonen entweder um Artefakte der cDNA-Bibliotheken handelte oder daß es zwar Sequenzen waren, die in der Zelle transkribiert werden aber nicht den Translationsprozeß durchlaufen (Normile und Pennisi 1999). Der Ansatz, mit Hilfe von ESTs an Kandidatengene zu gelangen, wurde nicht weiter verfolgt, da sich das öffentliche Humangenomprojekt zu der Zeit beschleunigte und die Aussicht bestand, daß die genomische Sequenz bald verfügbar sein sollte. Dem Sanger Centre wurden aus allen Contigs 18 PAC-Klone für die Sequenzierung übergeben. Allein acht Klone stammten aus dem proximalen DGCR2-Contig. Alle Klone wurden sequenziert und liegen zumindest als

unvollständige Sequenz vor. Die Sequenzen wurden mit einem Hilfsprogramm (T. M. Strom, Abteilung für medizinische Genetik, München) analysiert. Die proximale Grenze der Region DGCR2 wurde in dieser Arbeit durch den Patienten WAB definiert, jedoch konnte aufgrund einer weiteren Studie nicht ausgeschlossen werden, daß auch weiter proximal noch Gene für den beobachteten Phänotyp kartieren (Abb. 22, Kapitel 4.2.4.). Es wurden daher zwei zusätzliche BAC-Klone, die das PAC-Contig proximal verlängerten, in die Analyse aufgenommen. Die In-silico-Analyse zeigte, daß die Region sehr genarm sein muß. Eine Suche mit der translatierten genomischen Sequenz in einer Proteindatenbank ergab in den drei distalen Contigs lediglich zwei Treffer. Bei einem handelte es sich um ein Homolog des RNA-Polymerase-Elongationsfaktors III, P15-Untereinheit mit einer 86 %igen Identität. Der andere Treffer war ein Homolog des 60S Ribosomalen Proteins L29 mit allerdings nur 49 %iger Identität. Beide Sequenzen kartierten weit distal von der Region DGCR2, was sie als Kandidatengene unwahrscheinlich machte. Sie wurden daher nicht näher untersucht. Eine Suche in EST-Datenbanken ergab keine Treffer, so daß es sich u.U. nur um Pseudogene handelt. Das gleiche läßt sich über ein Homolog des 60S Ribosomalen Proteins L39 sagen, das im proximalen PAC-Contig 4 identifiziert wurde. Dieses Homolog hat nur eine Identität von 31 % und wurde in keiner EST-Datenbank gefunden. Es kartierte am distalen Ende des PAC-Contigs, lag aber nicht innerhalb der kritischen Region DGCR2. Im distalsten Contig wurde sowohl bei der Suche in cDNA- und EST-Datenbanken sowie in Proteindatenbanken ein Transposon identifiziert. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Klonierungsartefakt der PAC-Bibliothek. In der DGCR2-Deletionsregion wurden zwei Gene identifiziert. Beim ersten handelt es sich um das Gen für das RNA bindende Protein NAPOR, beim anderen um das Gen KIAA0019 (Abb. 11, Kapitel 3.3.). Neben diesen bereits als vollständige cDNA-Sequenzen in der Datenbank befindlichen Genen wurden noch mehrere expremierte Sequenzen in EST-Datenbanken identifiziert. Bei allen ESTs handelte es sich um vereinzelte Klone, ein größerer Cluster an Klonen für einen bestimmten EST, wie er für die Gene NAPOR und KIAA0019 mit jeweils über 100 Sequenzeinträgen existierte, war nicht darunter. Die EST-Klone hatten keinen signifikanten offenen Leserahmen und zeigten keine Homologien zu anderen Genen. Das NAPOR-Gen war zwar mit mehr als 100 EST-Einträgen in der Datenbank repräsentiert, wurde aber nicht im Rahmen des EST-Kartierungsansatzes auf das PAC-Contig zurückkartiert, da es erst in der aktualisierten Version der GeneMap 99 aufgeführt war und in den Versionen GeneMap 96 und GeneMap 98 fehlte. Das zweite Gen KIAA0019 war in der GeneMap 98 aufgeführt, und es wurde auch ein EST-Klon bei der

Zurückkartierung bearbeitet. Dieser kartierte aber etwas proximal zum PAC-Contig und wurde daher bei der Hybridisierung auf die PAC-Klone nicht identifiziert.

Diese Arbeit war Teil des öffentlichen Humangenomprojekts. Im Gegensatz zum privaten Sequenzierprojekt (Celera Genomics) (Venter et al. 2001), das das gesamte Genom in kleine Plasmidvektoren subklonierte und direkt sequenzierte, wurde im öffentlich finanzierten Humangenomprojekt ein Arbeitsschritt der Sequenzierung vorgeschaltet. Dort wurde das gesamte Genom in größere (120-150 kb) PAC- bzw. BAC-Klone kloniert und anschließend die Klone so geordnet, daß sie in Form von überlappenden Contigs beinahe das gesamte Genom überspannten. Möglichst minimal überlappende Klone wurden ausgewählt und in den Sequenzierzentren sequenziert. Damit hat das öffentliche Humangenomprojekt nicht nur die menschliche DNA-Sequenz allgemein zugänglich gemacht, sondern auch genomische Karten mit genau kartierten PAC- bzw. BAC-Klonen erstellt (Wolfsberg et al. 2001). Diese Karten haben unabhängig von der DNA-Sequenz eine Bedeutung bei verschiedenen Fragestellungen wie z.B. der hier durchgeführten Deletionskartierung bei Patienten mit partieller Monosomie 10p.

4.4.2. NAPOR als Kandidatengen für einen Herzfehler und T-Zelldefekt in Patienten mit partieller Monosomie 10p

4.4.2.1. NAPOR als Entwicklungsgen

Die In-silico-Analyse der genomischen Nukleotidsequenz des proximalen PAC-Contigs 4, auf das die Region DGCR2 kartiert worden war, identifizierte in der Region nur zwei Gene, NAPOR und KIAA0019. NAPOR ist im distalen Bereich des Contigs lokalisiert, KIAA0019 im proximalen Bereich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DGCR2 mit Hilfe der Patienten MEG und WAB kartiert (Abb. 22, Kapitel 4.2.4.). In dieser etwa 300 kb großen Region ist nur das Gen NAPOR lokalisiert, nicht KIAA0019, welches weiter proximal liegt. Diese Tatsache sowie die aus der Literatur bekannten Daten zu Funktion und Expression (s.u.) machten NAPOR zu einem guten Kandidatengen für die bei Patienten mit partieller Monosomie 10p beobachteten Herzfehler. Es wurde daher näher untersucht.

Die Herzfehler bei Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p betreffen häufig den Herzausflußtrakt, was im Einklang mit der Vermutung steht, daß es sich um einen Entwicklungsfelddefekt der 3. und 4. Schlundtaschen handelt, aus denen sich diese Teile des Herzens bilden. Es wurde ein Northern-Blot aus verschiedenen Herzstrukturen (Aorta, Herzspitze, linker und rechter Vorhof, linker und rechter Ventrikel) mit einer NAPOR-Sonde

hybridisiert. Strukturspezifische Signale wurden nicht erhalten. Es wurden vielmehr in allen vorhandenen Herzstrukturen sowie im gesamten adulten und foetalen Herz identische Hybridisierungssignale beobachtet. Neben einem Hauptsignal bei etwa 6 kb wurden weitere vier Signale von 9 kb, 5 kb, 4 kb und 1,5 kb mit geringerer Intensität beobachtet. Die Intensitätsverhältnisse waren in allen Herzgeweben identisch. Die Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Transkripten sind nicht bekannt, jedoch sind in der Datenbank drei verschiedene cDNAs für NAPOR zu finden, NAPOR-1, -2 und -3. Die drei Transkripte unterscheiden sich hauptsächlich im 5' Bereich des Gens, was zu alternativen N-terminalen Domänen in den Proteinen führt. Es ist zu vermuten, daß die drei Gene über spezifische Promotoren kontrolliert werden. Die funktionelle Bedeutung der Isoformen ist unklar und die identifizierten Transkripte auf den Northern-Blots deuten darauf hin, daß es noch weitere Isoformen geben muß. Da die Unterschiede zwischen den drei bekannten Transkripten NAPOR-1, -2 und -3 in der variablen N-terminalen Region liegen und nicht in den konservierten RNA-bindenden Motiven, kann man spekulieren, daß die Funktion durch Änderung einer Transaktivierungsdomäne oder durch Änderung der zellulären oder zeitlichen Expression der Gene modifiziert wird. Weitere Sequenzänderungen betreffen eine 6-Aminosäuredeletion in der Linker-Region von NAPOR-3 und eine 1360 kb Insertion im 3' UTR von NAPOR-3. In beiden Fällen handelt es sich um alternativ gespleißte Exons. Daß NAPOR für multiple mRNA-Formen kodiert, wurde auch von anderen Gruppen beobachtet. In Northern-Blots wurde eine Expression in verschiedenen Hirnregionen, im Herzen, im Muskel, im Eierstock, in der Lunge, im Pankreas, in der Plazenta und in peripheren Leukozyten nachgewiesen (Choi et al. 1998; Choi et al. 1999; Good et al. 2000). In diesen Publikationen wurde gezeigt, daß in verschiedenen Geweben spezifische mRNA-Formen expremiert werden. So wurde im Gehirn nur eine sehr lange mRNA nachgewiesen, im Herz und im Muskel dagegen zwei gleichlange mRNA-Formen, während im Herz zusätzlich noch ein kürzeres Transkript identifiziert wurde.

NAPOR wurde das erste Mal im Rahmen der Sequenzierung zufälliger Klone aus einer foetalen Herz cDNA-Bibliothek isoliert (Hwang et al. 1994). Später wurde es als Gen kloniert, das während der Apoptose von Neuroblastomzellen expremiert wird (Choi et al. 1998). Daher stammt die Bezeichnung NAPOR als **N**euroblastom **A**poptose induziertes **R**NA-bindendes Protein. Es existieren für das Gen zwei weitere Namen, ETR-3 (**E**lav-**T**yp **R**ibonukleoprotein **3**) und BRUNOL-3 (Good et al. 2000), was es als Homologes des Drosophila-Proteins Bruno ausweist. Bruno-Homologe werden in einer Vielzahl von Spezies gefunden, darunter in *C.elegans*, *Xenopus*, *Arabidopsis* sowie in den Säugern Mensch, Maus

und Ratte. Eine Suche in EST-Datenbanken mit der Drosophila-Bruno-Sequenz identifizierte sechs homologe Bruno-Gene im Menschen, BRUNOL-1-6. Die sechs Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert (Good et al. 2000). Die entsprechenden Proteine gehören zu einer Protein-Superfamilie von RNA-bindenden Proteinen (RBPs), die durch die Anwesenheit von RNA-Erkennungsmotiven (RRM) gekennzeichnet sind (Kenan et al. 1991). Die hochkonservierten RRM-Domänen werden aus 80-90 Aminosäuren gebildet und vermitteln die Interaktion mit RNA-Molekülen. Die Brunol-Proteine besitzen eine Domänenstruktur aus einer variablen N-terminalen Region, gefolgt von zwei aufeinanderfolgenden RRM-Domänen, einer variablen Linker-Region und einer dritten C-terminalen RRM-Domäne (Abb. 24). Ein Sequenzvergleich der variablen N-terminalen Regionen und der Linker-Regionen in den sechs humanen Proteinen BRUNOL-1-6 legte den Schluß nahe, daß die sechs Proteine in zwei Untergruppen eingeordnet werden können. Zur einen gehören die beiden Proteine BRUNOL-2 und 3, die über die gesamte Sequenz eine 80 %ige Identität aufweisen und zur anderen Gruppe die vier Proteine BRUNOL-1, 4-6 (Good et al. 2000). RNA-bindende Proteine besitzen viele Funktionen während der post-transkriptionalen Regulation der Genexpression (Siomi und Dreyfuss 1997) und sind u.a. bei der RNA-Prozessierung, dem mRNA-Transport, der mRNA-Stabilisierung und der mRNA-Translation beteiligt. Ihre Bedeutung bei der embryonalen Entwicklung zeigten Beispiele in verschiedenen Spezies wie Drosophila (Yao et al. 1993), C.elegans (Lundquist et al. 1996), Maus (Ebersole et al. 1996) und Pflanzen (Macknight et al. 1997), in denen mutierte RBPs zu Entwicklungsdefekten führten. Das Drosophila-Bruno-Protein hat bei der Keimzellentwicklung und der frühen Embryogenese eine Schlüsselfunktion. In spezifischen Regionen der Oozyte bindet es an die mRNA des Oskar-Gens und wirkt dabei als Translations-Suppressor für Oskar. Kann das Bruno-Protein die Oskar-mRNA nicht binden, weil z.B. die Sequenzen, die die Bindung der mRNA an das Protein vermitteln, deletiert sind, wird Oskar in der gesamten Oozyte expremiert und es entwickelt sich eine Oozyte mit zwei posterioren Polen (Ephrussi und Lehmann 1992; Kim-Ha et al. 1995). Die Tatsache, daß das homologe Drosophila-Gen Bruno ein Entwicklungsgen ist und daß andere RBPs in vielen Organismen wichtige Funktionen während der Entwicklung einnehmen, bekräftigte die Vermutung, daß auch NAPOR (respektive BRUNOL-3) ein Entwicklungsgen sein könnte, das im Falle einer Haploinsuffizienz einen Herzfehler beim Menschen verursacht. Es war mithin sowohl aufgrund der Lokalisation innerhalb der Region DGCR2, als auch aufgrund der zu vermutenden Funktion ein Kandidatengen für Herzfehler und/oder T-Zelldefekt in Patienten mit partieller Monosomie 10p.

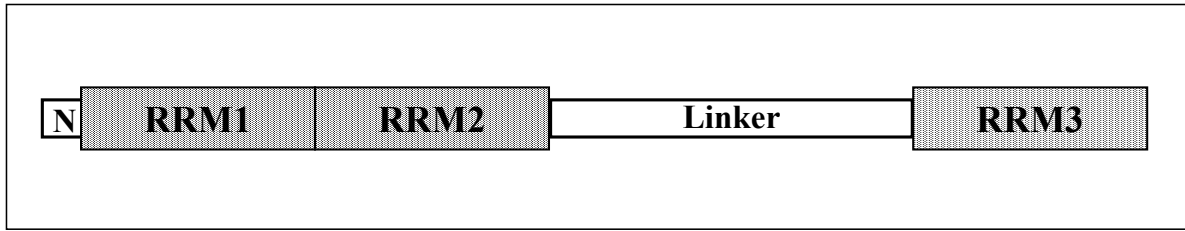


Abbildung 24: Schematischer Aufbau der Brunol-Proteine.

N - variable N-terminale Region; Linker - variable Verbindungsdomäne; RRM1,2,3 - RNA-Erkennungsmotive 1,2,3.

4.4.2.2. Expressionsprofil von NAPOR während der humanen Entwicklung

Über RNA-In-Situ-Hybridisierungen auf Schnitte humaner Embryos und Foeten wurde ein Expressionsmuster des NAPOR-Gens während der Entwicklung erstellt. Der jüngste untersuchte Embryo stammte aus dem Carnegie-Stadium C10 (22-23 Tage) und zeigte keine Expression. Eine Expression konnte ab dem Carnegie-Stadium C12 (26-30 Tage) und dann durchgehend in allen untersuchten Entwicklungsstadien bis zu einem 20 Wochen alten Foetus nachgewiesen werden. Besonders interessant war die Frage, ob NAPOR auch in den Geweben expremiert wird, in denen ein Entwicklungsdefekt bei Patienten gefunden wird, die für die Region DGCR2 hemizygot sind, nämlich dem Herz und dem Thymus. Eine Expression im Herz war bis auf eine Ausnahme (Foetus 9. Woche) überhaupt nicht nachweisbar. Dafür zeigte der Thymus ab dem Carnegie-Stadium C16 (37-42 Tage) bis zum Foeten der 18. Woche eine NAPOR-Expression. Diese Daten sprechen für eine Beteiligung von NAPOR bei der humanen Thymus-Entwicklung. In die kritische Region DGCR2 wurde neben einem Herzfehler auch ein T-Zelldefekt kartiert. Eine Entwicklungsstörung des Thymus könnte den T-Zelldefekt erklären. Für wenige Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p ist eine Thymus-Hypoplasie bzw. eine Thymus-Aplasie gezeigt worden. Da der Thymus schlecht beurteilt werden kann, außer ein operativer Eingriff wird durchgeführt, werden bei den meisten Patienten die vermeintlich sekundären T-Zelldefekte diagnostiziert. Die In-Situ-Expressionsdaten machten NAPOR zu einem Kandidatengen, das im Fall einer Haploinsuffizienz bei den Patienten zu einer Thymus-Hypoplasie/-Aplasie bzw. zu T-Zelldefekten führen kann. Daß ausgerechnet der Patient WAB, der in dieser Studie zusammen mit dem Patienten MEG die Region DGCR2 definiert (Abb. 22, Kapitel 4.2.4.), zwar einen Herzfehler aufweist, aber keinen T-Zelldefekt hat, spricht nicht gegen diese Hypothese. Vielmehr muß bei Deletionssyndromen ganz allgemein von einer sehr variablen Ausprägung des Phänotyps ausgegangen werden. Eine verminderte Penetranz ist in diesen Fällen nicht die

Ausnahme sondern die Regel (Abb. 20, Kapitel. 4.2.1). Die Tatsache, daß bis auf einen Foeten der 9. Woche keine Expression im Herz nachgewiesen werden konnte, ist überraschend, da die cDNA zu erst aus einer foetalen Herz cDNA-Bibliothek isoliert wurde (Hwang et al. 1994). Die Hybridisierungssonde wurde in den 3' UTR gelegt und sollte mit allen drei bekannten NAPOR-Isoformen Hybridisierungssignale ergeben. Die Sonde erkannte auf einem Northern-Blot auch mehrere Transkripte im foetalen Herz (Abb. 13, Kapitel 3.5.1.1.). Dies schließt nicht aus, daß eine foetale Expression im Herz nur in einer kurzen Periode stattfindet, vielleicht nur um die 9. Woche, wie die In-Situ-Hybridisierungsdaten es erscheinen ließen, so daß die Signale auf dem Northern-Blot von Foeten aus diesem Entwicklungsstadium stammten. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß in anderen Stadien der embryonalen und foetalen Entwicklung spezifische bisher noch nicht entdeckte Isoformen expremiert werden, die mit der Hybridisierungssonde nicht erkannt wurden. EST-Klone aus mehr als 20 Geweben wurden in einer Datenbanksuche mit der NAPOR-Sequenz identifiziert. Das steht im Einklang mit der Tatsache, daß bei der In-Situ-Hybridisierung eine Expression in verschiedenen embryonalen und foetalen Strukturen gefunden wurde. Neben einer Expression im Thymus gehörten dazu eine Expression im Neuralrohr, in der Urniere und Niere, in den Ohr- und Augenanlagen und in der Retina, in der Lunge, in Muskelschichten des Magens und Darms und auch in verschiedenen Strukturen des Gehirns und Rückenmarks. In den beiden letztgenannten Organsystemen wurde auch eine Napor-Expression im Maus-Embryo gezeigt (Choi et al. 1999). All diese Strukturen sind bei Patienten mit partieller Monosomie 10p normalerweise nicht betroffen. Eine halbe Dosis führt in diesen Organen demnach nicht zu Entwicklungsdefekten, vielleicht weil eine Kompensation durch andere Gene stattfindet. Ein Gen, das hierfür in Frage käme, wäre BRUNOL-2 (respektive CUGBP), das mit NAPOR (respektive BRUNOL-3) eine 80 %ige Identität auf Proteinebene aufweist und das ubiquitär expremiert wird (Good et al. 2000).

4.4.2.3. Mutationsuntersuchung im NAPOR-Gen

Der Nachweis einer Expression in embryonalen und foetalen Geweben, die bei Entwicklungsdefekten betroffen sind, kann ein Gen zwar zu einem guten Kandidaten für die Ursache der Defekte machen, aber ein Beweis kann damit nicht erbracht werden. Das zuverlässigste Ergebnis, um ein Gen einer Krankheit zuzuordnen, ist der Nachweis von Gen-Mutationen in Patienten. Obwohl in der In-Situ-Hybridisierung eine starke Expression im Herzen während der Embryogenese nicht gezeigt werden konnte, weisen Daten aus der Literatur darauf hin, daß NAPOR bei der Entwicklung des Herzens eine entscheidende Rolle spielen könnte. NAPOR reguliert das alternative Spleißen spezifischer Gene, die während der

Herzentwicklung benötigt werden (Ladd et al. 2001). Die In-Situ-Hybridisierungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten dagegen eine NAPOR-Expression im Thymus verschiedener Entwicklungsstadien, was auf eine Rolle des Gens bei der Thymusentwicklung hinweist. Faßt man die Ergebnisse zusammen, so ist NAPOR ein gutes Kandidatengen für die mit der Haploinsuffizienzregion DGCR2 assoziierten Symptome Herzfehler und T-Zelldefekt oder Thymus-Hypoplasie/Aplasie. Wir untersuchten daher 109 Patienten, die in das DGS-Symptomenspektrum paßten, auf Mutationen im NAPOR-Gen. Keiner der Patienten besaß eine Mikrodeletion 22q11 oder eine partielle Monosomie 10p. Die Mehrzahl der Patienten wurde aufgrund ihrer Herzfehler in die Untersuchung aufgenommen. Die Diagnose einer Thymus-Hypoplasie ist schwierig und kann meist nur bei einer Operation eindeutig aufgestellt werden. Patienten mit Thymus-Hypoplasie sind selten und in der Mutationsstudie hatten nur acht Patienten dieses Symptom. Es wurden 11 Sequenzvarianten identifiziert, die entweder im nicht-kodierenden Teil des Gens lokalisiert waren und keine Spleißstellen beinhalteten oder stille Mutationen waren. Außerdem wurden alle Varianten in mehreren Patienten gefunden, so daß von Polymorphismen auszugehen war. Mutationen im NAPOR-Gen wurden nicht identifiziert. Dies kann zum einen an technischen Limitierungen der PCR basierten Untersuchungsmethode liegen, die es beispielsweise unmöglich machte, intragene Deletionen zu identifizieren, zum anderen können Mutationen in regulatorischen Bereichen des Gens nicht ausgeschlossen werden. NAPOR ist ein Gen mit mehreren Isoformen, die normalerweise auf unterschiedliche Spleißvarianten zurückzuführen sind (Choi et al. 1998). Während der Herzentwicklung vollzieht sich ein Wechsel von hochmolekularen zu niedermolekularen Isoformen (Ladd et al. 2001). Es ist möglich, daß bei der Mutationsuntersuchung bisher unbekannte Exons nicht untersucht wurden, die spezifisch im entwickelnden Herzen oder Thymus expremiert werden. Der Phänotyp des DiGeorge-Syndroms kann daneben auch durch nicht-genetische Faktoren verursacht werden. So ist bekannt, daß Teratogene wie Alkohol und Retinoide oder Krankheiten wie ein mütterlicher Diabetes zu diesem Fehlbildungssyndrom führen können (Ammann et al. 1982; Lammer and Opitz 1986; Wilson et al. 1993b). Außerdem ist insbesondere das Symptom eines angeborenen Herzfehlers sehr heterogen. Unter dieser Voraussetzung war die Zahl der untersuchten Patienten wahrscheinlich zu klein, um Mutationen im NAPOR-Gen zu erwarten. Das Ergebnis der Mutationssuche ist in Übereinstimmung mit der Situation auf Chromosom 22q11. Auch dieser Locus ist mit einem Herzfehler assoziiert und Mutationsuntersuchungen in verschiedenen Genen aus dieser Regionen identifizierten bisher keine Patienten mit Mutationen (Chieffo et al. 1997; Funke et al. 1997; Gong et al. 1997; Lindsay et al. 2001).

Selbst im Gen TBX-1, von dem vor kurzem gezeigt wurde, daß im Mausmodell eine Tbx-1-Haploinsuffizienz zu einem Herzfehler führt, wurden in mehr als 100 Patienten ohne Mikrodeletion 22q11 keine Mutationen gefunden (Gong et al. 1997; Lindsay et al. 2001).

4.4.2.4. Die Haploinsuffizienzregion DGCR2: Auf dem Weg zur Identifizierung von Kandidatengen für Herzfehler und T-Zelldefekt

Eine Haploinsuffizienz der Region DGCR2 ist mit einem Herzfehler und einer Thymus-Hypoplasie/Aplasie oder einem T-Zelldefekt assoziiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die kritische Region auf etwa 300 kb eingegrenzt. Bisher wurde nur das NAPOR-Gen in dieses Intervall kartiert. Dies und die Tatsache, daß NAPOR während der Herz- und Thymusentwicklung in diesen Organen expremiert wird, machte es zu einem guten Kandidatengen für den bei Patienten mit partieller Monosomie 10p beobachteten Phänotyp. Patient WAB mit einer terminalen 10p-Deletion, der die proximale Grenze der Region DGCR2 definierte, zeigte einen Herzfehler. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß es auf 10p mehrere Regionen gibt, die einen Herzfehler verursachen, und daß der Herzfehler des Patienten WAB Folge einer Haploinsuffizienz eines Gens distal der DGCR2 ist. Auf der anderen Seite ist es auch möglich, daß WAB aufgrund eines Positionseffektes einen Herzfehler zeigt. Damit wäre die Region DGCR2 größer als 300 kb und würde sich weiter proximal erstrecken, so wie sie ursprünglich durch die Patienten MEG und P1/P2 definiert worden war (Daw et al. 1996) (Abb. 22, Kapitel 4.2.4.). In diese etwa 2 Mb große Region sind neben NAPOR noch sechs weitere Gene lokalisiert. Das zu NAPOR proximal kartierte Gen KIAA0019 ist wie NAPOR selbst mit einer Größe von etwa 400 kb ein sehr großes Gen. Es wurde ursprünglich aus einer unreifen myeloischen Zelllinie isoliert (Nomura et al. 1994) und später als ein Gen identifiziert, das das EGFR-Substrat Eps8 über dessen SH3-Domänen bindet (Matoskova et al. 1996). Da es mit der N-terminalen Region des Onkogens TRE eine Homologie aufweist, wurde es RNTRE (**r**elated to the **N** terminus of **TRE**) genannt. Es wurde gezeigt, daß dieses Protein ein GTPase aktivierendes Protein des Rab5-Typs ist und im EGFR-Signalweg involviert ist (Lanzetti et al. 2000). Bei einer Suche mit der Nukleotidsequenz in EST-Datenbanken wurden Klone aus vielen verschiedenen Geweben identifiziert, was auf eine fast ubiquitäre Expression von KIAA0019 (respektive RNTRE) schließen läßt. Die verfügbaren Daten über Funktion und Expression machen KIAA0019 nicht unbedingt zu einem Kandidatengen für den Phänotyp eines angeborenen Herzfehlers und/oder T-Zelldefekts. Unter den weiteren fünf in die Nähe der Region DGCR2 kartierten Genen befindet sich eines, das für ein Enzym kodiert, welches bei der RNA-

Prozessierung eine Rolle spielt (RENT-2) und eines, das für eine ADP-Zucker-Hydrolase kodiert (NUDT-5). Außerdem sind in der Region die Gene für eine Proteinkinase vom CamKI-Typ (LOC57118), für ein TNF-Alpha induzierbares Protein (FIP-2) und für einen Initiationsfaktor der DNA-Replikation (HsMCM10) identifiziert worden. Ähnlich wie bei NAPOR könnte über eine In-Situ-Hybridisierung untersucht werden, in welchen Organen diese Gene während der embryonalen und foetale Entwicklung expremiert werden. Gene, die von ihrem Expressionsprofil zum Phänotyp der DGCR2-Haploinsuffizienz passen, könnten wieder in ausgewählten Patienten nach Mutationen durchsucht werden. Falls keine Mutationen gefunden werden, bleibt noch die Möglichkeit heterozygote +/- KO-Mäuse zu generieren und den Maus-Phänotyp mit dem humanen Phänotyp zu vergleichen. Dies war ein erfolgreicher Ansatz beim DGS-Locus auf Chromosom 22q11. Dort wurde gezeigt, daß Tbx-1 +/- Mäuse die für das DiGeorge-Syndrom typischen Herzfehler entwickeln (Jerome and Papaioannou 2001; Lindsay et al. 2001; Merscher et al. 2001).

4.5. PAX-9 als Kandidatengen für das DiGeorge-Syndrom

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Patienten untersucht, die eine zytogenetische interstitielle Deletion im proximalen Bereich des Chromosoms 14q aufwiesen. Die schweren craniofazialen Fehlbildungen dieser Patienten sind wahrscheinlich die Folge einer Haploinsuffizienz dieser Chromosomenregion. PAX-9, ein Entwicklungsgen aus der PAX-Genfamilie, wurde in diese Region kartiert (Stapleton et al. 1993). In beiden Patienten wurde zum ersten Mal eine PAX-9-Hemizygotie mittels FISH und Dosis-Blot direkt nachgewiesen. Pax-9 wird während der Maus-Embryogenese im endodermalen Epithelium der Schlundtaschen, in der Wirbelsäule und in begrenzten Regionen des Mesenchyms von Gesicht und Gliedmaßen expremiert (Neubuser et al. 1995). Homozygote Pax-9 -/- KO-Mäuse zeigen eine Vielzahl von Fehlbildungen, darunter eine Agenesie des Thymus, der Parathyreoideae und der Zähne, sowie eine Gaumenspalte (Peters et al. 1998). Damit ähnelt das Mausmodell dem DiGeorge-Syndrom beim Menschen. Hemizygotie Pax-9 +/- Mäuse zeigen keine Fehlbildungen, was gegen eine Beteiligung von PAX-9 bei der Ausbildung der craniofazialen Fehlbildungen in den beiden Patienten spricht, da sie hemizygot für PAX-9 sind. Allerdings zeigen andere Vertreter der PAX-Familie auch unterschiedliche Phänotypen in Maus und Mensch. So führt ein heterozygoter Funktionsverlust von PAX-6 zu Microphthalmie bei Mäusen (*small eye, sey*), aber zu Anirdia mit normaler Augengröße beim Menschen (Glaser et al. 1992; Hill et al. 1991). Mutationen im PAX-2 sind beim Menschen mit Kolobomen und Nieren-Fehlbildungen assoziiert (Sanyanusin et al. 1995). Dieselbe

Basendeletion führt in der Maus zu ähnlichen Augen- und Nieren-Fehlbildungen, zusätzlich aber noch zu Hirn- und Ohr-Fehlbildungen, die beim Menschen nicht gefunden werden (Favor et al. 1996). Mutationen im PAX-3-Gen, die eine verminderte DNA-Bindekapazität des Proteins zur Folge haben, verursachen im heterozygoten Fall Pigmentstörungen der Haut in Mäusen (*splotch*, *sp*) und Menschen (Waardenburg-Syndrom I und III). Dagegen werden die Innenohr-Anomalien und der Hörverlust, die häufig beim Waardenburg-Syndrom auftreten, in Mausmutanten nicht beobachtet. Diese Beispiele zeigen, daß eine normale Entwicklung von hemizygoten Pax-9 +/- KO Mäusen nicht ausschließt, daß die beobachteten Fehlbildungen beim Menschen durch eine PAX-9-Haploinsuffizienz verursacht werden. Der Phänotyp ähnelt in jedem Fall nicht dem des DiGeorge-Syndroms. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß sich wie bei dem Mausmodell beim Menschen erst bei einer homozygoten PAX-9-Deletion bzw. als Folge von Mutationen auf beiden PAX-9-Allelen Symptome des DiGeorge-Syndroms ausbilden. Ein vollständiger Verlust des PAX-9-Gens wäre vermutlich letal und Symptome des DiGeorge-Syndroms daher nur in Foeten nachweisbar.

Deletionen im proximalen Bereich des Chromosoms 14q sind neben den beiden untersuchten Patienten in acht weiteren Fällen publiziert (Bruyere et al. 1996; Chen et al. 1997; Govaerts et al. 1996; Grammatico et al. 1994; Levin and Surana 1991; Shapira et al. 1994b). Bis auf unspezifische Symptome wie Wachstumsretardierung und psychomotorische Retardierung variieren die Phänotypen der Patienten beträchtlich. Das Fehlen eines gemeinsamen Musters von Fehlbildungen und Organdefekten spiegelt die unterschiedlichen Deletionsregionen in den Patienten wider. Die beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten hatten mit zwei weiteren Patienten die proximalsten Deletionen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Promotionsarbeit beschäftigt sich vorwiegend mit der Untersuchung von Patienten mit partieller Monosomie 10p. Der Phänotyp dieser Patienten ähnelt häufig dem des DiGeorge-Syndroms. Neben fazialen Dysmorphien und weiteren Nebensymptomen ist die Symptomentrias Herzfehler, T-Zelldefekt und Hypoparathyreoidismus das typische Merkmal dieses Entwicklungsdefektes. Viele Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p zeigen diese Symptome, was für einen DiGeorge-Syndrom-Locus auf Chromosom 10p spricht. Der Hauptlocus für das DiGeorge-Syndrom liegt jedoch auf Chromosom 22q11. Mehr als 90 % der DiGeorge-Syndrom-Patienten haben eine Mikrodeletion 22q11. Diese Mikrodeletion zählt mit einer Frequenz von etwa 1/4000 zu den häufigsten Deletionen beim Menschen überhaupt und ist deshalb schon seit langem das Ziel intensiver Forschungstätigkeit. Dennoch ist es erst in der jüngsten Zeit gelungen, zumindest ein Gen aus der Mikrodeletionsregion 22q11 (TBX-1) zu isolieren, welches für den beobachteten Herzfehler verantwortlich sein könnte. Ansonsten sind die molekularen Ursachen dieses Entwicklungsdefektes noch immer weitgehend unbekannt. Die Deletionen auf Chromosom 10p sind sehr selten. Sie sind aber von wissenschaftlichem Interesse, da die molekulare Aufklärung dieser Region zu einem tieferen Verständnis der Pathogenese des DiGeorge-Syndroms und isolierter Fehlbildungen insgesamt beitragen kann.

Im ersten Teil der Arbeit wurden 16 Patienten mit partieller Monosomie 10p zytogenetisch und molekulargenetisch untersucht. Elf dieser Patienten zeigten einen DiGeorge-Syndrom ähnlichen Phänotyp, fünf Patienten wurden nicht in das DiGeorge-Syndrom-Krankheitsbild eingeordnet. Die Patienten besaßen terminale und interstitielle Deletionen im Größenbereich von 13-48 cM. Mit Hilfe von FISH mit genomischen YAC-, PAC- und BAC-Sonden wurden die Bruchpunktregionen in den Patienten bestimmt. Bei einigen Patienten, bei denen DNA der Eltern vorlag, konnte auch eine Genotypisierung mit polymorphen Markern aus der Region vorgenommen werden. Mittels zweier Patienten konnte eine Haploinsuffizienzregion (DGCR2) kartiert werden, die für den Herzfehler und den T-Zelldefekt verantwortlich sein sollte. Die Region DGCR2 ist um den Marker D10S585 lokalisiert und besitzt eine minimale Ausdehnung von etwa 300 kb. Eine genaue Genotyp-Phänotyp-Analyse unter Einbeziehung von Patienten aus der Literatur zeigte jedoch, daß der gesamte Phänotyp der partiellen Monosomie 10p nicht mit der Haploinsuffizienz nur einer Region erklärt werden konnte, sondern daß zumindest noch ein zweiter Locus (HDR1) deletiert sein mußte. Dieser Locus war mit dem typischen DiGeorge-Syndrom-Symptom des Hypoparathyreoidismus assoziiert.

Zusätzlich kartierten in diesen Locus noch eine sensorineurale Taubheit und Nierendefekte. Patienten mit diesen drei Symptomen leiden an einem HDR-Syndrom. Dieser zweite Haploinsuffizienzlocus HDR1 kartiert etwa 3 Mb distal zur Region DGCR2.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde sowohl über die Region DGCR2 als auch über die HDR1-Region ein PAC/BAC-Contig etabliert. Ausgewählte Klone aus den Contigs wurden im Rahmen des Humangenomprojekts vom Sanger Centre sequenziert.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der molekulargenetischen Untersuchung der beiden Haploinsuffizienzregionen DGCR2 und HDR1. Es konnten 12 EST-Klone in die Region DGCR2 kartiert werden. Bei allen Klonen handelte es sich um Transkripte, die nicht zu funktionellen Proteinen translatiert wurden. Nachdem die genomische Sequenz zugänglich war, konnte eine In-silico-Analyse dieser Region durchgeführt werden. Es handelt sich um eine sehr genarme Region. In die minimale Region DGCR2 kartiert nur das Gen NAPOR, das für ein RNA bindendes Protein kodiert. Es wurde als Kandidatengen für den mit dieser Region assoziierten Herzfehler und T-Zelldefekt näher charakterisiert. Eine Northern-Blot-Hybridisierung zeigte eine Expression in allen aufgetragenen Herzgeweben. Es wurden mindestens sechs verschiedene Transkripte identifiziert, was für die Existenz mehrerer Isoformen des Gens spricht. RNA-in-situ-Hybridisierungen auf Schnitte humaner Embryos und Foeten ergaben eine Genexpression in verschiedenen Geweben beginnend von Embryos des Carnegie-Stadiums C12 bis zu 18 Wochen alten Foeten. Es wurde eine Expression im Thymus vom Carnegie-Stadium C16 an und eine Expression im Herzen bei einem Foetus der 9. Woche beobachtet. Das Expressionsmuster machte NAPOR zu einem guten Kandidatengen für den mit der Haploinsuffizienzregion DGCR2 assoziierten Herzfehler und T-Zelldefekt. Mutationsanalysen in mehr als 100 Patienten ergaben keine Mutationen im NAPOR-Gen. Die meisten untersuchten Patienten besaßen einen DiGeorge-Syndrom ähnlichen Phänotyp waren aber zytogenetisch normal. Besonderer Wert wurde auf die Anwesenheit eines Herzfehlers gelegt. Nur bei etwa 10 % der untersuchten Patienten lag auch eine Thymus-Hypoplasie vor. Ein direkter Beweis für die Beteiligung des NAPOR-Gens am Herzfehler und/oder T-Zelldefekt bei Patienten mit partieller Monosomie 10p steht noch aus.

Die HDR1-Region konnte mit Hilfe zweier Mikrodeletionspatienten auf etwa 200 kb eingegrenzt werden. In diese Region kartiert das Gen GATA-3. Mutationsanalysen in zytogenetisch normalen HDR-Patienten zeigten in drei Patienten Mutationen, die zu einem funktionslosen GATA-3-Protein führen. Damit wurde der Beweis erbracht, daß das HDR-Syndrom eine Einzelgenerkrankung ist und daß die Symptome Hypoparathyreoidismus,

sensorineurale Taubheit und Nierendefekte bei Patienten mit partieller Monosomie 10p auf eine Haploinsuffizienz des GATA-3-Gens zurückzuführen sind.

Zusätzlich zu Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p wurden auch zwei Patienten näher charakterisiert, die eine interstitielle Deletion auf dem Chromosom 14q11-q13 aufwiesen. Diese Region war von Interesse, da das Gen PAX-9 dorthin kartiert und homozygote Pax9 $-/-$ Knockout-Mäuse unter anderem eine Thymus-Hypoplasie und einen Hypoparathyreoidismus zeigen. Die Mäuse haben zwei der drei Leitsymptome des DiGeorge-Syndroms und stellen eine Beziehung zum Phänotyp der partiellen Monosomie 10p her. Die Deletionsbruchpunktregionen der beiden Patienten wurden über eine Genotypisierung mit polymorphen Markern identifiziert. Mit Hilfe eines Dosis-Blots und einer FISH-Analyse konnte gezeigt werden, daß beide Patienten für PAX-9 hemizygot waren. Beide Patienten zeigen keine Symptome des DiGeorge-Syndroms, was daraufhin weist, daß beim Menschen eine PAX-9-Haploinsuffizienz nicht zu einem DiGeorge-Syndrom ähnlichen Phänotyp führt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an Patienten mit partieller Monosomie 10p und an Patienten mit einer interstitiellen Deletion 14q11-q13 lieferten einen Beitrag zur molekulargenetischen Charakterisierung des DiGeorge-Syndroms. Der DiGeorge-Syndrom ähnliche Phänotyp bei vielen Patienten mit einer partiellen Monosomie 10p ist das Resultat eines *Contiguous Gene* Syndroms, bei dem mindestens zwei unabhängige Regionen (DGCR2 und HDR1) auf Chromosom 10p hemizygot vorliegen müssen. Es wurde gezeigt, daß eine GATA-3-Haploinsuffizienz u.a. zu einem Hypoparathyreoidismus führt, einem der drei Leitsymptome des DiGeorge-Syndroms. Für den mit dem Syndrom assoziierten Herzfehler und T-Zelldefekt wurde mit NAPOR ein gutes Kandidatengen aus der Haploinsuffizienzregion DGCR2 identifiziert und charakterisiert. Eine Haploinsuffizienz des PAX-9-Gens auf Chromosom 14q12 führt zu keinem DiGeorge-Syndrom beim Menschen.

6. Literaturverzeichnis

- Aminoff M, Carter JE, Chadwick RB, Johnson C, Grasbeck R, Abdelaal MA, Broch H, Jenner LB, Verroust PJ, Moestrup SK, de la Chapelle A, Krahe R (1999) Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nat Genet* 21: 309-13
- Aminoff M, Tahvanainen E, Grasbeck R, Weissenbach J, Broch H, de la Chapelle A (1995) Selective intestinal malabsorption of vitamin B12 displays recessive mendelian inheritance: assignment of a locus to chromosome 10 by linkage. *Am J Hum Genet* 57: 824-31
- Ammann AJ, Wara DW, Cowan MJ, Barrett DJ, Stiehm ER (1982) The DiGeorge syndrome and the fetal alcohol syndrome. *Am J Dis Child* 136: 906-8
- Antonarakis SE (1998) Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 11: 1-3
- Augousseau S, Jouk S, Jalbert P, Prieur M (1986) DiGeorge syndrome and 22q11 rearrangements. *Hum Genet* 74: 206
- Bartsch O, Wagner A, Hinkel GK, Lichtner P, Murken J, Schuffenhauer S (1999) No evidence for chromosomal microdeletions at the second DiGeorge syndrome locus on 10p near D10S585 [letter]. *Am J Med Genet* 83: 425-6
- Bilous RW, Murty G, Parkinson DB, Thakker RV, Coulthard MG, Burn J, Mathias D, Kendall-Taylor P (1992) Brief report: autosomal dominant familial hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal dysplasia. *N Engl J Med* 327: 1069-74
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23
- Botta A, Lindsay EA, Jurecic V, Baldini A (1997) Comparative mapping of the DiGeorge syndrome region in mouse shows inconsistent gene order and differential degree of gene conservation [published erratum appears in *Mamm Genome* 1998 Apr;9(4):344]. *Mamm Genome* 8: 890-5
- Breukel C, Wijnen J, Tops C, v.d. Klift H, Dauwerse H, Khan PM (1990) Vector-Alu PCR: a rapid step in mapping cosmids and YACs. *Nucleic Acids Res* 18: 3097

- Brown SA, Warburton D, Brown LY, Yu CY, Roeder ER, Stengel-Rutkowski S, Hennekam RC, Muenke M (1998) Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. *Nat Genet* 20: 180-3.
- Bruyere H, Favre B, Douvier S, Nivelon-Chevalier A, Mugneret F (1996) De novo interstitial proximal deletion of 14q and prenatal diagnosis of holoprosencephaly. *Prenat Diagn* 16: 1059-60.
- Burn J (1999) Closing time for CATCH22. *J Med Genet* 36: 737-8
- Carey AH, Kelly D, Halford S, Wadey R, Wilson D, Goodship J, Burn J, Paul T, Sharkey A, Dumanski J, et al. (1992) Molecular genetic study of the frequency of monosomy 22q11 in DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 51: 964-70
- Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboah K, Warburton D, Scambler P, Shprintzen R, Kucherlapati R, Morrow BE (1997) Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet* 61: 620-9
- Chaplin T, Ayton P, Bernard OA, Saha V, Della Valle V, Hillion J, Gregorini A, Lillington D, Berger R, Young BD (1995a) A novel class of zinc finger/leucine zipper genes identified from the molecular cloning of the t(10;11) translocation in acute leukemia. *Blood* 85: 1435-41
- Chaplin T, Bernard O, Beverloo HB, Saha V, Hagemeijer A, Berger R, Young BD (1995b) The t(10;11) translocation in acute myeloid leukemia (M5) consistently fuses the leucine zipper motif of AF10 onto the HRX gene. *Blood* 86: 2073-6
- Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE (1996) Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn* 206: 379-90.
- Chen CP, Lee CC, Chen LF, Chuang CY, Jan SW, Chen BF (1997) Prenatal diagnosis of de novo proximal interstitial deletion of 14q associated with cebocephaly. *J Med Genet* 34: 777-8.
- Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, Emanuel BS, Budarf ML (1997) Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics* 43: 267-77.

- Chisaka O, Capecchi MR (1991) Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5* [see comments]. *Nature* 350: 473-9
- Choi DK, Ito T, Mitsui Y, Sakaki Y (1998) Fluorescent differential display analysis of gene expression in apoptotic neuroblastoma cells. *Gene* 223: 21-31.
- Choi DK, Ito T, Tsukahara F, Hirai M, Sakaki Y (1999) Developmentally-regulated expression of mNapor encoding an apoptosis- induced ELAV-type RNA binding protein. *Gene* 237: 135-42.
- Chumakov IM, Rigault P, Le Gall I, Bellanne-Chantelot C, Billault A, Guillou S, Soularue P, Guasconi G, Poullier E, Gros I, et al. (1995) A YAC contig map of the human genome. *Nature* 377: 175-297
- Cohen D, Chumakov I, Weissenbach J (1993) A first-generation physical map of the human genome. *Nature* 366: 698-701
- Cooper MD, Peterson RDA, Good RA (1965) A new concept of the cellular basis of immunology. *J Pediat* 67: 907-908
- Cowchock S (1989) Apparently balanced chromosome translocations and midline defects [letter]. *Am J Med Genet* 33: 424
- Dasouki M, Jurecic V, Phillips JA, 3rd, Whitlock JA, Baldini A (1997) DiGeorge anomaly and chromosome 10p deletions: one or two loci? *Am J Med Genet* 73: 72-5
- Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SC, Jenkins SC, Palmer SM, et al. (1994) A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes [see comments]. *Nature* 371: 130-6
- Daw SC, Taylor C, Kraman M, Call K, Mao J, Schuffenhauer S, Meitinger T, Lipson T, Goodship J, Scambler P (1996) A common region of 10p deleted in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Nat Genet* 13: 458-60
- de la Chapelle A, Herva R, Koivisto M, Aula P (1981) A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet* 57: 253-6
- Debacker C, Catala M, Labastie MC (1999) Embryonic expression of the human GATA-3 gene. *Mech Dev* 85: 183-7.
- Deloukas P, Schuler GD, Gyapay G, Beasley EM, Soderlund C, Rodriguez-Tome P, Hui L, Matisse TC, McKusick KB, Beckmann JS, Bentolila S, Bihoreau M, Birren BB,

- Browne J, Butler A, Castle AB, Chiannikulchai N, Clee C, Day PJ, Dehejia A, Dibling T, Drouot N, Duprat S, Fizames C, Bentley DR, et al. (1998) A physical map of 30,000 human genes. *Science* 282: 744-6
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites [see comments]. *Nature* 380: 152-4
- DiGeorge AM, Harley RD (1965) The association of aniridia, Wilms's tumor, and genital abnormalities. *Trans Am Ophthalmol Soc* 63: 64-9
- Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS (1992) A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet* 50: 924-33
- Driscoll DA, Salvin J, Sellinger B, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Emanuel BS (1993) Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J Med Genet* 30: 813-7
- Dutrillaux B, Couturier J (1983) The ancestral karyotype of Carnivora: comparison with that of platyrrhine monkeys. *Cytogenet Cell Genet* 35: 200-8
- Ebersole TA, Chen Q, Justice MJ, Artzt K (1996) The quaking gene product necessary in embryogenesis and myelination combines features of RNA binding and signal transduction proteins. *Nat Genet* 12: 260-5.
- Elliot D, Thomas GH, Condron CJ, Khuri N, Richardson F (1970) C-group chromosome abnormality (?10-). *Am J Dis Child* 119: 72-73
- Ephrussi A, Lehmann R (1992) Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 358: 387-92.
- Erdel M, Baier-Bitterlich G, Duba C, Isakov N, Altman A, Utermann G, Baier G (1995) Mapping of the human protein kinase C-theta (PRKCQ) gene locus to the short arm of chromosome 10 (10p15) by FISH. *Genomics* 25: 595-7
- Faraone SV, Matisse T, Svrakic D, Pepple J, Malaspina D, Suarez B, Hampe C, Zambuto CT, Schmitt K, Meyer J, Markel P, Lee H, Harkavy Friedman J, Kaufmann C, Cloninger CR, Tsuang MT (1998) Genome scan of European-American schizophrenia pedigrees:

- results of the NIMH Genetics Initiative and Millennium Consortium. *Am J Med Genet* 81: 290-5
- Faraone SV, Meyer J, Matisse T, Svrakic D, Pepple J, Malaspina D, Suarez B, Hampe C, Chan G, Aelony A, Friedman JH, Kaufmann C, Cloninger CR, Tsuang MT (1999) Suggestive linkage of chromosome 10p to schizophrenia is not due to transmission ratio distortion. *Am J Med Genet* 88: 607-8
- Favor J, Sandulache R, Neuhauser-Klaus A, Pretsch W, Chatterjee B, Senft E, Wurst W, Blanquet V, Grimes P, Sporle R, Schughart K (1996) The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13870-5.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- Foroud T, Castelluccio PF, Koller DL, Edenberg HJ, Miller M, Bowman E, Rau NL, Smiley C, Rice JP, Goate A, Armstrong C, Bierut LJ, Reich T, Detera-Wadleigh SD, Goldin LR, Badner JA, Guroff JJ, Gershon ES, McMahon FJ, Simpson S, MacKinnon D, McInnis M, Stine OC, DePaulo JR, Blehar MC, Nurnberger JI, Jr. (2000) Suggestive evidence of a locus on chromosome 10p using the NIMH genetics initiative bipolar affective disorder pedigrees. *Am J Med Genet* 96: 18-23
- Fryns JP, De Muelenaere A, Van den Berghe H (1981) Distal 10p deletion syndrome. *Ann Genet* 24: 189-90
- Fukushima Y, Ohashi H, Wakui K, Nishida T, Nakamura Y, Hoshino K, Ogawa K, Oh-ishi T (1992) Possibility of the fourth chromosome region responsible for DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 51: A80
- Funke B, Saint-Jore B, Puech A, Sirotkin H, Edelmann L, Carlson C, Raft S, Pandita RK, Kucherlapati R, Skoultschi A, Morrow BE (1997) Characterization and mutation analysis of goosecoid-like (GSCL), a homeodomain-containing gene that maps to the critical region for VCFS/DGS on 22q11. *Genomics* 46: 364-72
- Galili N, Baldwin HS, Lund J, Reeves R, Gong W, Wang Z, Roe BA, Emanuel BS, Nayak S, Mickanin C, Budarf MI, Buck CA (1997) A region of mouse chromosome 16 is syntenic to the DiGeorge, velocardiofacial syndrome minimal critical region. *Genome Res* 7: 399

- George KM, Leonard MW, Roth ME, Lieuw KH, Kioussis D, Grosveld F, Engel JD (1994) Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* 120: 2673-86.
- Glaser T, Walton DS, Maas RL (1992) Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet* 2: 232-9.
- Gong W, Emanuel BS, Galili N, Kim DH, Roe B, Driscoll DA, Budarf ML (1997) Structural and mutational analysis of a conserved gene (DGSI) from the minimal DiGeorge syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 6: 267-76
- Good PJ, Chen Q, Warner SJ, Herring DC (2000) A family of human RNA-binding proteins related to the Drosophila Bruno translational regulator. *J Biol Chem* 275: 28583-92.
- Gottlieb S, Driscoll DA, Punnett HH, Sellinger B, Emanuel BS, Budarf ML (1998) Characterization of 10p deletions suggests two nonoverlapping regions contribute to the DiGeorge syndrome phenotype [letter]. *Am J Hum Genet* 62: 495-8
- Govaerts L, Toorman J, Blij-Philipsen MV, Smeets D (1996) Another patient with a deletion 14q11.2q13. *Ann Genet* 39: 197-200
- Grammatico P, de Sanctis S, di Rosa C, Cupilari F, del Porto G (1994) First case of deletion 14q11.2q13: clinical phenotype. *Ann Genet* 37: 30-2
- Greenberg F, Courtney KB, Wessels RA, Huhta J, Carpenter RJ, Rich DC, Ledbetter DH (1988a) Prenatal diagnosis of deletion 17p13 associated with DiGeorge anomaly. *Am J Med Genet* 31: 1-4
- Greenberg F, Crowder WE, Paschall V, Colon-Linares J, Lubianski B, Ledbetter DH (1984) Familial DiGeorge syndrome and associated partial monosomy of chromosome 22. *Hum Genet* 65: 317-9
- Greenberg F, Elder FF, Haffner P, Northrup H, Ledbetter DH (1988b) Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. *Am J Hum Genet* 43: 605-11
- Greenberg F, Valdes C, Rosenblatt HM, Kirkland JL, Ledbetter DH (1986) Hypoparathyroidism and T cell immune defect in a patient with 10p deletion syndrome [see comments]. *J Pediatr* 109: 489-92
- Hager J, Dina C, Francke S, Dubois S, Houari M, Vatin V, Vaillant E, Lorentz N, Basdevant A, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P (1998) A genome-wide scan for human

- obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* 20: 304-8
- Hasegawa T, Hasegawa Y, Aso T, Koto S, Nagai T, Tsuchiya Y, Kim KC, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y (1997) HDR syndrome (hypoparathyroidism, sensorineural deafness, renal dysplasia) associated with del(10)(p13). *Am J Med Genet* 73: 416-8
- Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox- containing gene. *Nature* 354: 522-5.
- Hon E, Chapman C, Gunn TR (1995) Family with partial monosomy 10p and trisomy 10p. *Am J Med Genet* 56: 136-40.
- Hwang DM, Hwang WS, Liew CC (1994) Single pass sequencing of a unidirectional human fetal heart cDNA library to discover novel genes of the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 26: 1329-33.
- Ioannou PA, de Jong PJ (1996) Construction of bacterial artificial chromosome libraries using the modified P1 (PAC) system. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR (eds) *Current Protocols in Human Genetics*. John Wiley & Sons, New York., pp 5.15.1-5.15.24
- Jansen GA, Ofman R, Ferdinandusse S, Ijlst L, Muijsers AO, Skjeldal OH, Stokke O, Jakobs C, Besley GT, Wraith JE, Wanders RJ (1997) Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl-CoA hydroxylase gene. *Nat Genet* 17: 190-3
- Jerome LA, Papaioannou VE (2001) DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet* 27: 286-91.
- Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, Nordenskjold M, Larsson C (1993) Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet* 92: 169-74
- Kelley RI, Zackai EH, Emanuel BS, Kistenmacher M, Greenberg F, Punnett HH (1982) The association of the DiGeorge anomalad with partial monosomy of chromosome 22. *J Pediatr* 101: 197-200
- Kenan DJ, Query CC, Keene JD (1991) RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* 16: 214-20.

- Kendler KS, Myers JM, O'Neill FA, Martin R, Murphy B, MacLean CJ, Walsh D, Straub RE (2000) Clinical features of schizophrenia and linkage to chromosomes 5q, 6p, 8p, and 10p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. *Am J Psychiatry* 157: 402-8
- Kimber WL, Hsieh P, Hirotsune S, Yuva-Paylor L, Sutherland HF, Chen A, Ruiz-Lozano P, Hoogstraten-Miller SL, Chien KR, Paylor R, Scambler PJ, Wynshaw-Boris A (1999) Deletion of 150 kb in the minimal DiGeorge/velocardiofacial syndrome critical region in mouse. *Hum Mol Genet* 8: 2229-37
- Kim-Ha J, Kerr K, Macdonald PM (1995) Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 81: 403-12.
- Kimmelman AC, Ross DA, Liang BC (1996) Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics* 34: 250-4
- Kinouchi A, Mori K, Ando M, Takao A (1976) Facial appearance of patients with conotruncal abnormalities. *Pediat Jpn* 17: 84
- Knutsen T, Bixenman HA, Lawce H, Martin PK (1990) Chromosome analysis guidelines--preliminary report. Association of Cytogenetic Technologists Task Force. *Cytogenet Cell Genet* 54: 1-4
- Koenig R, Kessel E, Schoenberger W (1985) Partial monosomy 10p syndrome. *Ann Genet* 28: 173-6
- Kwiatkowski TJ, Jr., Orr HT, Banfi S, McCall AE, Jodice C, Persichetti F, Novelletto A, LeBorgne-DeMarquoy F, Duvick LA, Frontali M, et al. (1993) The gene for autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA1) maps centromeric to D6S89 and shows no recombination, in nine large kindreds, with a dinucleotide repeat at the AM10 locus. *Am J Hum Genet* 53: 391-400
- Labastie MC, Catala M, Gregoire JM, Peault B (1995) The GATA-3 gene is expressed during human kidney embryogenesis. *Kidney Int* 47: 1597-603.
- Ladd AN, Charlet N, Cooper TA (2001) The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21: 1285-96.

- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW, Jr., Lott IT, et al. (1985) Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313: 837-41
- Lammer EJ, Opitz JM (1986) The DiGeorge anomaly as a developmental field defect. *Am J Med Genet Suppl* 2: 113-27
- Lanzetti L, Rybin V, Malabarba MG, Christoforidis S, Scita G, Zerial M, Di Fiore PP (2000) The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature* 408: 374-7.
- Lengauer C, Speicher MR, Cremer T (1994) FISH of Alu-PCR-amplified YAC clones and applications in tumor cytogenetics. *Methods Mol Biol* 33: 85-94
- Levin SW, Surana RB (1991) Holoprosencephaly associated with 46,XX,del(14)(q11.1q13). *Am J Hum Genet Suppl* 49: 269
- Levinson DF, Holmans P, Straub RE, Owen MJ, Wildenauer DB, Gejman PV, Pulver AE, Laurent C, Kendler KS, Walsh D, Norton N, Williams NM, Schwab SG, Lerer B, Mowry BJ, Sanders AR, Antonarakis SE, Blouin JL, DeLeuze JF, Mallet a J (2000) Multicenter Linkage Study of Schizophrenia Candidate Regions on Chromosomes 5q, 6q, 10p, and 13q: Schizophrenia Linkage Collaborative Group III. *Am J Hum Genet* 67
- Li D, Ahmad F, Gardner MJ, Weilbaecher D, Hill R, Karibe A, Gonzalez O, Tapscott T, Sharratt GP, Bachinski LL, Roberts R (2000) The locus of a novel gene responsible for arrhythmogenic right-ventricular dysplasia characterized by early onset and high penetrance maps to chromosome 10p12-p14. *Am J Hum Genet* 66: 148-56
- Li L, Drayna D, Hu D, Hayward A, Gahagan S, Pabst H, Cowan MJ (1998) The gene for severe combined immunodeficiency disease in Athabascan-speaking Native Americans is located on chromosome 10p. *Am J Hum Genet* 62: 136-44
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80: 224-34
- Lichtner P, Konig R, Hasegawa T, Van Esch H, Meitinger T, Schuffenhauer S (2000) An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13/14. *J Med Genet* 37: 33-7

- Lindgren V, Rosinsky B, Chin J, Berry-Kravis E (1994) Two patients with overlapping de novo duplications of the long arm of chromosome 9, including one case with DiGeorge sequence. *Am J Med Genet* 49: 67-73
- Lindsay EA, Botta A, Jurecic V, Carattini-Rivera S, Cheah YC, Rosenblatt HM, Bradley A, Baldini A (1999) Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region [see comments]. *Nature* 401: 379-83
- Lindsay EA, Greenberg F, Shaffer LG, Shapira SK, Scambler PJ, Baldini A (1995) Submicroscopic deletions at 22q11.2: variability of the clinical picture and delineation of a commonly deleted region. *Am J Med Genet* 56: 191-7
- Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, Jurecic V, Ogunrinu G, Sutherland HF, Scambler PJ, Bradley A, Baldini A (2001) *Tbx1* haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410: 97-101.
- Lipson A, Fagan K, Colley A, Colley P, Sholler G, Issacs D, Oates RK (1996) Velo-cardio-facial and partial DiGeorge phenotype in a child with interstitial deletion at 10p13-- implications for cytogenetics and molecular biology. *Am J Med Genet* 65: 304-8.
- Lundquist EA, Herman RK, Rogalski TM, Mullen GP, Moerman DG, Shaw JE (1996) The *mec-8* gene of *C. elegans* encodes a protein with two RNA recognition motifs and regulates alternative splicing of *unc-52* transcripts. *Development* 122: 1601-10.
- Macknight R, Bancroft I, Page T, Lister C, Schmidt R, Love K, Westphal L, Murphy G, Sherson S, Cobbett C, Dean C (1997) *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* 89: 737-45.
- Marra MA, Kucaba TA, Dietrich NL, Green ED, Brownstein B, Wilson RK, McDonald KM, Hillier LW, McPherson JD, Waterston RH (1997) High throughput fingerprint analysis of large-insert clones. *Genome Res* 7: 1072-84
- Matoskova B, Wong WT, Nomura N, Robbins KC, Di Fiore PP (1996) RN-tre specifically binds to the SH3 domain of *eps8* with high affinity and confers growth advantage to NIH3T3 upon carboxy-terminal truncation. *Oncogene* 12: 2679-88.
- Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R (2001) *TBX1* is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 104: 619-29.

- Mihalik SJ, Morrell JC, Kim D, Sacksteder KA, Watkins PA, Gould SJ (1997) Identification of PAHX, a Refsum disease gene. *Nat Genet* 17: 185-9
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia [see comments]. *Nat Genet* 15 Spec No: 417-74
- Momeni P, Glockner G, Schmidt O, von Holtum D, Albrecht B, Gillessen-Kaesbach G, Hennekam R, Meinecke P, Zabel B, Rosenthal A, Horsthemke B, Ludecke HJ (2000) Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho- rhino-phalangeal syndrome type I. *Nat Genet* 24: 71-4.
- Nadal N, Rolland MO, Tranchant C, Reutenauer L, Gyapay G, Warter JM, Mandel JL, Koenig M (1995) Localization of Refsum disease with increased pipecolic acidemia to chromosome 10p by homozygosity mapping and carrier testing in a single nuclear family. *Hum Mol Genet* 4: 1963-6
- Neitzel H (1986) A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 73: 320-6
- Neubuser A, Koseki H, Balling R (1995) Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box- containing gene related to Pax1. *Dev Biol* 170: 701-16.
- Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, Weiss MJ (2000) Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet* 24: 266-70.
- Nomura N, Nagase T, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Sato S, Seki N, Kawarabayasi Y, Ishikawa K, Tabata S (1994) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. II. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0041-KIAA0080) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 (supplement). *DNA Res* 1: 251-62
- Normile D, Pennisi E (1999) Team wrapping up sequence of first human chromosome. *Science* 285: 2038-9.
- Obregon MG, Mingarelli R, Giannotti A, di Comite A, Spedicato FS, Dallapiccola B (1992) Partial deletion 10p syndrome. Report of two patients. *Ann Genet* 35: 101-4

- Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD, Lindenbaum MH (1995) Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet* 11: 40-4.
- Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R (1998) Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 12: 2735-47
- Puech A, Saint-Jore B, Funke B, Gilbert DJ, Sirotkin H, Copeland NG, Jenkins NA, Kucherlapati R, Morrow B, Skoultchi AI (1997) Comparative mapping of the human 22q11 chromosomal region and the orthologous region in mice reveals complex changes in gene organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14608-13
- Rauch A, Pfeiffer RA, Leipold G, Singer H, Tigges M, Hofbeck M (1999) A novel 22q11.2 microdeletion in DiGeorge syndrome [letter]. *Am J Hum Genet* 64: 659-66
- Reed P, Cucca F, Jenkins S, Merriman M, Wilson A, McKinney P, Bosi E, Joner G, Ronningen K, Thorsby E, Undlien D, Merriman T, Barnett A, Bain S, Todd J (1997) Evidence for a type 1 diabetes susceptibility locus (IDDM10) on human chromosome 10p11-q11. *Hum Mol Genet* 6: 1011-6
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brondum-Nielsen K, Scambler PJ, et al. (1997) Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study [see comments]. *J Med Genet* 34: 798-804
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91
- Saint-Jore B, Puech A, Heyer J, Lin Q, Raine C, Kucherlapati R, Skoultchi AI (1998) Goosecoid-like (Gsc), a candidate gene for velocardiofacial syndrome, is not essential for normal mouse development. *Hum Mol Genet* 7: 1841-9
- Saitta SC, McGrath JM, Mensch H, Shaikh TH, Zackai EH, Emanuel BS (1999) A 22q11.2 deletion that excludes UFD1L and CDC45L in a patient with conotruncal and craniofacial defects [letter]. *Am J Hum Genet* 65: 562-6

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. . Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanchez Y, Lovell M, Marin MC, Wong PE, Wolf-Ledbetter ME, McDonnell TJ, Killary AM (1996) Tumor suppression and apoptosis of human prostate carcinoma mediated by a genetic locus within human chromosome 10pter-q11. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 2551-6
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74: 5463-7.
- Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, Dobyns WB, Eccles MR (1995) Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. Nat Genet 9: 358-64.
- Sarfarazi M, Child A, Stoilova D, Brice G, Desai T, Trifan OC, Poinosawmy D, Crick RP (1998) Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region. Am J Hum Genet 62: 641-52
- Savoia A, Del Vecchio M, Totaro A, Perrotta S, Amendola G, Moretti A, Zelante L, Iolascon A (1999) An autosomal dominant thrombocytopenia gene maps to chromosomal region 10p. Am J Hum Genet 65: 1401-5
- Scambler P, Roberts C, Sutherland H, Kimber W, Lui V, Halford S, McKie J, Snoeren S, Lohman F, Meijers C, Wynshaw-Boris A (1998) 1998. Am J Hum Genet 63: A7
- Schuffenhauer S (1997) Molekulargenetische und zytogenetische Untersuchungen bei Patienten mit Verdacht auf Prader-Willi-Syndrom oder Angelman-Syndrom, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Schuffenhauer S, Leifheit HJ, Lichtner P, Peters H, Murken J, Emmerich P (1999) De novo deletion (14)(q11.2q13) including PAX9: clinical and molecular findings. J Med Genet 36: 233-6.
- Schuffenhauer S, Lichtner P, Peykar-Derakhshandeh P, Murken J, Haas OA, Back E, Wolff G, Zabel B, Barisic I, Rauch A, Borochowitz Z, Dallapiccola B, Ross M, Meitinger T (1998) Deletion mapping on chromosome 10p and definition of a critical region for the second DiGeorge syndrome locus (DGS2). Eur J Hum Genet 6: 213-25

- Schuffenhauer S, Seidel H, Oechsler H, Belohradsky B, Bernsau U, Murken J, Meitinger T (1995) DiGeorge syndrome and partial monosomy 10p: case report and review. *Ann Genet* 38: 162-7
- Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tome P, Aggarwal A, Bajorek E, Bentolila S, Birren BB, Butler A, Castle AB, Chiannikulchai N, Chu A, Clee C, Cowles S, Day PJ, Dibling T, Drouot N, Dunham I, Duprat S, East C, Hudson TJ, et al. (1996) A gene map of the human genome. *Science* 274: 540-6.
- Schwab SG, Hallmayer J, Albus M, Lerer B, Hanses C, Kanyas K, Segman R, Borrmann M, Dreikorn B, Lichtermann D, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB (1998) Further evidence for a susceptibility locus on chromosome 10p14-p11 in 72 families with schizophrenia by nonparametric linkage analysis. *Am J Med Genet* 81: 302-7
- Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-2
- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS (2000) Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 9: 489-501
- Shapira M, Borochowitz Z, Bar-El H, Dar H, Etzioni A, Lorber A (1994a) Deletion of the short arm of chromosome 10 (10p13): report of a patient and review. *Am J Med Genet* 52: 34-8
- Shapira SK, Anderson KL, Orr-Urtregar A, Craigen WJ, Lupski JR, Shaffer LG (1994b) De novo proximal interstitial deletions of 14q: cytogenetic and molecular investigations. *Am J Med Genet* 52: 44-50.
- Shimizu T, Takao A, Ando M, Hirayama A (1984) Conotruncal face syndrome: its heterogeneity and association with thymus involution. In: Nora JJ, Takao A (eds) *Congenital Heart Disease: Causes and Processes*. Futura Publishing Company, Mount Kisco, N. Y., pp 29-41
- Shprintzen RJ, Goldberg RB, Young D, Wolford L (1981) The velo-cardio-facial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics* 67: 167-72
- Siomi H, Dreyfuss G (1997) RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 7: 345-53.

- Soderlund C, Longden I, Mott R (1997) FPC: a system for building contigs from restriction fingerprinted clones. *Comput Appl Biosci* 13: 523-35
- Stapleton P, Weith A, Urbanek P, Kozmik Z, Busslinger M (1993) Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nat Genet* 3: 292-8
- Sulston J, Mallett F, Durbin R, Horsnell T (1989) Image analysis of restriction enzyme fingerprint autoradiograms. *Comput Appl Biosci* 5: 101-6
- Sutherland HF, Kim UJ, Scambler PJ (1998) Cloning and comparative mapping of the DiGeorge syndrome critical region in the mouse. *Genomics* 52: 37-43
- Takao A, Ando M, Cho K, Kinouchi A, Murakami Y (1980) Etiologic categorization of common congenital heart disease. In: van Praagh R, Takao A (eds) *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*. Futura Publishing Company, Mount Kisco, N. Y., pp 253-269
- Taylor MJ, Josifek K (1981) Multiple congenital anomalies, thymic dysplasia, severe congenital heart disease, and oligosyndactyly with a deletion of the short arm of chromosome 5. *Am J Med Genet* 9: 5-11
- Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM (1996) Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384: 474-8.
- Van Esch H, Groenen P, Daw S, Poffyn A, Holvoet M, Scambler P, Fryns JP, Van de Ven W, Devriendt K (1999) Partial DiGeorge syndrome in two patients with a 10p rearrangement. *Clin Genet* 55: 269-76
- Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden G, Harding B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns JP, Van de Ven W, Thakker RV, Devriendt K (2000) GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* 406: 419-22
- van Essen AJ, Schoots CJ, van Lingen RA, Mourits MJ, Tuerlings JH, Leegte B (1993) Isochromosome 18q in a girl with holoprosencephaly, DiGeorge anomaly, and streak ovaries. *Am J Med Genet* 47: 85-8
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas

- PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Francesco VD, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang ZY, Wang A, Wang X, Wang J, Wei MH, Wides R, Xiao C, Yan C, et al. (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Wadey R, McKie J, Papapetrou C, Sutherland H, Lohman F, Osinga J, Frohn I, Hofstra R, Meijers C, Amati F, Conti E, Pizzuti A, Dallapiccola B, Novelli G, Scambler P (1999) Mutations of UFD1L are not responsible for the majority of cases of DiGeorge Syndrome/velocardiofacial syndrome without deletions within chromosome 22q11 [letter]. *Am J Hum Genet* 65: 247-9
- Wakamiya M, Lindsay EA, Rivera-Perez JA, Baldini A, Behringer RR (1998) Functional analysis of Gscl in the pathogenesis of the DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Hum Mol Genet* 7: 1835-40
- Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J (1993a) DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet* 30: 852-6
- Wilson DI, Goodship JA, Burn J, Cross IE, Scambler PJ (1992) Deletions within chromosome 22q11 in familial congenital heart disease. *Lancet* 340: 573-5
- Wilson TA, Blethen SL, Vallone A, Alenick DS, Nolan P, Katz A, Amorillo TP, Goldmuntz E, Emanuel BS, Driscoll DA (1993b) DiGeorge anomaly with renal agenesis in infants of mothers with diabetes. *Am J Med Genet* 47: 1078-82
- Wolfsberg TG, McEntyre J, Schuler GD (2001) Guide to the draft human genome. *Nature* 409: 824-6.
- Wu C, Zhu S, Simpson S, de Jong PJ (1996) DOP-vector PCR: a method for rapid isolation and sequencing of insert termini from PAC clones. *Nucleic Acids Res* 24: 2614-5

- Wullich B, Henn W, Groterath E, Ermis A, Fuchs S, Zankl M (1991) Mosaic tetraploidy in a liveborn infant with features of the DiGeorge anomaly. *Clin Genet* 40: 353-7
- Yang Z, Gu L, Romeo PH, Bories D, Motohashi H, Yamamoto M, Engel JD (1994) Human GATA-3 trans-activation, DNA-binding, and nuclear localization activities are organized into distinct structural domains. *Mol Cell Biol* 14: 2201-12.
- Yao KM, Samson ML, Reeves R, White K (1993) Gene elav of *Drosophila melanogaster*: a prototype for neuronal-specific RNA binding protein gene family that is conserved in flies and humans. *J Neurobiol* 24: 723-39.
- Zehetner G, Lehrach H (1994) The Reference Library System--sharing biological material and experimental data. *Nature* 367: 489-91

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DANN
cen	Zentromer eines Chromosoms
cM	Centimorgan (Maß für die genetische Entfernung für Loci)
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DGS	DiGeorge-Syndrom
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
del	Deletion
der	derivates Chromosom
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothocyanat
GTG	G-Bänderung mit Trypsin und Giemsa
h	Stunden
H&E	Hämalaun-Eosin-Färbung
IE	internationale Einheiten
kb	Kilobasenpaare
KO	Knock out
Mb	Megabasenpaare
min	Minuten
PAC	P1 artificial chromosome
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerasekettenreaktion

RBP	RNA bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RRM	RNA-Erkennungsmotiv (RNA recognition motif)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Translokation
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCFS	Velokardiofaciales Syndrom
Vol.	Volumen
YAC	Yeast artificial chromosome

Anhang

PAC-Randsequenzen:

PL02-T7:

TTTAAAATTTCCCTTCACTTCCCTGTCTTGGTATGCTTGTTATTTTTCTTTAGAAAATCATAAACTTGTACCATTAAAA
TACCTGAAATCCAGGTAATATTACATATAGAAGGATGTCTGACAAACATTTACAGAAAAGTTAATGCCCCATTGAAG
AAATGATGAACATATTATCTAAATATTATCTAAAAATATTATCTAAAAATATTATCTAAATATTATCTAAAAATGAC
ATAGAAGACTAGAAAACCCCATGTGAGTTGTGAATATTCAGGAACCATAGATGCCAGCCAAATGATGACCATGATG
AAGCTCCATAAGTTTTTGGTTGATTTGCATGTGTCACTATGGAAGCTGGAACAGTGGCCTCAGGCTTTATATCTT
TGAAAGGATAAGAGAAAAAATTATAACAGGTGTTGATTTATTTGATGAGAAAATGA

PL04-SP6:

TTCTCAAAGAGCAGAGAGCAAAATGCTGTCTCCTATTCTGACTTGTGATTCAAGCATACAAAGCCTTACCATTG
TTCTTTCTAAAGTACAGACTCACAGCAAGGGCTACTACTGCTGCTACATTTATGATATTCGCGAACAAGTTTATC
ACCATGGTTAAACAATCCCCGAGTTACAAGAATCTGTTTTGTTATAGTCAGTCTGGAGTTTTTATTTCTTGGATT
TAGGATTTTACCTGCATTTCTTTTCAATTTAACATGACAGCCGATGGACTAAGTTCTGTCTTGTCAAAGCAAGAAC
TGTAGGTCCTGTAAGTGCAGCTTGAACATATCANTATATCTCACGTTGCANAATCCTTTAAGGTANGAGATAAAG
TGCTTGTTTATAACAGATCTGGACTG

PL04-T7:

TTAAGGTGTCAGCCACTGTGCCAGCCTATTTTTATTCTTTTAATCATAGGTCTAATACAGTGTCAACTTTTTTCT
TCTGTGTACCAAGAATACTTTATTTAGCTTTTTGAATTTTTTTCTTTGAATGCAGCTGGAGTGTGTGACTTTCCG
AGGAGTCAAATGGGAGAATGTTGAAAATTATTGGCATGTCTTTTGGTGAAAATTAGGTTTTCTTTTATGTCCCTTG
GGGTAGACAGTCATTTAAACACAGGCAGTAGCACTACGACCACCCCTGGTTTTCTCCATGTAACAAAATGGAACAA
GGATGGAGCGATTTCAAATAGACAGTTCTTGANAAAGGCTTATAACCTGAAATTTGTGCACTGCAAACAGATCATC
TCCTAAAACACTATATTGTGGCATAAGCAGTTTTTAAAATTTGTGCCTTTTGTGACTTTTTAGGAGCAACAGGTT
TGGCAGAACTCTAGACTGAGCTCCTGGACCAACACATGAGGATCTTCCAGGTTACGTGGGTTTTAAAGGCCTTTT
TGCCTTGTAATATGCTTTTACATATCAAATGT

PL14-T7:

ACCAGCAGCAGTTTTACTGCATTCTCATACCTGAAAGAACATGGAATANNNNTTGGCATTCAATACAGCCCCTAG
GAAATGGGTGAACCCCACTCAAACCTTCCCTGGATAGGACAGCTCTGCGTGCACCGTTCCCGGCATAGTCAGTGGT
GCCTTCAGGATTCAGGGGCATTTTTGTACTTCTGAAGAGTAAGGTACAAGTATGCCAGATTCTCTCATTAGAATGA
AATCATTAAATTACAGGAAAAGTGAATTTAGGGTATGTGAAATATTTTATATGGTGGAGTTCTTGTATGTTAAAGA
TGTTCTTGCAATTGCCTACCCTCAATGCTCCTGTCTTTAAAACCTCTCCTTGGCTGCTCTTAGAAGTACAGTGTGAT
CAGCCTTTGATGTGCTTGGAGATAGAATACAGGTGCACCTTGTTTAATTGCACCTTCACTGGAATGTGCTTTTCAG
ATACTGCCTTTTTTTTTCTTTTTTAAACAAAATTGAAG

PL16-T7:

AGTTTCCCTCAGTACAGGAACCCACACCGAGCATGAATCTAAAACACGACTTATCCCTCTGGCCGGCACACTGCTC
CCCCATCAACCGAGAATGACAGGAGCGGGTGGGCTGTGGAGGACAGAACCTGCAGTTCTCTGGTGTAGTCCATCCA
TATGTTTCGGAACCAAGTACAATTTTCTAAGTGATTTGCCTCCAGCCTATTTCAACCTG

PL24-T7:

AACGGTCACTGAAAAATTCTGAATCACCTTTCAATGTGACACGGAGTCGCAGATGATTTGAACATGTTGTAGGAT
CTGTGCTCTGCTCAAGTTAACATGAATCAAGCATTGTGACCCCGTTTTGGTCTTCTCATCAAAATCTTACTTGT
TGCAGCTGCACTAAATCCACATCTGAATAGGGGTTAAGTAGAATTTCTGAGGTCTGAAGAACAAGCATTATAT
TTACAAGGTTTCAGTGATAGTTAAAATTTGACCTCTTTGACAGAAGAAAAGAAAAATCATAAGGTTATTATATATG
GATATATATCTCCCCTTGAGTTTCGGGGGATGAATAGTTCATCNAAAAAGAATCTTGAGAAATACTCACTTCAATT
GGGGATACTGATGTGGACAGAATGGANCATCATTTTCATATTGTGAACATTGCTGCCAGTGTCTCTTTGGTACAGG

Anhang

PL41-SP6:

GAAGTGAGCACCAATGAAAATTGAAATATACTACTGTTTCTAAATTAGTAATTGATTTNAGTTGCTATTAGCTAT
TAAGTTATTTAGTTTTAAGAAGCTCTGAAATATCTGTTGTGTGCAGCATTACTGATCATGATAGTTAAACTTTG
TCCATTCATGAGTTAAGGTGCCGAGTTNTGCCAGTGTCTGAAGCACTCAAAGGTNAAGCCTCACATAAGAAGTC
CGTCATTACGACTGGCAGATATTCATCTCTCTGCTGTTTGGCTTGGNTTC

PL44-SP6:

TTTAAATCATTTCATCTAATATAAATAAGTGTGGATTTCATTTAGAAGCAACACTGACCAGAGAAAAGAGTAGCCTAT
CAGGGGAGATCTCTGATCCAGAAAGACAAGGTCAAATATTCTGTGGATATGGCTCCCTGTTTTACTCCTCCTCC
TGTTTGCCTTCACTCCTCCTCTTCTATAACCACTATCACAGTATCTGCTCTTCTTTTCCACTACCATCATCACCC
CACCTGGAAGTACAATTTTTTTTTTTCATGGAGGAGTTTTGTTGANAAAAAAATTTTAAACTTTTCTATNAACCTA
TGGGTTTTACCTCACTCTTTATAAGAAANAANACTGGTGGTTAAACCCCATGCAATGTTACCC

PL44-T7:

CGTTGGGTCTCTTTATGGCTTATGGTAAAGAAGTTGCCATCACGGTAGTGAATTGCAAAAACAATGATCTTGATCT
TTAATTCCTTCACTTCTCCTTTTTCTCCTCACCTTTACTAACCGGGGCTTGGACTTTCCAAAACAACATCTACACTT
TGATCTTTGCCTTAGGTTCTAATATAGGAGCCAGAATAAAGACACTATGCATATTTAAAGACAATTAAGTCTTT
TCAGCCAAAATATTTTTGCCGATGTGGGGGTGTTATTTACATGTTCTGTTGGGGTAAAGTTCCTGAGTATTGAA
AATACAAATTCAGCATTCTTTTCTTTTAGTTTAAACACAGATTATATTGTNATTAGCCAATGTGGACAAGACATCA
TAATGAGCCACATTAGGTCTGTTTCATATCATTGGTCTGCCATTCATTTCTTTTGGAGANTTTTAGATTGG

PL196-SP6

ACAGAATACATTAGCAATATCCACATGCATAGATGGATGCGTGTGGCCACAGAGTTCACTGTGACTCAGCTT
TGCCACTTGTAACAGAGCCATTTTGGAGTAAAAGCCTGTGTGCAACTANGAGTTGGATTTGAGGGGAGCATANTA
GAGGCAGGGGCTCTCCTACTTGCAAAGGCACAGGTCTATTCTACTGTTTTNCTGACTGAAAAAAAAAAGGAAAT
AT

PL196-T7:

TTGTTAAACAGTTTTGGGCTTTTTGCAGCTGGGCACGGTGGCTCAGGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAG
GCGGGTGGATCACTTGANGTCGGGAGTTTGGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGTGAAACCTCTCTCTACAAAACAT
CAAAAATTANCTGTATGTAGTGTGACGACCTGTAATCCCAGCTACTCATGGAAGCTGANGTGGGAGAAATTGCTTG
AATCTGGGAGGCCGGANGCTGCAGTGAGCCTATATCATGCCACTG

EST-Sequenzen:

est11:

GGATTAATTCATGATGGACAGGTGAACTCCAGAAAAGCAGTCACCCTTGGCAGCTTTCGTCCATCGAGCGATTCT
GAGAGAGGGAACCTCTGGGGTGAGCCCCGAAACGTTAGGTTGCGCTCAGATCAGCCCTGCACTTTGGGATGTCAC
TGAGCAGACTTCCCGAGTCTCCATGGCTTCCGTAACTGCCCTTTCCATTGGCTCTGATTTAAGCTGCAGCCTC
TGGCACACCGATGGAAGCTCGCGGCATCGTGTTCATCCACGTGCTCCACAGAGCCAGGTTGTCCAAAAGGA
AAATAATCCCCTCTGGAGAAGCAAAAACCTGCTGGGGCTGCTAAGAGGAGCACACTGAGTAAACCCACCTTC
CAACAGAATCCGCTTTTTTTGTTATTTTTCCATTGCAGAAAGACGAATGGCGGGACAGGCAGGGCTTTTGAGGAG
GTGTGGATTTTCATCCTCCATCATAAACAAGCAGTGGCTCAGGCCAGCTGATGCTTTCTCCTCACTGAGCTCCTTCTC
TGCACATGAAGCGGAAGATGGGGCGTGCCATCCTGAGGTGCGGGCTGCTTTCCGCCATCCACCCAAGCCAGGTCCC
TACTGCCCCGCACTGTGCACCTTGCTGTTAGGACCTCTTTGCTCTCCACCTCCAGTCTCTCCAGACCCTTCG
TCCAGCTTCAATTCCACATCCCCAGCGAGCCTTTCTCAAACACCTGGGTGCACGATTCGTAGTTTACAAGTATT
GTGGAATCGTGCCTTTCAACTTGTATTTCCTTGGAGCCCTAGAGTTTCTGCGGTGTCCAGGAGCTGTCACAGTGG
GGAGAGAGCTGGGTGGAAGGGATTCTGACCCCCCACTCACCGTCCCTGCCTCAAGAGCCCCAGTCACCCCGAGTA
TGTCACAGGCCACCTTCTCTCCATTTCTAGGAGAGAAAAGAGTCTAAACTTTCAATCCATGGATGACAAAACAGA
GGTCTCAGAGGTGAGCCTATTCTCCAAAGACACATATCAAACCTCATGGCAGCACCGGACCTAGAACCCTTGGTCT
TCTAATCACCGCCATTGCTCTCCCCTTCAAGCCTTCTCTCCTCCTCTGAACTTGGAGGAGACACAGCAGGGGAAG
GAATCCTTGGCTGGGAGGAGACTCCAGGCTGTGGGCCAGGCTGGATGACCCTAGGCAGGTCCCTCCCCCGCTGG

Anhang

ACCTTGGGAAATCTTTTGGAGACAGACAGAAGCTCCCTTAGGTCTCTTCCCTTCCACTCTGGGATGCTATGAAGAG
GAGCCTTTAGCTGTCTCCTCTAGGCCCTTCAGGGCCGTGCTGGCTCATGGAGCAATCATGTGTGGCTCTTTAATT
AAAATTACATTTTAGAAAAGCACTTCCCTCAATCACACCAGTCCCTTTAAGTGCTCAGCAGCCACATGTGGCTTTA
GTTTCTGTGTCAACAGCACTGTGGTAGTGGAAACCCACCTGTTACCAGTACACCTGCCCCAGCCCCCTTCTCAGCAC
AGAGGTGTGCTTTAGCGTCCAGAAGGAACTGGCCCCAGTAAGTCTGGGATAAATTGCCTAATTCGCTAAAATGAAAAAT
GAGACACTTCCCTGTCCGGGGTAGGCATAAAAAGAAACAGAAATAAAAGCCAATTAATAGGAATGACAAGATGATA
GTGCAGATTCAAAAGAAATAGGTATGCACAAGTGACTTAAAGCAGAGTCCCTCCTCTAGCCCAGGACACTCTTCAG
TCTGGCTGCAGCTGGCTAGCTTCTTTTTTTTTTTTTTTAATTCTAAGAAATAGATTGAAATGAAACGATGGAAAA
GAAGCAGGACTTCTCCCCGTGGGTGTCTGTGATGTCT

est12:

CCGTCTTTGTCTCTGGATACTGCATTCATGTATTATAACCCACAGGAGCTTCAAAAATATGTNCAGAATTGAGTGG
GATCTTGGGTGTAACCTATTACCATGAGAAATTGGCAAGAAGGAAATCACTTGTCTTCTGCATGTTCTTATGTAA
CCTTGAACAACTGTTCTGTTAAAAAAGTCTTTTTTCCCTTGCTAAAAAATCAGCTTAGCCTTC
CAGATATTTTCAATAGCTGCACTCGTTAGTATGCCATCTTTTTTTTTTAAAACTGCCTGTCTTTTTTCTCCT
AACAACCTCCTAAGTTAAGCCTCAAGTGAGAATCTCAGCAAATTGACTTTTAGTAATATTTAATTTATGAGATT
ATTACGGTGTGGTCCAGTGTGGTGAATCCTATAGTCATTTTACTCGTGTATTCTAATGTCAACAGGATTGTGCTA
GTTTAGATGCCCTGTTTGCCTAATCATTTTATGTGCGAAAATAGATGGGGGAGAGGTCAAGGACGTAGTCTGTG
AAAACAATGTGAACCGGACCTCTGATCTTCATTCCTGTTCCCTTTTTTCTCCAACCTATTGTTCCTATCCCTT
TCTTTAGT

est15:

CCTCGTGCCAAGCATGGCAGGAGCTCCAATGAGTTTATTTAGCAAATGTTATGAATTCAGGAAAAATTATGATTA
ATTTTGGAGCCCCAGTCTAGACCTGTCAATTTAACACTGAAGAAGTACAGTTAGATGCTTTGTGTGGTTATTAAG
AAGAACAGTAATTTTTCAGTAGTATAAAAAATATCAACAATGATTACAGGTGACTTTTTGGCTTAAATATCAAC
TCCCCAACACCTTTCAAGAATGTTGTGAGATCATAAAAAAGTCCAGGAGCAAAATATTAGTTAAGGAAGAAATGAGG
CTATTTAATTGGTTAGACTTGTGGTGGAGAAAGGCATGCTGTTTGTAGTCTGTTTCCATGACCACAGCTGTTTCC
CCACCCAGTTTTTGTAGTATAATATTAAGCCTTAATTTACAAGTAAAAGTTTTCCACCTCCGGTCCCGTAGTCC
AAATCAAGTTATTAATTTAAACCTTATGGCTTTTTCTGTATATTCCCTGGATTTCAGCTTACCACCTTTGGCCCCCT
ATTAAGAACCATATTGCTAGTATCCCGGGCTTTGTGTGACTTGAATTGTTTTTCTTCTGTATCTTTTCCATG
GATGGGATAACTGGGAAAGAGACGAGGGAGTGTGTGAGTACAGTAACGATAGTGTAGGATTTTGTGTTGCCGACA
GTTTATGGATTGTTGGTTTTGTATTGTTTTTATTTTGTCTTTTGGCAAGGCTGTGTTCCCTCCAGTTGAGTGAGG
TGGATAGAGTTTTGAAGTCTGGACTCTACCATCACCTTATTCCCTGGAGATGTATCAGTACCGTATACACAGGGGA
CCCTATGTGTGGCCATGAGCCTTGCTGTAGAACCTGTGGCTCCAGAGAGCCACCTGGCCACAGAGAGCAAAAGAT
AATTTTAGCCTTGAAGTAAAAGGAGGAATGAGGCTGTGTTTTCTGGACCAACCTAAGTTGAGTCCCTGGATGT
TTACATCTTATGGTGAATTGAGTC

est20:

AGAAAATGTACAGTCTCTTATTAGCATAACGAAGCCATCAGCATTGCATCAAGCGGGTCCCTCGTACCCTTTTTCC
TTGTAATGGTGTGGTGTAGGGTCCCTGAGGAAGAGCTGCCAGCCCCTACCTGATGGATCAAAAATCCCCTTGGCA
CCAAAGAGTACTGATAGTGTAAACCATCACAGGAGACATGTATGTATGTGTGGAACCTGACGTGATTTTTA
AAGTTTGAATAGCCCAAAGTTAATTTGTTTCTTTGCCATTTGTTTTCGAATGGGTGTGGCATTGCTTATAAAAAT
GTTGAATGTAAGTTGCCTAGGACAGCGCCTGGCATATGGTGGAACTGAATAAAGGCTGCTAGGTAGTGTAGACT
AGATGGACTAGAAAACAGTACAGATGCAGATGCTTTTTCAGATGTTCTCTCTGCCCACAGAGAGACCTTTCTGTGTGC
TTTGTTCAAAGTTGACAGTGTGAGTAAACTACCATCAACAAGGCGTTACTTTTGGGTAATTTTTTCAATGTTTAT
CCCAGTTCCCTCATCCGCTTTTACATAGCCTCTTGTACTGCAAGCTACACTCAGTTTTGAAGATGGTGGGTTAGC
GTTAGAGTGGTGTCTGTGGCCAGTGGAGGAGGAAGCTTGCTCACTTAAATGCAGAATGTCTAAGCATCTCGCG
TAACCATTGGCAGGAAGGTTATTTTCAGTGTAGACGCTGGTTCCCTTCTCACCCCTGCACCCTTCCCTGGAATCACCAC
TGTTTGCAGAAGCCTATATAGGGTGGCTCATTTGGACGAAGTATTGTTAAGGTGGTTATTAGAAGACTCGCAACT
TAGAAAAGGAAGTAAGCATGTTGATACTAGCTTTTTCATGAATCCCCCTCTCTGAGGAGCGCCCCCTTTCTAAAAAAT
TCACATTGCTGGGGCATCCCCTGCACAGAATGTTGGTGGGGAGGTATTGGAATTGATAGCAATTTCTGAGTAAGT
TCCTTCTCATGTAGTTAATGCAGCATGATGAAAGAAATAAAAGTCTCCTTATTTTTTTTACTTTCTGTGTTGCTTC
TTAAATATACTCCTTCAAGTCAGGTTAGCTTACCTTGGGTGTTTGTATTTTGTGGCTTATGTTTGCATGTGTGA
ATT

est21:

CTTTTCTTCAGAGGAGCTCAAGCTATTTAATGACAATTTGACCATTTAGAGAAGGGCTTTGACTTTGTAATGTTT
AGGGTATTTGCTCTGGTCAATTTTCCATGTGGATTCACTAGCTGATGTGTGGCCATCTCAGAGATGGTTTGGGGC
CTCATTCCATAATTTATGTGGCAGTGACTCAAAAGGTTTAGTACACATGATAAATGGTAACAATACCTTCCACCT

Anhang

AAATAGGGGAGTGTATTATTTTACATATTTTGGTGGCGTAACTGATAACCAAAACATTTTGTAAATTTACC
CAAAGTTTTTCAGCAGCCCTGGATGCCACTACAGTTAAGACATAGCTGTGTGAGAAAGGTGGCAAACCTCTGCCCTG
CCGAAAGGCAGTCAATGGAAGACAGACGCGTTTTTTCATGATGACTGTGAAGCAGTGCATTTTAAAAGGGAGTTGCA
ATTCCCAGAGCTCTGGGTTGGATGACCACTGACTCCTCTTCTTAAATCGAAAAGGATGCGCTAAGTTGAGCATGGA
CAGGGCGCCTCCTGAGGGTAGGGCCTGAGTTTCTGATGTGTTCTCCAGCATGCAGTGTGGGAAGGAGCTGATGCT
GAGACCTTAGTTGCCCCACTGCCAGTCTGTTGGGAAGAGATTTCTCTTCTTAAATAATGGCAACACCAAAATGAA
CAATGTAGAGATTGTTAATATTAATGAATTTTCATGTCTGTCTGTACCCGCGGAGGCACCAGGCCCATCGCCA
GGTCTTTCTGCTTTTGCCTTAAGCAGCTGAGTCTTGGACAGTTCCTGTAATAACCAAAACAAAGCCTGTTTCTT
CGTGTGCTATTACTTAAGTACAAGTGATATTTAAAAATGATTCCCTGAGCCCTTTGAAAGAGTGGCTTGTAGCTA
CAGAAATGATGGGACTGAAGTTAGGACATTAAGAAGAGCATTGGCATAACCTGGCAAGAGATGGGGCTCTCGCAGC
ACCCCAATTAACCGGCCACTCAGCGGCCTGTGCGAGCCTCCAGGCTACTCTCCATAGTGTGAGTACACCTTGT
AGCTCTCCAGCCTGCAGCCTGTGTACCTGTGAGCCAGAGGGACTGAATTGGACACAGGCAAGGAATCACAACAA
GATTTTCAGGCAGCTGGTTATATTATCTAAATTAGCTTTTCCATGAATCTCTGGGTCCAGACCATAGCCATAGGAT
TATAGAAATTAAGAGCCAGATGGGAACTATCCTCTTGCTTTGTTTTACAAGTGAAGGAACTGAGGCGCAGAGTGG
TCACATCATTAGCCTCAGATCCTAGAGTTAAGTGGTTGCTGAGCCAGGATGAGAATCAGGCCTCTGGCCACT
GTTCACTGACCTGCTGTTGAGGGCCTCAAGCACTGATGGGGCTTTTCTGGCCCCATATCTTGTGTTTCCAAAAC
AAACCTCCCATGCAATGATGTTTAGATAAATCTCAACTCTAATCAGTAAAAACAAGCAAAGGACAAGTATATTT
GCATCTATAGCTATTTAGGTAAGTGAAGTTAAATAAAAAATTCATTTCTTAGTTGCATTAGCCACATGTATCTA
GTGGCCACCATATTGGACTGTGCAAAATACAGAACATTTCTTTCATGGCACCGGGTTGGGTAGCACTGACGTGGAT
TATCCCAAGGATC

est24:

GGAAAGGCAAAGCAAGCTGCACAAAGGGGAAGATGGCCCGTAGCCTTGAAATGCACTCTTGCTAGCCCTCCCCATT
TTGGTTATTATCAGCAAAGATCAGTGACATGTTAATATATTTCCGCTATTTTACTGTGAATATAATGGTAAATTTT
AATAGAAATTTAGTTAGATAGCAGTTTTCTGAATCTGAAAGAAAGTGACATTGCTTGCGAATGCTCACAGTAGCAC
TTAACATTTGTGAAGTTCAACTCAATTTTTTATTTTGTGTTTTCACAGAAAGCAATAATCCCTCATATTTATAGTAC
CATCTGGGTTACAAAAATCCCGATGCGTCTTTGTTGGACAAGCCAGGATCTCAGGAAGGAGTGGAGGGGAGCTTC
ATCTCAGTGGCTTCTGCCCTGAATTTGAATTTTTAACAGGCAGCTTTTAAAGCATCCTGTGGCACTCATCCCATCT
CAGTGTAGCAGAGACAGTAATGTCTTTCCCTCTATGGTTGAGAAGGAGCTTTTGAATGCCCTTTTGGAAAGCTGTA
GAAATCTATGATACTCATCGTCAGCATTTCGACCATGAACTTAAACTCCTATCACACCTCTAGGTGTGATAATATT
TCTCCTTCTGTTACAACAGAGTAATGTACACTTTGGCACTTTTACTGTCTCTTGGGAGACTATCTCCAAGTGC
TGTCTGAGAGTGTAACTGCTATTTGGCTCATTTTTTCTGCACCAAGGAGAACAGAAACACAGCAGGCACCAAGAG
GAGGTTTAGTGTGAGTGGGTTGTTCTGAAAGGCAGTGAGTAAAATGAGGTATTCCTGACTTCTGCTTTTGGCTA
CATGAAGTCATGAGGTCCTTGAAGCCAGACTTAGGTACCGTTTTCTTTCATCCCTTGCTAGTTCCTAATCGTAGAC
ACAAACCTTCCACATCCATCCAGGCGGATGGCAGTGCTTCTTGTAGAAAGCAATGTCACTAAGGCAGTGTACTA
AGGAAAACAGGACAAGGCAACAGTTGTGTTGAGAGTTTTGACTGGCGTCTGATTGGAATTAGAAGGAAGATTATT
TTGCCATAACCTAGGTACCGTGACCCAAGCTCTTTTGGCAGACCTTGACGTCACAAACCGTACGCTTGCTGGAGA
AGGGAAAAGGAGAGTTGCAGCCACTAAGAGAGTCAAGGCTGTGGCCTGCCTGGTGGTGTTTTATAGGAACTGGCT
CAGGGAGGCTGCATGTCTTTGTTTTCTGAGGCCTTGTTCACGTGGCCTCCCACTTGGAGCCAGGAATATTGCA
GCAATGCCGAAGAGTGGGTGGACAAATAGCCTTATTATTAACCTAAGTTGGAAACATGGCTTTTTGAGTGTCTTC
ATTCACAGATGCAGTCACAAAATATTAATACTCTTTTTTTGAACATGACAAAACAAAGTATTCATTTAAACCTCC
TTTGTCCACGTCCATGGTAAAAGAGCACCTCAGGCAGGGGAG

est26:

GGCAGAGGGCGGCACGAGGGTGTGAGTCAAGAGGCAACACTAGGAGGCAAGGAATCTGCATTTCTTTCAGACCTT
GGCAGAGAGCGCCCTGGGAAATGCGGATATAGAAGGTGAGGAGAACATCTCTCTGTTTATACAGCATTCAGGA
CTCCTCATCTGTTTTTAAGAGGGAAATCTGAGTTTTCAAGGAAAGCCGAATACAGTTGCCAAGTTGCCAGTCAAA
GAAACAATGTCAACACCTGCTCATAGAGATGGAATTCCTAACCCGGAATATTGCCCTTGAATTACAACGAGAAAA
AGAACACTTCTTATTCTGTAGCACCTCTTCAAGTGAGATGGCAGACCACCTCAGGATGGAAATGTATTTCTTCA
TCCCCCTCTCTACTTCCCTGTGACCTCCTGCAATAAGGGAGAGACAAAGAGAAGAGCAGAAGAACAGAAGATG
GAGTGGCAAAGAGAAGAGAAGGAGTGACTGAACATTGACAAGACTTTGGTTGGGGATGGTCAGAGAGGAGATTAG
CTGCTAGACGGCCACACTGCGGAGAAAGATCATTTTTCCCACTCCATCCCCCTTCCAGCTCCCCATCCATCTCACC
AAGAGCCAGCTCCACCCTCAATAAAACCTTACATTCATCTTTT

est29:

AGGTTCTAAAAGGTGGTGGTACTGAAAACCTCGAAAATGTACCTCTGTTTCTCATTTCCAAAATCTGAGGTTGCAC
CTGTGTTTCTCATTTCCAAAGCCTGAGGATGCACCTCTGTTTCTCGTCTCCAAAGCCCAGGTTCCACTTCTGTT
CCTCATCTCCAAAGCCTGAGGTTGCACCTCTGTTTCTCGTCTCCAAAGCCTGAGGTTGCCTGCAAGTCTCTTGAG
GATTTTTTGGTGTAAACAGGTTGAGTTTCTGGATAGGTGGGCATATTGGCAGCTGAATATGTGGGTTTTGAGTGT
GAAATACAGGTTCTTAGCTATGACCCAGCAATCTTCTACTTGTCTGTGCTCTTCCACATAAAATGCTTTTTCTT

Anhang

GATTGTATTTTCATAGAGCAATTTCTGAGGCTGGAAGGCAGGAGCATTGTAAGAGACATGTCAGTGGATGGGGACA
CCCAAGCAGTGTCAAGATCTCTTAATGCCTGAGGCAGATTCTCACTTACTGCCAAGATAAAGAAGCAATTAACAT
TGACTGCTAAGGTGGACACTTATTCTTCATTTATGATAACGGTATATTTTTATGAAGAGGTTTTCTTTGGAGGATTT
CATTAGACACCTGGCATTTCCTCCCATTAACCTTCCAACCTTAAAAATTTTTGCATATGACTTAGACGAATGCTTGG
CCTTCTCAGGTGGCGCTACGCCTTCTTGTGAATTAGAAAATGGTTCTCAGGTGGCATTFTGTCCCCACAGCCCAC
CTCAGTTGATGACCTTATGCAGTATCCTTTCTACAGTAACATCCGTTTTTACTCCCTCCTCCTTAAGTAGGCCCTC
GTAAGTAGGCAATAGAATAAATGAGCCTCTATGCAGGATATCAGTGGAGTTTCAATGATGGACAGCTGTGGCCAG
CTGACATTTGGTACCTGGTCCATTTCAAGGATCATTACACTTTTACGCCACTCCACAGCTTTGTGCTCAAGTGCAT
AAACATTTGATGGGATTCTGTGTTTTTTCAGCAAATCATAAATTTCTGTCTACTTCTAGATACCCAATGTAAAGGAA
GGGATAATAGAAAAGTTAGAGTAGAATTCATGCATGGGTTGGCCTAACCCACAAACCATTTCACTAGAACATTA
GCTTGTGCGAAATGCCTTTACTCTTGGCAGGACACAAGCGCCATAACCTAAGAGGATGTGATTTGAGTGGAGTTTT
CATGCCCTGTGTGCTTATTGTATTCTTGTACTGATGCAAACATTATCTATAATTACATTTTTCAAGTGACTGAAA
ATTGCAGGCTTTGTGGAACAAAAATACAGCCAAAAGAAATGGAATGTATATTTCACTCCACCCTCATTATAAGGCTTT
CAGAAATCAGACTGTAAGGCCCAATACCATGGCTCTCAACTACGTGATACTAACTCCATTCTCTGATGTTTGAAC
ACTTTGTCAAATGCTGGGTTTTCCAATGATGATCGTATAATTTGAGGAAAATGCTATTACCCTTTTAGCGCTTCA
TTTGCTCCATTGTTGACTCAATCACAGTGGCACCTCCTCACACAAGTCTCTATTTCCACCCTGTGAAACAAACA
CAATTTGATTTAGATCGAAGCATGATAGGCAAAGTTGAGAAAAGTTGGTTGAGGTGCATGCCTTCTTGGGGCAGGT
GCGATTGCATCCCTGGGACATTATATGTCTTTACATCTCCAGCTCCATATAGGGCTTAGCC

est45:

GGCACGAGGAGACCTAAGTACTACATGGGCTATATCTGTTCTTGCCATCTTAATTGGCTACCAATCAAAGACGTC
AATAAAAGCATAAATGTAAATGAAAACCTTTGAGCTAGCCCTGGTTTTTAAACACCAATTTTTTATGATGGATTCA
CAGGTGAATAGTTTTCCCTTCTCCACCAAGACTTACATTATTAGAAGTGAAGAGGCAGCAAAAGTGTAAACAGG
ATGGATTGTACAAAGCATTAGGCTAAAACCTGGATATTCATTTTTCTGCGTAACTGAACAATGGCATAAAACCAGTG
TCTTGGGAAGTCTAGAAGAGCAGTCATTCTGCTTTGATTTTTGAATCACGTAATTTGAGGATGAGTCAAGTACAG
TAATTTTCATAGACATTTCTGTAAATCTGTGACCAACTTCTGAAAAGAATTGCCTAATGTTAACCATCTTTCTC
TGAAAAAACAACAAAAAACAACAAAAAACCACAAACCAACACACAAAATACCTTCCCTTCTTCATATATTA
ACTTCTATGTAATAGCACAAAGAAGAGCTAACATTTACTGTGCCAGGCAGTGGTTTTTAACTTCTTGTGCATATTA
GTTTTATTCCCTCAAACAATCCCAGGAGATGGGGACAATCAAGATGCCCTTTTTACTGTAAGCCCCAAAATTGTTAA
AACACACTGCTCAGAACCACACAGCTGTGAAGTGGTAGAATCAGAATTTGAGCCTAATCCAATTCAGGGCACAT
GACAGTGAAGTCCAGAAAGGCAGTTATGTACCTGAATGAGTCCAGTGAAGAGAATGTACAAAACGTACCAAATTT
CTTCCATTTTTCTTTAAAGAACTGCAAAGATTTCCCATAATTTTAGAAGGGGATGACATTCAGAAAAATGCTT
TCTTTCTCTTTCTGTGTTTTCAGAATATCTAAATTTGACTCATTTCTAATCTTTAAAATTTGTACATTTACACCAG
GAAAGACAGTCAAAGAAGGGAACATTTTTATTCCCAACTGACATTTCTGGGTTTTAAATATCCTTTGCAACAGTTTTG
TTTTGAAAGATCTCAGTGGTTGCATATGAACCTCCAGATGTCAACAATGTGTCTGCTGTGTACAATATCCCCAA
AGACTAAAGATACTTCTTGTGATATAGTATTTGGAAATAACTGGCAAACATCGTGGACCTGCAGCATCACTAAG
TGTCTGTGTAACACCTCTGAAACAACAGATGTTCTGAATTTCTGTTCCCTTGGAAATAACAAAATGACTTGCAGG
GAGCTGATGTTCCCCTCACTTTTCCAAAACAATTTTCCAGGAAGAATCCGTGAGCTCTCAAACCTCAGATCAGCTTCA
GGTTCTGGAATCCACCTGTGGCTACTGGCAGTTTTTTTTTGCAGGTGTTTGGCCGTGGGAAGCTGTCAAGAAATTG
GTCTAAATCAGGGCAGAGCTCCTGACAGAAGGATATTAACCAGC

est46:

GCACGAGGCTACAAAAGGAATTAATCCCTGAAAAGCAAGATGGTATCACATTGATTTTTAGGAATTTCTCATAATC
CAGTGGTTCTGCAAATATTTCTTATAATTTCTTCATCCTTTCTCTCTTCCACTCTCTCATAGATTTTTCTCCCTTC
TCTGATATGCATGTGCCTTCTAGTTGACTTTTTGTAAAGTAGAAAAGAAAATAATAAATTTCTTGGATCACGCCCTGAAA
TCCCAACACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGTGGATCACCTGAGGTGAGGAGGTCAAGATCAGCCTGGCCAACGTGGT
GAAACCGCATCTCTACTAAAAATACAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GCTACTCATGAGGCTGAAGCAAGAGAATCGCTTAAACCCTGGAGGCAGAGGTTGCAGTAAGCCAAGATTGCACCA
CTGCACTCCAGCCTAGGTGACAGAGTGAAGTCCATCTCACAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AGAAAGAAACAATAAGTCTTGCAGAGGTTAGAAAGAAGGTAAAGAAATGGTTACTTTGAATGGAGCAATAATCAC
ATTTTAAACATAAAGATTGTCCAAGATCACAGAGTAATCTGCATAATTTGTGCAAAAATTTCTCATGTTACATGACTG
TTCTCCCTGCAGTATACACTCAGCCTGTTAGTTTTTGTATCTAGAATCCTAGAACCTTAGAGCTCCATGGAACCT
GTTTTGCATCGTCTCCTTGTTCACAGATGAATAGGCTGAAGATCAGACAGTGGAAACTAAGTCCCTCATGACCAC
ACTGTGTGGGATCACTGGACAAGCTAACATTTTTCTTGGGGTGGATGGAGTCCAGTTATCATTTGCAGGGCCTGTTT
TTGGGGCAGAAGAGTCAGGAACCTTTTAACTGCTTTCTGGTTGTCTGTACCTTTTCTCGCCACTACTTTGGTAA
CTTGTATCCCCATCCCTGGGGACAAAATCTTCATTTCTAGCGTTTTTCCACCATAACCTTGTCTGGTGTCTGAAA
CAAGCAAAGCAAAGTGTGAAACAAGTGTGATGCTGGCATAATCACAGTGTAGAATGGTGTCTCCTCAAAATTTAG
GTGGCTATGGAAGTGACCGGAGGATTGTGTTTTAAATGCATGTTCTGATTCAGCTGGTCTGGGGCAAAACCTGAAA
TTCTGTATTTCTGACACCTCCCACGGGTTTTCTGATGATTCTGGTCTCAGACCATCCTTTGAGGAGCAAACGA
CTACAGAGCCACAGTCCCATCTTTGAAAGAAGTAACCCAGACTTGCCAAGTCTCTCATCCGGAGCTTTAAGAAAT
TTGATGCTTAGGCTTCAATTACATCTCAATAAAAATGAATGAATGAATGAATGAATGCTTTTTATTTATTTCTACCTTCT

Anhang

TTCTTCTTTTTTGTTTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGTGACAGAGCCTCGGTCTGTTGCCAGG
CTGGAGCGCAGTGGTGAATCTTGTCTCACCGGGAGGCAACCTCCGCTCCCAGGTTCAAGCGATTCTTCTGCCG
CAGCCTCCCAAGTAGCTGAGATTATAGGCAAGTGCCACCATGCCAGCTGATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACAG
GGTTTTCCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCCTGACCTCAGGTGATCCGTCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGC
TGGATTACAGGCATGAGCCACCGTGCCTGGCCAATTCTACCTATTTCTGATTGGCTTCTTCCCATTTGTTTTTT
GAGAAGATGCTACAAAGCATTGAAACTGGTACTGCAGGAGTAATTTCTCTTCAAACCTCTGAGTTACTATAAA
ACAGCTGTGGAATCCTGTGGATTGAAAAGAACTTGAGAAAGGCAATATTCTGTTACTGAGCTTAGGATACAGTAT
CATATTAGGATACAGTATCAATCAAGATTTGACTTTCAATTCTGAGTTTGTGATGAGTAGCTATAAATTGACAGAG
TGACAGAAGTTTTTATATTAGTGTGTTTTATTTTACCAATGTGAAGTGTATTGTTGTGAAGTAATTGAGTTCCTAGA
TGTTCTCATTCTGTATCAGTGGCTGTAGACAGTGAAGTCTAGATAGCATGATAGTGTATGAATGATATATATA
TATGGAGGGAGGGAAAAGAGGGACTATGAATTAACCATAGTTTTGAAATTGATTCCTGGAACTGACATTTATTGA
CTGCACAGGTGTTAAAATTGTCTTTGTTTTATTTACTCCATATGAACTGAAAAGTATTAGAGAAGCAAAAATCTT
CTCTACTTTGACTCTATTCCCATTGAGTCTATCCCCTCAACTAAAGTAAACTGAGGTATCTTAGATATAGAAAAT
CTAATTTGGAATAACTCAAGAGAGATAGAGGGGAGATGGGTAATACTGAATATGCAGAATTCAATCATAGAAAAC
TAATCACTTTAGTGAAGGCCAGCTGTTCTTTGTTTTCTAATGGGCATGTGATGTTGATGAAAAATAGCATTCAA
GTAAAGTTTACCAAGAACAACCTGGTTTGATTCAAGGTATTATATTATTTTGCAGTATAGGAAATGTTATTTAGAT
TTAACAAGGGCTGAACAGAGCAGCCAGTCCAAAGACCCAAATACCAAAGGATTATCTTAAATTTAGAGAATGA
AAAATGCAAGAGCATTGTATTTTGGGCATCAGATGATAATTTCTTTCAGAGAATATGCCTGGGTTTTTGTGTCCTT
CAAATTTGTTTTGAATGAACATTTTATGGATTTTTGTGACACTGAGGGATATGTTAAAATACCATTGCAAACATG
TCAGGCAACTCAAGTTTAGAAGATTCTCAACTTGAATTATTTTAGCATTCTGCTATTTGAATTAAGTTGGGGGAAA
ACAGGAGTTGTATGACAATTTGGAGGTCTTTTTCTTTGTCTCCCAAGTGAAGTTTGTAGGTTCACTGAATTTCCCC
AAAGAAGATCCTGAGACAAGAATTTGAGTCTAAGGACATGAGGGAGGGGGATGTGAGACAGGAATGGGGGAGGTC
AGCAAAGCCTGAGTGTAGGTGGGTTAGTGCCTGGACAACCTCAGGCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCC
TATAGTGAATCGGTATTACAATTC

est48:

GGCACGAGGCGGCACGAGGGTGTGAGTCAAGAGGCAACACTAGGAGGCAAGGAATCTGCATTTCTTTCAGACCTT
GGCAGAGAGCGCCCTGGGAAATGCGGATATAGAAGGTGAGGAGAACATCTCTCCTGGTTATACAGCATTCCAGGA
CTCCTCATCTGTTTTTAAGAGGGAAATCTGAGTTTTCAAGGAAAGCCGAATACAGTTGCCAAGTTGCCAGTCAAA
GAAACAATGTCAACACCTGCTCATAGAGATGGAATTCCTAACCCGGAATATTGCCCTTGAATTACAACGAGAAAA
AGAACACTTCTTATTCTGTAGCACCTCTTCAAGTGAAGTGGCAGACCACCTCAGGATGGAAATGTATTTCTTCA
TCCCCCTCTCTACTTCCCTGTGACCTCCTGCAATAAGGGAGAGACAAAGAGAAGAGCAGAAGAACAGAAGAATG
GAGTGGCAAAGAGAAGAGAAGGAGTGAACATTGACAAGACTTTGGTTGGGGATGGTCAGAGAGGAGATTAG
CTGCTAGACGGCCACACTGCGGAGAAAGATCATTTTCCCACTCCATCCCCCTTCCAGCTCCCCATCCATCTCACC
AAGAGCCAGCTCCACCCTCAATAAAAACCTTACATTCATCTTTT

est51:

GGCACGAGGATCACATTGAATGGTTAATTTATTTTAAATCTATGAAAGGAGCTGGAGAGAGAGAAGTAAAAATAT
TCAGGGGATTTTCTGTGTTTTAAAAGAGAAAACCTCCTGATTGCAAGCTCTAAAATAAATGCTAAGATTTGTAC
ACTTTCAGCCCACGGGAGATTTGCTTTTCTCGCATAGTATGGACTCACCAGGATCTGAAATTAGGGGCTTTCCCT
AGAGGTGGCCTCAGGCTTTTCTACCCCACTGATTGATGACAGAAAGGTCAGTGGGCTCTGAGGCTGCTGCC
GAGCGTGTCTCCCGGGTGGACAGCGTCCCTGTCTATTTTATTAGGATGTGTGCTGCTGTCGCGCACAGCCA
CAGGTGAGGATGCCAGCCCCTGCACGCCCTGCGTGTCTCATTTGAAAACCTGAGGGTATCTGGGAAGTCACTTACA
AGGTGCCGAGGAGCAGATGGCTAATTTAAAGGCAATCTGTATGTGCTCTGAGCCTCCCAAATATCCATTTCTTG
AATCCTCAATGTGTGAAATTCAGCACACTAAGTCCCTCACAGGCTAGGAAATCAAATGCTGGACAGGCCATTCCCT
ACCATCATCTGGAGTATTTCAGAGTATTTGGAATATTCACAGTCTTCAAGGTGTAGCTGTGCGGCTCTGTGAAGGA
TACCTTGCATTTATAGGGATCGTCAGGTCTCCTCTTCTACGTATTTGAAGTATTATGGCTTGGAGTACTTTCTC
CACCAATGAAGAAAAGTAGGGCTTAACTCTGTCTTCCATCAATCTGTGCACATGTTATGGAGTGACCATGGTG
AATGGGCCGATAGAGGTTCCCTTCTAGGAGAACTTTCCAGCTTCCCAAATGTGAGAGGGGCGCTCTCTCCC
GAATTTCCCAGAGCCCTTTTCTCCCTTCCCTCTGCCCTCACCTCCCTGGATGCTTACAGTACTCTGTGGATACT
CTTCCGTGCTCCAGGAGAGCATGGCCCCGTGGCTGATAGACTCAGCTCTCACCCCTCTAAGAGCTGCTCATGAGT
ATCCTCGAGTGGATGAGTGAACAGATTTCTAACTCAACAGACATAAATCCCCAGTGGAGCTTAAAGTTAAATGCC
GGTTTTTAAATTAAGAAATATGACTTCAGCAATATGTATAAACCAAAGGAACATTAACATAATGATAGTATCTTT
ACAAATGAGTTGTTGAGGATTTGGAGATAGTTTGTATAACATAAAAACATAACAAATACAGTAGAAAAGCATATGGT
AGTGGGATTGAAGAAACCCGAGAGGTTATTTATCCCAAACACCACCTGATGTTACAGTGTCTTATGAGTGATTGA
TACTGTGCTCTACGTAGAGGGGGCACATAAACAATTCACATGTAATTTTTCTGTATTACATTTGACAGATATATAT
AAAATGATCTCTGCATCTAAAATTCAGCAGTCCAGCCTGGAATACTATCACCAAAAAGTGAAAAACGATTTTAG
AAACGAATAATATTTTGTGTGAACAACCTCTGAAAACATACTGGTCGATGAGGTTTATAGCTAGAGTCTAAAATG
CCACATTTATATGGGTGAAACATTTTCAGCTTCAGGAGAAAATAAAACC

cDNA-Sequenzen:

est15-RACE1:

CAAACATACAAACCTAAAATCTAAAAGATACTTTTGACACCATTCAAAGTGGAGATTATGGTTGAACCAACAGTG
GCTGCACTGAGCTCCAGCTTCCAGATCAGCAGTTGAGCTGCCTCTGTGTACCCAAAACCTCCCCATGTCAACCAGC
AGGAAGAAAACAAAACACCTGGGCAGCCATTTGTTTTGAGCTTTCACTTTTGCATTTGCTTTTGAAGCTGTGCTA
TGCAACACTTAAATTATAATCTGTTTATTTCTCTCACATGTGGAGCTCCCGTCTCTCCAATGAGTTTATTTAGCA
AATGTTATGAATTCAGGAAAATTATGATTAATTTTGGAGCCCCAGTCTAGACCTGTCATTTTAACACTGAAGAAC
TACAGTTAGATGCTTTGTGTGGTTATTAAGAAGAACAGTAATTTTTCAGTAGTATAAAAAATATCAACAATGATT
ACAGGTGACTTTTTGGCTTAAATATTTCAACTCCCCAACACCTTTCAAGAATGTTGTGAGATCATAAAAAAGTCCAG
GAGCAAAATATTAGTTAAGGAAGAATGAGGCTATTTAATTGGTTAGACTTGTGGTGAGAAAAGGCATGCTGTTG
TAGTCTGTTTTCCATGACCACAGCTGTTTTCCCCACCCAGTTTTTGTAGTAGTATAATATTAAGCCTTAATTTTCAACT
GAAAGTTTTCCACCTCCGGTCCCGTAGTCCAAATCAAGTTATTAATTTTAAACCTTATGGCTTTTCCCTGTATATT
CCCTGGATTACAGCTTACCCTTTGGCCCCATTTAAAGAACCATATTGCTAGTATCCCGGGCTTTGTGTGTACTTG
AATTGTTTTTTCTTCTGTATCTTTTCCATGGATGGGATAACTGGGAAAGAGACGAGGGAGTGTGTGAGTCAGTAA
CGATAGTGTAGGATTTTGTCTGTTGCCGACAGTTTATGGATTGTTGGTTTTGTATTGTTTTTATTTTGTCTTTTGG
CAAGGCTGTGTTCCCTTCCAGTTGAGTGAGGTGGATAGAGTTTTGAACTCTGGACTCTACCATCACCTTATTCCTG
GAGATGTATCAGTACCGTATACACAGGGACCCATGTGTGGCCATGAGCCTTGCTGTAGAACCTGTGGCTCCAG
AGAGCCACCTGGCCACAGAGAGCAAAAAGATAATTTTAGCCTTGAACATAAAAGGAGGAATGAGGCTGTGTTTTCTG
GACCAAACCTAACTTGAGTCCCTGGATGTTTTACATCTTATGGTGAATTGAGTC

est15-RACE2:

GACACAGAAAAGCTCACAGTTAAATTTCCAGGGGAAATGTGGTTTTCCAAAATTGATACCATATGACCCTGGGAG
GAGAATTAATAATGTTTTTGTAGTAATATGGGTTGTTGTTAATATTTCTGTATCCTCCTGTCTTGGTGAGTTTT
TAGCTTTCAACATCAGTGATATCTGTTTCATTGTTGTCTTTACTAACAATAAGACACAAGTCTTTCCAAGTAGTTC
TGTTTTCCCTAAATCAGTCATCTAGAAAACAAACATACACACTTTGTGATTTTCAAAGAAAATGTAGAGCTGAAG
GCAAGAGCACAGGTATCACGCTTTTTGTGGTTTATAATCTTTATTTTGGACCTAGTTACTTTGTGACGCCCTCCC
AGCATAGCAAGTGTGTGCACTGCTATCTAAACATGAACCTGCATGCCATGTCTTAGAGGAACTTGCGATCCACC
TTGTTTTGAAAAGACTTCCCTTACATAATCATACTTGAATGACTTCATTGATTTGGGAATTCCTGTTTGTGTTTT
TGTTTGATTGCCCTTATATAATGGTCTGCAAGAACAACATACAAAACCTAAAATCTAAAAGATACTTTTGACACC
ATTCAAAGTGGAGATTATGGTTGAACCAACAGTGGCTGCACTGAGCTCCAGCTTCCAGATCAGCAGTTGAGCTGC
CTCTGTGTACCCAAACCTCCCCATGTCAACCAGCAGGAAGAAAACAAAACACCTGGGCAGCCATTTGTTTTGAGC
TTTCACTTTTGCATTTTGAAGCTGTGCTATGCAACACTTAAATTTATAATCTGTTTATTTCTCTCACATGT
GGAGTCCCGTCTTCCAATGAGTTTATTTAGCAAATGTTAGAATTCAGGAAAATATGATTAATTTTGGAGCCC
CAGTCTAGACCTGTCATTTTAACACTGAAGAACTACAGTTAGATGCTTTGTGTGGTTATTAAGAAGAACAGTAAT
TATTTTCAGTAGTATAAAAAATATCAACAATGATTACAGGTGACTTTTTGGCTTAAATATTTCAACTCCCCAACCT
TTCAAGAATGTTGTGAGATCATAAAAAAGTCCAGGAGCAAAAATATTAGTTAAGGAAGAATGAGGCTATTTAATTGG
TTAGACTTGTGGTGAGAAAAGGCATGCTGTTTGTAGTCTGTTTCCATGACCACAGCTGTTTCCCCACCCAGTTTT
TAGTAGTATAATATTAAGCCTTAATTTTCAACTGAAAGTTTTCCACCTCCGGTCCCGTAGTCCAAAATCAAGTTAT
TAAATTTAAACCTTATGGCTTTTCCCTGTATATTCCCTGGATTACAGCTTACCCTTTGGCCCCATTTAAAGAACCA
TATTGCTAGTATCCCGGGCTTTGTGTGTACTTGAATTGTTTTTTCTTCTGTATCTTTTCCATGGATGGGATAACT
GGGAAAGAGACGAGGGAGTGTGTGAGTCAGTAACGATAGTGTAGGATTTTGTGTTGCCGACAGTTTATGGATTG
TTGGTTTTGTATTGTTTTTATTTTGTCTTTTGGCAAGGCTGTGTTCCCTTCCAGTTGAGTGAGGTGGATAGAGTTT
TGAACTCTGGACTCTACCATCACCTTATTCCTGGAGATGTATCAGTACCGTATACACAGGGGACCCATGTGTGG
CCATGAGCCTTGCTGTAGAACCTGTGGCTCCAGAGAGCCACCTGGCCACAGAGAGCAAAAAGATAATTTTAGCCTT
GAACTAAAAGGAGGAATGAGGCTGTGTTTTCTGGACCAAACCTAACTTGAGTCCCTGGATGTTTACATCTTATG
GTGAATTGAGTC

est20-RACE1:

CGCACAGCACACACGCACACACAGCACACACACGAGCACACAGCACACAAAACGCACAGCACACGCACACACATGC
ACACACAGCACACTAGCACACAGCACACACACAAAAGACACAGCACACACATGCACACACAGCACACACACGCGAA
CACAGCACACACGAACACAGCACACACAACACACACACAAAATGGCAAGCAGAGAAGAAAAGTTTTGCTGTAAAT
GGAAAAGGGGCTAGTTAGCTACACTGGGGAATGCTGTAATGGTAAAGCCAATGGGTGAGACAGTGAGATGGCC
TTGGAAACACTGCAGGAATTGGTATTTTGGATCAGTATTCTTTTCACTCTATGTAAGTGACAGACATGTTTCT
AATCCAGTATCCACATTCAGGTATTAATTCACATTGGAGAAAACCATAAGATACACTCTGGACAGTGATCAGTTT
GAAGAATAAAGGAATATAATTTCTCTATTTCTACTGGAAGATCATAAATAGGAATTAGGGAGAAGAATTAAGGG
CTGAGAGAATATTTACTCACACACTATTTAACTGACCCACCATCTGATCATTATAAAAAATGTTGGGCTTTATT
GCTTATGTAGGACAAATTTCTGCAGCTTTACCCGCATGTGGGTCAAACCTGTCTCTTTATAGTAGTCTTCCAGTC

Anhang

TTGTCTGCATTTACTAAGTTCATGAATTGCTGCTATTTTGTTCCTTTTTAGCTTTTGGGGAAAAAATCCTTCCC
AAACTACTATAGTTTAAATGGGAAGTGCATCCTAGTCAAGTAAAGAAATAACGCAAACATCAGGGAGGGGGAGGAG
CAGAGGAAACAAGGCCTTACTCAGAATTGCTATCAATTTTAAATACCTCCCTACTAAACATTCTGTGTAGGGGATG
CCTTAGTAATCTGAATTTTTTAGAAAGGGGTGTTTTTTAGAGAGGGATATTTATGAAAAGCTAGTATTAACATGTT
TAAAGTCTGCCCCCCCCGCCCAATGCTAAACGTTCCCAGTGATGCACCAGACACCAAGTGTACGGAAACAGGTA
ATCCACCACCTTTTACAGAAAGCTTTTTAGCTCCTAACTAGGCCACTGTACCTGATATTTGGGAAACGTTTTTGA
GGATATCAAGGAGATGGAGGAGTTCCAAGGGAGAGCAGCATGAATCGCAAAGGTCCGGGAAGGTGAGCCACATG
GAAAGGTCTAGGAGGTTAACTTAAAAGACCTCAGAGCATTGAGTCATGAGATTGAAAAGGGGGAAAGGCTGTAGC
AAGACATTAAGAGGGGATTTGTTCTCAAAAAAAGAGAGAATATGATTGAAGTTTTGAAGACGCTAAAGTGC
AGAGTGAAGCTATATATAGATAAGTTCTTTCAATTAATGCTAAACCTGGGATACTGCTGATGTTTAAAATG
TTGGAACAGCAGGCAACATGTAGAGTTTTGAGCCAAACTTTTACAGAGACGAGGTGGTGAACCTTAGAGCATGTTAC
AAAAGTTAAGGAGATGGTGGGGCAGCTCACCCAGCAGTCCCCAGGAGGGGGCCTCCGGTCAGCTCTCACATAGGC
TTAATGCAGAGCCCTTTTGTAAACAATGAGTTGAGGTTAGGGTACCCTTCAAAGCCCTGGGACCGTTTTAATGTTG
AACTGAATATAGAACAGAAACGATGAAAAATGTGGTGCCGGCAGCTGACACAGTGTTTACCAAAGCACCAGTCAT
GTGGCAGTAGATGCTTCTGGGTGCCTACTGTGTGCAAGGCATCATTCTCAGTGCTGAGAACATAAAGATGAGCAA
GCCATGTTCTTTGCCCCAGAAGGAGAGAAAGAATTGTCTGTAGTAAAGAGAGGAGAGCCACAATTACCTCGAAAT
GTAAAACAGTTTTCGGGTTAGCCATGTCCGTTGCACACATGCATGCATGTGTGTTCTTGTGCGCGTGTGTTTTCT
GTTTAGCAGAGAATGCGCTAGAGAGCGTGATCATCTGTGCTATTCATATAATAAAGATGAAGTGAGAGAACATT
AGAGGAACCAAGGCCATGTGATGGTACACGTCGACGTTTTTTTCCCTTTCGGTTACATGCCCGTATCTCTCTTTC
CCCTTTTTCCCTTTGTCTTCAATTTGGTTCCCTCCCTATAGGGAGTTTAGGACAAGAAGAGGCTAAAAGTTTCAC
TGATGAGCCTTTCTGAGGGTTCTCCATTAATCCAAGGACAGAAAATGTACAGTCCCTCTTATTAGCATAACGAAG
CCATCAGCATTGCATCAAGCGGGTCTCGTACCCTTTTTCCCTTGTAAATGGTGTGTTGGTGTAGGGTCTTGAGGAAGA
GCTGCCAGCCCTACCTGATGGATCAAAAATCCCTTGGCACCAAAGAGTGACTGATAGTGTAAACCATCACAGGA
GACATGTATGTATGTGTGGAACCTCTGACGTGTATTTTAACTTTGCAATAGCCCAAAGTTAATTTGTTTCTTT
GCCATTTGTTTTCGAATGGGTGTGGCATTGCTTATAAAATGTTGAATGTAAGTTGCCTAGGACGGCGCCTGGCAT
ATGTTGGAAACTGAATAAAGGCTGCTAGGTAGTGTAGCTAGACTAGACTAGAAAACAGTACAGATGCAGATGCTT
TCAGATGTTCTCTGCCACAGAGAGACCTTTCTGTGTGCTTTTGTCAAAGTTGACAGTGTGAGTAAACTACCAT
CAACAAGGCGTTACTTTTTGGGTAATTTTTTCAATGTTTATCCAGTTCCCTTCATCCGCTTTTACATAGCCTTGTG
TACTGCAAGCTACACTCAGTTTTTGAAGATGGTGGGTTAGCGTTAGAGTGGTGTCTGTGGCCAGTGAGGAGGAA
GCTTGCTCACTTTAATGCAGAATGTCTAAGCATCCTGCGCTAACCATTTGGCAGGAAGGTTATTTTCAGTGAGACGC
TGTTTCCCTTCTCACCCCTGCACCCTTCTGGAATCACCACTGGTTGCAGAAGCCTATATAGGGTGGCTCATTTGG
ACGAAGTATTGTTAAGGTGGTTATTAGAAGACTCGCAACTTAGAAAAGGAAGTAAACATGTTAATACTAGCTTTC
ATAAATCCCCCTCTCTAAAAAACACCCCTTTCTAAAAAATTCACATTAATAAGGCATCCCCTACACAGAATGTTT
AGTAGGGAGGTATTAATAATTAATAGCAATTTCTGAGTAAGTTCCCTTCTCATGTAGTAAATGCAGCATGATGAAAGA
AATAAAAGTCTCCTTATTTTTTTTACTTTCTGTGTTGCTTCTTAAATATACTCCTTCAAGTCAGGTTAGCTTACCT
TGGGTGTTTGTATTTTG

est20-lambda1:

CTGATATTGGGAAACGTTTTTGAAGGATATCAAGGAGATGGAGGAGTTCCAAGGGAGAGCAGCATGAATCGCAA
GGTCCGGGAAGGTGAGCCACATGGAAAGGTCTAGGAGGTTAACTTAAAAGACCTCAGAGCATTGAGTCATGAGA
TTGAAAAGGGGGAAAGGCTGTAGCAAGACATTAAGAGGAGGGATTTGTTCTCAAAAAAAGAGAGAATATGATT
GAAGTTTGAAGACGCTAAAGTGCAGAGTGAAGCTATATATAGATAAGTCTTTCAATTAATGCTAAACCTGGG
ATACTGCTGCTGATGTTTAAATGTTGGAACAGCAGGCAACATGTAGAGTTTTGAGCCAAACTTTACAGAGACGA
GGTGGTGAACCTTAGAGCATGTTACAAAAGTTAAGGAGATGGTGGGGCAGCTCACCCAGCAGTCCCCAGGAGGGG
CCTCCGGTCAGCTCTCACATAGGCTTAATGCAGAGCCCTTTTTGTAAACAATGAGTTGAGGTTAGGGTACCCTTCAA
AGCCCTGGGACCGTTTTTAAATGTTGAACTGAATATAGAACAGAAACGATGAAAAATGTGGTGCCGGCAGCTGACAC
AGTGTTTACCAAAGCACCAGTCATGTGGCAGTAGATGCTTCTGGGTGCCTACTGTGTGCAAGGCATCATTCTCAG
TGCTGAGAACATAAAGATGAGCAAGCCATGTTCTTTGCCCCAGAAGGAGAGAAAGAATTGTCTGTAGTAAAGAGA
GGAGAGCCACAATTACCTCGAAATGTAACCAGTTTTCGGGTTAGCCATGTCCGTTGCACACATGCATGCATGTG
TGTTCTTGTGCGCGTGTGTTTTCTGTTTAGCAGAGAATGCGCTAGAGAGCGTGATCATCTGTGCTATTCATATA
ATAAAGATGAAGTGAGAGAACATTAGAGGAACCAAGGCCATGTGATGGTACACGTCGACGTTTTTTTCCCTTTCGG
TTACATGCCCGTATCTCTCTTTCCCTTTTTTCCCTTTGTCTTCAATTTGGTTCCCTCCCTATAGGGAGTTTAG
GACAAGAAGAGGCTAAAGTTTCACTGATGAGCCTTTCTGAGGGTTCTCCATTAATCCAAGGACAGAAAATGTAC
AGTCCCTCTTATTAGCATAACGAAGCCATCAGCATTGCATCAAGCGGGTCCCTCGTACCCTTTTTCCCTTGTAAATGGT
TTTGGTGTAGGGTCTGAGGAAGAGCTGCCAGCCCTACCTGATGGATCAAAAATCCCTTGGCACCAAAGAGTGA
CTGATAGTGTAAACCATCACAGGAGACATGTATGTATGTGTGGAACCTCTGACGTGTATTTTAACTTTGCAAT
AGCCCAAAGTTAATTTGTTTCTTTGCCATTTGTTTTCGAATGGGTGTGGCATTGCTTATAAAATGTTGAATGTAA
GTTGCCTAGGACGGCGCCTGGCATAATGGTGGAAACTGAATAAAGGCTGCTAGGTAGTGTAGACTAGATGGACTAG
AAAACAGTACAGATGCAGATGCTTTTCAGATGTTCTCTCTGCCACAGAGAGACCTTTCTGTGTGCTTTGTTCAAAG
TTGACAGTGTGAGTAAACTACCATCAACAAGGCGTTACTTTTGGGTAATTTTTTCAATGTTTATCCCAGTTCCCT
CATCCGCTTTTACATAGCCTCTTGTACTGCAAGCTACACTCAGTTTTTGAAGATGGTGGTTAGGCTTAGAGTGGT
GTTCTGTGGCCAGTGGAGGAGGAAGCTTGTCACTTTAATGCAGAATGTCTAAGCATCCTGCGCTAACCATTTGGC

Anhang

AGGAAGGTTATTTTCAGTGAGACGCTGGTTCCCTTCTCACCCCTGCACCCCTTCTGGAATCACCACTGGTTGCAGAA
GCCTATATAGGGTGGCTCATTTGGACGAAGTATTGTTAAGGTGGTTATTAGAAGACTCGCAACTTAGAAAAGGAA
GTAAACATGTTAATACTAGCTTTTCATAAATCCCCCTCTCTAAAAAACACCCCTTTCTAAAAAATTCACATTA
AGGCATCCCCTACACAGAATGTTTAGTAGGGAGGTATTAATAATAGCAATTCTGAGTAAGTTCCCTTCTCATG
TAGTTAATGCAGCATGATGAAAGAAATAAAAGTCTCCTTATTTTTTTACTTTCTGTGTTGCTTCTTAAATATACT
CCTTCAAGTCAGGTTAGCTTACCTTGGGTGTTTGTATTTTG

est20-lambda2:

GTTTTTGAAGGATATCAAGGAGATGGAGGAGTTCCAAGGGAGAGCAGCATGAATCGCAAAGGTCGGGAAGGTGA
GCCCACATGGAAAGGTCTAGGAGGTTAACTTAAAAGACCTCAGAGCATTGAGTCATGAGATTGAAAAGGGGGAAA
GGCTGTAGCAAGACATTAAGGAGGGGATTGTGTTCTCAAAAAAAGAGAGAATATGATTGAAGTTTTGAAGACG
CTAAAGTGCAGAGTGAAGCTATATATAGATAAGTTCTTTCAATTAATGCTAAACCCCTGGGATACTGCTGCTGATG
TTTTAAATGTTGGAACAGCAGGCAACATGTAGAGTTTGGCCAAACTTTTACAGAGACGAGGTGGTGAACCTAGA
GCATGTTACAAAAGTTAAGGAGATGGTGGGGCAGCTCACCCAGCAGTCCCAGGAGGGGGCTCCGGTCAGCTCT
CACATAGGCTTAATGCAGAGCCCTTTTGTAAACAATGAGTTGAGGTTAGGGTACCCTTCAAAGCCCTGGGACCGTT
TTAATGTTGAACTGAATATAGAACAGAAACGATGAAAAATGTGGTGCCGGCAGCTGACACAGTGTTTACCAAAGC
ACCAGTCATGTGGCAGTAGATGCTTCTGGGTGCCTACTGTGTGCAAGGCATCATTCTCAGTGCTGAGAACATAAA
GATGAGCAAGCCATGTTCTTTGCCCCAGAAGGAGAGAAAGAATTGTCTGTAGTAAAGAGAGAGAGCCACAATTA
CCTCGAAATGTAACCAGTTTTCGGGTTAGCCATGTCCGTTGCACACATGCATGCATGTGTGTTCTTGTGCCGCT
GTGTTTTCTGTTTAGCAGAGAATGCGCTAGAGAGCGTGATCATCCTGTGCTATTTCATATAATAAAGATGAAGTGA
GAGAACATTAGAGGAACCAAGGCCATGTGATGGTACACGTCTGACGTTTTTTTCCCTTTCGGTTACATGCCCCGATC
TCCTCTTTCCCTTTTTTCCCCTTTGTCTTCATTTGGTTCCCTCCCTATAGGGAGTTTAGGACAAGAAGAGGGCTA
AAGTTTCACTGATGAGCCTTTCTGAGGGTTCTCCATTAATCCAAGGACAGAAAATGTACAGTCCCTCTTATTAGC
ATAACGAAGCCATCAGCATTGCATCAAGCGGGTCCTCGTACCCTTTTCCCTGTAATGGTGTGTTGGTGTAGGGTCC
TGAGGAAGAGCTGCCAGCCCCTACCTGATGGATCAAAAATCCCCTTGGCACCAAAGAGTGACTGATAGTTAACC
ATCACAGGAGACATGTATGTATGTGTGGAACCTCTGACGTGATTTTTAACTTTGCAATAGCCCAAAGTTAAT
TGTTTTCTTGCCATTTGTTTTCGAATGGGTGTGGCATTGCTTATAAAAATGTTGAATGTAAGTTGCCTAGGACGGC
GCCTGGCATATGGTGGAACTGAATAAAGGCTGCTAGGTAGTGTAGACTAGATGGACTAGAAAACAGTACAGATG
CAGATGCTTTTCAGATGTTCTCTCTGCCACAGAGAGACCTTTCTGTGTGCTTTGTTCAAAGTTGACAGTGTGAGTA
AACTACCATCAACAAGGCGTTACTTTTTGGGTAATTTTTTCAATGTTTATCCAGTTCCTTCATCCGCTTTTACAT
AGCCTCTTGTACTGCAAGCTACACTCAGTTTTGAAGATGGTGGGTAGCGTTAGAGTGGTGTCTGTGGCCAGTG
GAGGAGGAAGCTTGCTCACTTTAATGCAGAATGTCTAAGCATCCTGCGCTAACCATGGCAGGAAGGTTATTTCA
GTGAGACGCTGGTTCCTTCTCACCCCTGCACCCCTTCCCTGGAATCACCACTGGTTGCAGAAGCCTATATAGGGTGG
CTCATTTGGACGAAGTATTGTTAAGGTGGTTATTAGAAGACTCGCAACTTAGAAAAGGAAGTAAACATGTTAATA
CTAGCTTTTCATAAATCCCCCTCTCTAAAAAACACCCCTTTCTAAAAAATTCACATTAATAAGGCATCCCCACAC
AGAATGTTTAGTAGGGAGGTATTAATAATAGCAATTCTGAGTAAGTTCCCTTCTCATGTAGTTAATGCAGCAT
GATGAAAGAAATAAAGTCTCCTTATTTTTTTACTTTCTGTGTTGCTTCTTAAATATACTCCTTCAAGTCAGGTT
AGCTTACCTTGGGTGTTTGTATTTTG

est21-RACE1:

GAGGATTCATTGGTGTCTGCCCTAAAGCGCTTTGGGAATGGGAAGCCCTCAATAAATCTTCTTGTGGTGATTGT
TTCCCTGTTGCCATTTCTAAAAGTTCATCTAGAACACCTACCTCTCCCTGTGCAAACGCCCTCCTGCTTGGCCCTG
AAGTCCACTGAACTATTTCTGATAAATCACAGAAGGAAATGAGTTGCCCTGGGTGAGGGCTGTCTTAAGCTGCTG
CCTTGCTCCCTTCCCAGGGAGGGTTATTGTCTGTTTCCAGCCATCAGGTACCCCTTAGATGTCTCCAAATTTACTTC
TTTTGTTGGGGTCTCCAGCTTTGTGCCTTTTACTAGCAGTCACATTTGAAAATAAGGTAATAAGGTTTCCCTTTTCC
AAATGCCTGTGTTCTGTGATCTTTTCTGCAGGAATAGTTCTCTACGAATTTTGGATGCATTTTACCCTGGCAAGC
ATTTGAGACCCCCAACCGAACACAGTTTCCAGCAATACCTTTGGTAATCCAGCATAATGTCCCAAGAACACAAATG
TGTTATTTCTTAGTTGTTTGTGAATANCAATGATGTCTGTACATTTCTAAGAACTATTTTTTTAATTTTGTCA
AAGTGCAGGATTGATCATAAGGTAATACGTGTGTATGTACATATAGGAAACCTGAACCTTTTCTTCAGAGGAGCT
CAAGCTATTTAATGACAATTTGACCATTTAGAGAAGGGCTTTGACTTTGTAATGTTTAGGGTATTTGCTCTGGTC
AATTTTCCATGTGGATTCACTAGCTGATGTGTGGCCATCTCAGAGATGGTTTGGGGCTCATTCCATAATTTATG
TGGCGGTGACTCAAAGGTTTAGTACACATGATAAATGGTAACAATACCTTCCACCTAAATAGGGGAGTGCATT
ATTTTACATATTTTTGGTGGCGTAACCTGATAACCAAAACATTTTGTAAATTTACCCAAAGTTTTTCAGCAGCCC
TGGATGCCACTACAGTTAAGACATAACTGTGTGCAAAAGGTGGCAAACTCTGCCCTGCCGAAAGGCAGTCATGGA
AGACAGACGCGTTTTTTCATGATGACCGTGAAGCAGTGCATTTTAAAAGGGAGTTGCAATTTCCAGAGCTCTGGGT
TGGATGACCACTGACTCCTCTTCTAAATCGAAAGGATGCGCTAAGTTGAGCATGGACAGGGCGCTCCTGAGGG
TAGGGCCTGAGTTTCTGATGTGTTCTCCAGCATGCAGTGTGGGAAGGAGCTGATGCTGAGACCTTAGTTGCCCA
CTGCCAGTCTGTTGGGAAGAGAATTTCTTCTTAAATAATGGCAACACCAAAATGAACAATGTAGAGATTGTTAA
TATTAATGAATTTTCATGTCTGTCTGTTTCCGCGGGAGGCACCAAGCCATCGCCAGGTTCTTTCTGCTTTTGC
CTTAAGCAGCTGAGTCTGGACAGTTTCTGTGTAATAACCAAAAGCCCTGTTTCTTCTGCTGCTATTACTTAAG
TACAAGTGATATTTAAAATGATTCCTGAGCCCTTTGAAAGAGTGGCTTGTAGCTACAGAAATGATGGGACTGA

Anhang

AGTTAGGACATTAAGAAGAGCATTGGCATACTGGCAAGAGATGGGGCTCTCGCAGCACCCCAATTAACCGGCCA
CTCAGCGGCCTGTGCGGAGCCTCCAGGCTACTCTCCATAGTGTGAGTGCACACCTTGTGAGCTCTCCAGCCTGCAGC
CTGTGTACCTGTGAGCCAGAGGGACTGAATTGGACACAGGCAAGGAATCACAACAAGATTTACAGGCAGCTGGTT
ATATTATCTAAATTAGCTTTTCCATGAATCTCTGGGTCCAGACCATAGCCATAGGATTATAGAAAATTAAGAGCCA
GATGGGAACTATCCTCTTGCTTTGTTTTACAAGTGAGGAACTGAGGGCGAGAGTGGTTCACATCATTAGCCTCAG
ATCCTAGAGTTAAGTGGTTGCTGAGCCAGGATGAGAACTCAGGCCTCTGGCCCACTGTTCACTGACCTGCTGTT
GAGGGCCTCAAGCACTGATGGGGCTTTTCTGGCCCCATATTCTTGTGTTTTCCAAAACAAACCTCCCATGCAATGA
TGTTTAGATAAATCTCAACTCTAATCAGTAAAAACAAGCAAAGGACAAGTATATTTGCATCTATAGCTATTTAG
GTAAACTGAAGTTAAATAAAAAATTCATTCCTTAGTTGCATTAGCCACATGTATCTAGTGGCCACCATATTGGAC
TGTGCAAATACAGAACATTTCTTTCATGGCACCGGGTTGGGTAGCACTGACGTGGATTATCCCAAGGATC

est21-RACE2:

GAAACCAGTCTCCTGTCAATCATCCAAAGAGCCACTTTCAATTAGTTGCCCATAGCCAACAGGTGGCTTCAGCAG
CATCCAGCCATTGGCAGGTAAGTCAGACTGGAAGGATACCCTAGACCTGCTGTAGAAGCAGGGGCTCCTGGAGGA
ATTTCTGTCTGTAAAGTTAGGGGCAGTCACACTGAGCTCAGCCGAGGAGAGAGGATTCATTGGTGTGTCCT
AAAGCGCTTTGGGAATGGGAAGCCCTCAATAAATCTTCTTGTGGTGATTGTTTCCCTGTGCCATTTCTAAAAG
TTCATCTAGAACACCTACCTCTCCCTGTGCAAACGCCTCCTGCTTGGCCCTGAAGTCCACTGAACTATTTCTGAT
AAATCACAGAAGGAAATGAGTTGCCTGGGTGAGGGCTGTCTTAAGCTGCTGCCTTGCTCCCTTCCCAGGGAGGGT
TATTGTCTGTTTCAGCCATCAGGTACCCCTAGATGTCTCCAAATTTACTTCTTTGTGGGGTTCCTCCAGCTTTGT
GCCTTTTACTAGCAGTCACATTGAAATAAGGTAATAAGGTTTCCCTTTTCCAAATGCCTGTGTTCTGTGATCTTT
TCTGCAGGAATAGTTCTCTACGAATTTTGGATGCATTTTACCCTGGCAAGCATTGAGACCCCAACCGAACACA
GTTTCAGCAATACCTTTGGTAATCCAGCATAATGTCCCAAGAACAACAATGTGTTATTTCTTAGTTGTTTGTGAA
TANCAATGATGTCTGTACATTCTTAAGAACTATTTTTTTAATTTTGTCAAAGTGCAGGATGATCATAAGGTA
ATACGTGTGTATGTACATATAGGAAACCTGAACCTTTTCTTTCAGAGGAGCTCAAGCTATTTAATGACAATTTGAC
CATTAGAGAAGGGCTTTGACTTTGTAATGTTTAGGGTATTTGCTCTGGTCAATTTCCATGTGGATTCACTAGC
TGATGTGTGGCCATCTCAGAGATGGTTTGGGGCCTCATTCCATAATTTATGTGGCGGTGACTCAAAGGTTTAGT
ACACATGATAAATGGTAACAATACCTTCCACCTAAATAGGGGAGTGTCAATATTTTACATATTTTGGTGGCGT
AACTGATAACCAAACATTTTGTAAATTTACCCAAAGTTTTTCAGCAGCCCTGGATGCCACTACAGTTAAGACAT
AACTGTGTGAGAAAGGTGGCAAACCTCTGCCCTGCCGAAAGGCAGTCATGGAAGACAGACGCGTTTTTTCATGATGA
CCGTGAAGCAGTGCATTTTAAAAGGGAGTTGCAATTTCCAGAGCTCTGGGTGGATGACCACTGACTCCTCTTCC
TAAATCGAAAGGATGCGCTAAGTTGAGCATGGACAGGGCGCTCCTGAGGGTAGGGCTGAGTTTCTGATGTGTT
CTCCAGCATGCAGTGTGGGAAGGAGCTGATGCTGAGACCTTAGTTGCCCACTGCCAGTCTGTTGGGAAGAGAA
TCTCTTCTTAAATAATGGCAACACCAAATGAACAATGTAGAGATTGTTAATATTAATGAATTTTCATGTCTGTCC
TGTTACCCGCCGGAGGCACCAGGCCATCGCCAGGTTCTTTCTGCTTTTGCCTTAAAGCAGCTGAGTCTTGGACAG
TTTCTGTAATAACCAAACAAGCCTGTTTCTTCGTGTGCTATTACTTAAGTACAAGTGATATTTAAAAATGATT
CCTGAGCCCTTTGAAAGAGTGGCTTGTTAGCTACAGAAATGATGGGACTGAAGTTAGGACATTAAGAAGAGCATT
GGCATACTGGCAAGAGATGGGGCTCTCGCAGCACCCCAATTAACCGGCCACTCAGCGGCCTGTGCGGAGCCTCCA
GGCTACTCTCCATAGTGTGAGTGCACACCTTGTGAGCTCTCCAGCCTGCAGCCTGTGTACCTGTGAGCCAGAGGG
ACTGAATTGGACACAGGCAAGGAATCACAACAAGATTTACAGGCAGCTGGTTATATATCTAAATTAGCTTTTCCA
TGAATCTCTGGGTCCAGACCATAGCCATAGGATTATAGAAAATTAAGAGCCAGATGGGAACTATCCTCTTGCTTTG
TTTTACAAGTGAGGAACTGAGGGCGAGAGTGGTTCACATCATTAGCCTCAGATCCTAGAGTTAAGTGGTTGCTGA
GCCAGGATGAGAACTCAGGCCTCCTGGCCACTGTTCTACTGACCTGCTGTTGAGGGCCTCAAGCACTGATGGGGC
TTTTCTGGCCCATATTTCTTGTGTTTTCCAAAACAAACCTCCCATGCAATGATGTTTAGATAAATCTCAACTAA
TCAGTAAAAACAAGCAAAGGACAAGTATATTTGCATCTATAGCTATTTAGGTAAACTGAAGTTAAATAAAAAAT
CAATTCCTTAGTTGCATTAGCCACATGTATCTAGTGGCCACCATATTGGACTGTGCAAATACAGAACATTTCTT
CATGGCACCGGGTTGGGTAGCACTGACGTGGATTATCCCAAGGATC

est24-RACE1:

TGCGTTTTCATGTTTTAGAAATTTTTTACAGTATTTTTACTTTTTAAAAATTTTTTATTTTATATATATTTTTGTGA
CAGAGTCTCGCTCTGTGCGCAGGCTGGAGTGTAGTGGCATGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCAGGTT
CAGGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGCACACGCCACCACACCAGCTAATTTTTG
TATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTTACCATCTTGGCCAGGATGATCTCGATCTCTTGACCTCGTGATCCACCTGCC
TCGGCTTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCACACCAGCCTATTTTTACTTTTTAAATGAGTTT
TCATTTTGAATGAAAAATGAGAAAATTCAAAATTTTTAAATGAAAACATTTGGTCTTTGCCAGTAACGAACATG
TGTACACCTTTGCATTTCATACAGTCCCCTAGAACCAGTAAGTCTTTCCCTGCAAAGCTGTCTGAACATTCAGG
GTCCACACATTTGACCACTGAAGGGTAGGAGGAAAGGCAAAGCAAGCTGCACAAAGGGAAAGATGGCCGTAGCCTT
GAAATGCACCTTTGCTAGCCCTCCCCATTTTGGTTATTATCAGCAAAGATCAGTGACATGTTAATATATTCGGCT
ATTTTACTGTGAATATAATGGTAAATTTTAAATAGAAATTTGAGTTAGATAGCAGTTTCTGAATCTGAAAGAAAGTG
ACATTGCTTGCGAATGCTCAGAGTAGCACTAACATTTGTGAAGTTCAACTCAATTTTTATTTGCTGTTTCACAGA
AAGCAATAATCCCTCATATTTTATAGTACCATCTGGGTTACAAAAATCCCAGTGCCTTTGTTGGACAAGCCAG

Anhang

GATCTCAGGAAGGAGTGGAGGGGAGCTTCATCTCAGTGGCTTCTGCCCTGAATTTGAATTTTTAACAGGCAGCTT
TTAAGCATCCTGTGGCACTCATCCCATCTCAGTGTAGCAGAGACAGTAATGTCTTTCCCTCTATGGTTGAGAAGG
AGCTTTTGAATGCCCTTTTGAAGCTGTAGAAATCTATGATACTCATCGTCAGCATTTCGACCATGAACTTAAACT
CCTATCACACCTCTAGGTGTGATAATATTTCTCCTTCTGTTACAACAGAGTAATGTCACACTTGGCACTTTTACT
GTCCTCTTGGCAGACTATCCTCCAAGTGTGTCTGAGAGTGTAACTGCTATTTGGCTCATTTTTCTGCACCAAG
GAGAACAGAAACACAGCAGGCACCAAGAGGAGGTTTAGTGTGCAGTGGGTTGTTCTGAAAGGCAGTGAGTAAAAAT
GAGGTATTCCTGACTTCTGCTTTTGTACATGAAGTCATGAGGTCTTGAAGCCAGACTTAGGTACCGTTTCTT
TCATCCCTTGCTAGTTCCATAATCGTAGACACAAACCTTCCACATCCATCCAGGCGGATGGCAGTGCTTCTTGTAG
AAAGCAATGTCACTAAGGCAGTGTCACTAAGGAAAACAGGACAAGGCAACAGTTGTGTTTCAAGTTTTACTGGC
GTCTGATTGGAATTAGAAGGAAGATTATTTTGGCATAACCTAGGTACCGTGACCCAAAGCTTTTGGCAGACCTT
GACGTACAAAACCGTACGCTTGCTGGAGAAGGGAAAAGGAGAGTTGCAGCCACTAAGAGAGTCAAGGCTGTGGCC
TGCCTGGTGGTGTTTTTATAGGAAGTGGCTCAGGGAGGCTGCATGTCTTTGTTTTCTGAGGCCTTGTTCACGTG
GCCTCCCACTTGAGGCCAGGAATATTGCAGCAATGCCGAAGAGTGGGTGGACAAAATAGCCTTATTATTAACCTAA
GTTGGAAACATGGCTTTTTGAGTGTCTTCATTACAGATGCAGTCACAAAATATTAATACTCTTTTTTTGAACAT
GACAAAACAAAGTATTCATTTAAACCTCCTTTGTCCACGTCCATGGTAAAAGAGCACCTCAGGCAGGGGAG

est26-RACE1:

GGCACGAGGCGGCACGAGGGTGTGAGTCAAGAGGCAACACTAGGAGGCAAGGAATCTGCATTTCTTTCAGACCTT
GGCAGAGAGCGCCCTGGGAAATGCGGATATAGAAGGTGAGGAGAACATCTCTCCTGGTTATACAGCATTCCAGGT
GGGCTTTCATGTGGTTGAGGATAATATCATTAGCACCAAAGGTGAAAATCCGTGGAAGCTCATCTTATTTACGCA
GAAGAGTAGGATGGGCCTCGTGGCACGAGTAAGCCAAAACAAAGGGAAAGGCATTACCATCAATTGACTCCTCATC
TGTTTTTAAGAGGGAAATCTGAGTTTTCAAGGAAAGCCGAATACAGTTGCCAAGTTGCCAGTCAAAGAAAACAAATG
TCAACACCTGCTCATAGAGATGGAATTCCTAACCCGGAATATTGCCCTTGAATTACAACGAGAAAAAGAACACTT
CTTATTCCCTGTAGCACCTCTTCAAGTGTAGTGGCAGACCACCTCAGGATGGAATGTATTTCTTTCATCCCCCTCT
CTACTTCCCTGTGACTCTTGCAAAATAAGGGAGAGACAAAAGAGAAGAGCAGAAGAACAGAAGAATGGAGTGGCAA
AGAGAAGAGAAGGAGTACTGAACATTGACAAGACTTTGGTTGGGGATGGTCAGAGAGGAGATTAGCTGTAGAC
GGCCACACTGCGGAGAAAGATCATTTTTCCCACTCCATCCCCCTTCCAGCTCCCCATCCATCTCCAAGAGCCAGC
TCCACCACTCAATAAAACCTTACATTCATCTTTC

est26-RACE2:

ATCAAACCTTAAGGGCTTTCTTCCCACTGAAGCATTAAAAAGTGAGAATTCTGATTTCTGGTTGACAATGTTTCA
ATGAATATGTCACCTTTATAATTACAAATGCAAGGGAGGAACCTTTTTATAACTGAATATTTAACACATATTTAAAGT
TCTAACACACGCCACATAATTTTTGTCTGAGATTGTCCATGAAGTGGGTATCTCAAATCATTCACTTGAAAACCTG
AAAATAATTTTTCTGAGATGAGTTCACTATGAAAACAGGGATATGACCAGCTGCCCTGTAGCTTTTCTTCCCTGC
ACTCCTGT
AAAAGGAGTAGATGGTAAATATTTCTGTAGAGGCAGGAGGTAGAAAATGGTTAAATTCAGTGTCTTTTCAGATTT
TCACTTTGCTTAATTCTAGAACACTTCTTATTCTGTAGCACCTCTTCAAGTGTAGTGGCAGACCACCTCAGGAT
GGAAATGTATTTCTTTCATCCCCCTCTCTACTTCCCTGTGACCTCCTGCAAATAAGGGAGAGACAAAAGAGAAGAGC
AGAAGAACAGAAGAATGGAGTGGCAAAGAGAAGAGAAGGAGTACTGAACATTGACAAGACTTTGGTTGGGGATG
GTCAGAGAGGAGATTAGCTGTAGACGGCCACACTGCGGAGAAAGATCATTTTTCCCACTCCATCCCCCTTCCAGC
TCCCCATCCATCTACCAAGAGCCAGCTCCACCACTCAATAAAACCTTACATTCATCTTTC

est26-RACE3:

CTAGAATTCAGCGGCCGCTGAATTTCTAGAACGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGNTTTTTTTTAGGAGAAACAC
TTTTGGGAATAATTTTATTGAATAACAACCACCCTCAATTACACTAAGCTTCAGAAAATTGTTGGATTGTTTAA
TTTTGCTGTGTACCTATAATTGTTTAGAAAAGTTTCTTTTGGCTTAAACTGACCATTTCCCCCTTCTTTTTTGAG
TTTTCCATGATTAACCTTGCCCAAATAAAAACATAACAATCCATATGCAAAGCATATCTGCCACCACCTCCCACT
GCTTCCCTGGGCCGCAAACAGAAAAATAAACAGTGAATAAAAAAAATGCCAAAGTGAAGGTTTCTCTTCTTCTA
TCACAACATAGTTGGGTAGTTCCCTTAAAGTACATCATTGCTATAAGTTGGTATCACTGCAAATCTCAAGTCCCA
AATAATCTCTTTTTCTGGATAGAAAAGTTATTCAAAGGGAGCACAAAAGAGCAAGCTTTGGGGCATACTGACAAA
CACTTCATTGGTTAGAAGAGAATAATTGTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ACAGGTTAAATAGCTACCAGAAACACAGAAGAGGTGGTTAATAAAAAACTGAGATTGCTTTCAGAGGACACAGGAGG
GTTGATGAGACCTAGAATTCAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCTTAATTCTAGAACACTTCTT
ATTCCTGTAGCACCTCTTCAAGTGTAGTGGCAGACCACCTCAGGATGGAAATGTATTTCTTTCATCCCCCTCTCTA
CTTCCCTGTGACCTCCTGCAAATAAGGGAGAGACAAAAGAGAAGAGCAGAAGAACAGAAGAATGGAGTGGCAAAGA
GAAGAGAAGGAGTACTGAACATTGACAAGACTTTGGTTGGGGATGGTCAGAGAGGAGATTAGCTGTAGACGGC
CACACTGCGGAGAAAGATCATTTTTCCCACTCCATCCCCCTTCCAGCTCCCCATCCATCTACCAAGAGCCAGCTC
CACCCTCAATAAAACCTTACATTCATCTTTC

Anhang

est26-RACE4:

TGTGTGTGACATCAAACCTTAAGGGCTTTCTTCCCCTGAAGCATTAAAAAGTGAGAATTCTGATTTCTGGTTGA
CAATGTTTTCAATGAATATGTCACCTTTATAATTACAAATGCAAGGGAGGAACTTTTTATAACTGAATATTTAACAC
ATATTAAAGTTCTAACACACGCCACATAATTTTTGTCTGAGATTGTCCATGAAGTGGGTATCTCAAATCATTAC
TTGAAAACGAAAATAATTTCTGAGATGAGTTCATATGAAAACAGGGATATGACCAGCTGCCCTGTAGCTTTT
CCTTCCCTGCCTCCTGT
AATAAAGATCAAAGGAGTAGATGGTAAATATTTCTGTAGAGGCAGGAGGTAGAGAATGGTTAAATTCCTTATAGGCA
TTTTAGATTTTTCACTTTGTTTAAATTTCTAGAACACTTCTTATTCCTGTAGCACCTCTCAAGTGAATGGCAGACC
ACCTCAGGATGGAAATGTATTTCTTTCATCCCCCTCTCTACTTCCCTGTGACCTCTGCAAAATAAGGGAGAGACAA
AGAGAAGAGCAGAAGAACAGAAGAATGGAGTGGCAAAGAGAAGAGAAGGAGTACTGAACATTTGACAAGACTTTG
GTTGGGGATGGTTCAGAGAGGAGATTAGCTGCTAGACGGCCACACTGCGGAGAAAAGATCATTTCCTTCCCTCCATCC
CCCTTCCAGCTCCCCATCCATCTCACCAAGAGCCAGCTCCACCCTCAATAAAAACCTTACATTCATCTTTTC

est29-RACE1:

TGAAGACTGATTCCTTTTTCTTCCCCTCACCTTTCTGCATGATGATTGAGAAGTTCATGAAGTTCATGTTCTTCT
CTGTGAAGTAGGGTCAGACCTTTCCATTCTGGGATGGGGGGGAAGCAAAGGCAGTATCTCCAGTGTTCTTCT
GAAAAGCCCTTCTCTACACCAGATTTTGAATTTCTTATGGGAAGAGAATCAGCCACACGATATGAAGGCTGGTTC
TGACATAATGGGAATCACAACCCCTTGCAGAAACCCAGCCGTTAAGGAAAACGATTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCT
TTTTTTTTTTTTTTGAGATGGAGTCTCACACTGTACCCAGGCTGAAGTGCAGTGGCGCGATCCCCGGCTCACTGCA
ACCTCTGCCTCCTGGGTTCAAGTGATTCTTTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCGCCCGCCACC
ATGCCCTGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAAAGATGGGGTTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCTG
ACCTCATGATCCACCTGCCTTGGCTTCCCAAAGTGTAGGATTACAGGTGTGAGCCACCGCACCCAGCCTTTTTT
TTTTTTTTTTGGGAGATGGAATCTTGTCTGTTGCCAGGCTAGAGTGCAGTGGTGGCAGTCTTTGGCTCACTGCAACC
TCCACTCTGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGTCTTCTGAGTAGCTGAGATTACAGGCCCCACCTGGCTA
ATTGTTTTTGAATTTTTAATAGAGATGGGGTTTTACCATATTGGCCAGGCTAGTCTCGAATCCTGACCTCAAGTG
GTGAGTCCACCTTGGCCTTCCAAAGTCTGGGATTACAGGCGTGAGTCACTGCACCTGGCCAAGGACACGATTTT
GATGGTATGAATATGGAGCAGAGAGGTCTGTAGACCTGGCAGCCTTGTGTGGCCTCATAAGGTGCTCAGGCCGCA
GAATGCCTGGAGGATGTAGATGGAGAGAGTCTTGGGAAATGACCTAGACAAGGAATGGTGATTTTTTGCCTTA
TGTGGTGGTGTAGGGTTAAGACAAGGGGTTTTGGGGTATGGGTATCTGTAGCATCTATGTGGTGCCAGCTGCAG
GGTGTGTCTGGTATTTTTGGTGGTAAATAAAAAGGCACTTCTTATTCTGATGTAGCTGATAGGGTCTTTGGA
GTGCTAAGAGATCAGAGTCTCCACAGAATGTGACAGTTTTGCTCCAGTCTGCAAGTACTGATGCCCCTAGATC
AGACAGCAGATTTCTGTTTGGAAAGCCTAAAGCCTCGGTGTGTGAAATCCATTGTTGAGGAATATCTCCACGAGC
GGCCAGGGGAATATTTGGCACCTACTGTAGCTGAGAGTGTGATATTGACTGTGGAGAAGCTCTTGGGCTGTGAA
TGTGACCTCCAAAATGCAGACTCTTGCCCTCCTACACAGCACTTTGCATTAGGGTGAACCAGGGAACTTTGCT
GGAGGCAGGGGGCCTTTGGCAATATCAAAGATGACTGTTGTTGCTGAGATTCTTGGGAAAGGAAAAGTAGTCT
GTGGCTGAAAGCTGGCAAAATCTTTGGAGAAGAGGGCCAGCCACACAGATACTACAAATGTTTCTGTACAAATTA
ATTTGGTACTTTGTAATTAGCACTTTTTCTTATCAATGTCCAAGAAAGTCTGATTAACTTTATAGGCAGACTTTC
AGTTGGGCCAACAGTTTTAAATCTGCCTGTTGTAAAAAGTGACCAAAATTTGGACTTTTGTCACTCAGAAGCCAC
GTGATTGGCCACACTTTTTATCTTGCCTCTCTCAGTCTCGTTTTTTCAGGTCTCCTAAGGATGTGCTACTTTTTGT
TCCAGATTTGTTTCCAGATGCCTGCTCAAGTAATAATCGTGACAGCCCCAGAAGCCAGAAAACATTTTCCAGTGT
CAACCAACTAAATCTTGCCTTGCCTGCTTCTTGTGTTTGTGTTCTTTTTTAATTTCTGATTTACTAAACTT
TAAGGGATGTGCTTCTGTGGTTACATTTTTCTGAATTTTATAGATTTATTTACTGTTGATTTGATTTAGGATATA
CCATTGGGCCAGCCATCAGGCTAAGGAGTTTTATTTTTATCAATAATTCTCAGAAAAAATTTCTTCAATAATTTGTT
GTCATTTCCATCTCACAAATGAGGATATTGAGGTTCTAAAAGGTGGTGGTACTGAAAACCTGAAAATGTACCTCT
GTTTCTCATTTCCAAAATCTGAGGTTGCACCTGTGTTTCTCATTTCCCAAAGCCTGAGGATGCACCTCTGTTCCCTC
GTCTCCAAAGCCCGAGGTTCCACTTCTGTTCTCATCTCCAAAGCCTGAGGTTGCACCTCTGTTTCTCGTCTCCA
AAGCCTGAGGTTGCCTGCAAGTCTCTTGAGGATTTTTTGGTGTAAACAGGTTGAGTTTCTGGATAGGTGGGCATA
TTGGCAGCTGAATATGTGGGTTTTGAGTGTGAAATACAGGTTCTTAGCTATGACCAGCAATCTTCTACTTGTTC
TGTGCTCTTCCACATAAATTTGCTTTTTCTTGATTGTATTTCATAGAGCAATTTCTGAGGCTGGAAGGCAGGAGCA
TTGTAAGAGACATGTGAGTGGATGGGGACACCCAAGCAGTGTCAAGATCTCTTAATGCCTGAGGCAGATTTCTCAC
TTACTGCCAAGATAAAGAAGCAATTAACATTTGACTGCTAAGGTGGACACTTATTCTTCAATTTATGATAACGGTAT
ATTTTTATGAAGAGGTTTCTTGGAGGATTTCAATTAGACACCTGGCATTTTTCCCCATTAACTTCCAACCTAAAAA
TTTTTGCATATGACTTAGACGAATGCTTGGCCTTCTCAGGTGGCGCTACGCCCTTCTTGTGAAATGAAAATGGT
CTCAGGTGGCATTTTTGTCCCCACAGCCACCTCAGTTGATGACCTTATGCAGTATCCTTTTCTACAGTAACATCCG
TTTTTACTCCCTCCTTAAAGTAGGCTCGTAAGTAGGCAATAGAATAAATGAGCCTCTATGCAGGATATCAGT
GGAGTTTCAATGATGGACAGCTGTGGCCAGCTGACATGTGGTACCTGGTCCATTTCAAGGATCATTTACACTTTCA
GCCACTCCACAGCTTTGTGCTCAAGTGCATAAACAATTTGATGGGATTTCTGTGTTTTCAGCAAAATCATAAATTTCT
GTCTACTTCTAGATAACCAATGTAAGGAAGGGATAATAGAAAAGTTAGAGTAGAATTCATGCATGGGTGGCCT
AACCAACAACACTTTCATACTGAACATTAGCTTGTGCAATGCTTTACTCTTTGGCAGGACACAAGCGCCATAA
CCTTAAGAGGATGTGATTTGAGTGGAGTTTTCATGCCCTGTGCTTATTGTATTCTTGCTACTGATGCAACAT
ATCTATAATTACATTTTCAAGTACTGAAAATTTGCAGGCTTTGTGGAAACAAAAATACAGCCAAAAGAAATGGAAATGT

Anhang

ATATTCACTCCACCCTCATTATAAGGCTTTCAGAAATCAGACTGTAAGGCCCAATACCATGGCTCTCAACTACGT
GATACTAACTCCATTCTCTGATGTTTTGAACACTTTGTCAAAATGCTGGGTTTCCAATGATGATCGTATAAATTGA
GGAAATGCTATTACCCTTTTAGCGCTTTCATTTGCTCCATTGTTGACTCAATCACAGTGGCACCTCCTCACACAA
GTCCTCTATTTCCACCCTGTGAAACAAACACAATTTGATTTAGATCGAAGCATGATAGGCCAAAGTTGAGAAAGTT
GGTTGAGGTGCATGCCTTCTTGGGGCAGGTGCGATTGCATCCCTGGGACATTATATGTCTTTACATCTCCAGCT
CCATATAGGGCTTAGCC

PAC-Konversionstabelle:

Laborname	PAC-Name
PL01	121O4
PL02	123I2
PL03	208K22
PL04	204F19
PL05	271G17
PL06	436I18
PL07	464L6
PL08	462G23
PL09	18A9
PL10	35E13
PL11	112A13
PL12	112G7
PL13	223O8
PL14	323N1
PL15	329O5
PL16	329N6
PL17	411E23
PL18	410L23
PL19	455I10
PL20	520A18
PL21	464D9
PL22	288D14
PL23	287O21
PL24	398O8
PL25	9E18
PL26	186E20
PL27	209B18
PL28	210A13
PL29	315H22
PL30	30G5
PL31	33E13
PL32	70P15
PL33	67I19
PL34	66J20
PL35	150P18
PL36	224E11
PL37	253D9
PL38	466L13
PL39	466N15

Laborname	PAC-Name
PL40	132B6
PL41	135H22
PL42	130K15
PL43	249K20
PL44	355N24
PL45	270E6
PL46	414F10
PL47	439P12
PL48	138M9
PL49	203M21
PL50	301G17
PL51	329M5
PL52	414O17
PL53	499M20
PL54	307K13
PL55	309N6
PL56	341J24
PL57	65E12
PL58	21H12
PL59	18E7
PL60	18C4
PL61	106G1
PL62	79O16
PL63	135H22
PL64	118D1
PL65	99P9
PL66	127D12
PL67	103E14
PL68	91J16
PL69	205H4
PL70	186M15
PL71	204M5
PL72	148E11
PL73	182E22
PL74	187A16
PL75	199F18
PL76	163L22
PL77	163I21
PL78	180D5

Anhang

Laborname	PAC-Name
PL79	150F20
PL80	168I18
PL81	251M9
PL82	254P11
PL83	219O17
PL84	255F6
PL85	225F6
PL86	240H17
PL87	240P15
PL88	224A2
PL89	218G20
PL90	274F15
PL91	294H22
PL92=PL99	314O10
PL93=PL96	302B23
PL94	317B24
PL95=PL98	315C16
PL96	302B23
PL97	317C24
PL98	315C16
PL99	314O10
PL100	1135P13
PL101	1090I10
PL102	1117B15
PL103	1105M19
PL104	1158H17
PL105	1158I18
PL106	1158G18
PL107	536C17
PL108	558H19
PL109	553M8
PL110	557G8
PL111	533I18
PL112	532L11
PL113	552A12
PL114	628P13
PL115	616I11
PL116	581I4
PL117	668H11
PL118	685G24
PL119	693C9
PL120	745O4
PL121	750B10
PL122	741C20
PL123	786J15
PL124	786N17
PL125	763A15

Laborname	PAC-Name
PL126	814N18
PL127	814P17
PL128	793G5
PL129	863I12
PL130	798N13
PL131	814K18
PL132	821J23
PL133	932O3
PL134	933E2
PL135	978G6
PL136	975P8
PL137	996K16
PL138	1003N4
PL139	1022N8
PL140	1022K23
PL141	42G1
PL142	839I12
PL143	1071I7
PL144	316P16
PL145	313M15
PL146	290I9
PL147	296F24
PL148	306G20
PL149	1184P24
PL150	742O5
PL151	788O3
PL152	760H2
PL153	754A16
PL154	754A5
PL155	763K16
PL156	780I11
PL157	762A21
PL158	789M11
PL159	735E24
PL160	749D16
PL161	676N2
PL162	668M17
PL163	670H9
PL164	712G16
PL165	710F10
PL166	686C6
PL167	680B15
PL168	696N22
PL169	654D14
PL170	667C10
PL171	660B20
PL172	659D7

Anhang

Laborname	PAC-Name
PL173	1070N23
PL174	1076J22
PL175	1078E17
PL176	1054D21
PL177	1024D8
PL178	1051H14
PL179	1056D10
PL180	1055F20
PL181	1079F11
PL182	1072A6
PL183	1011F5
PL184	1054C20
PL185	980P1
PL186	986O20
PL187	986M19
PL188	940H19
PL189	976H8
PL190	964H6
PL191	997J19
PL192	978J23
PL193	985G16
PL194	941C1
PL195	880D24
PL196	928D21
PL197	908C23
PL198	902C12
PL199	883O4
PL200	871D15
PL201	901C24
PL202	918B9
PL203	933L18
PL204	911J15
PL205	929I2
PL206	935G3
PL207	885D22
PL208	903D17
PL209	1096P18
PL210	1096P16
PL211	1138M7
PL212	1114A23
PL213	1117P16
PL214	1117P15
PL215	1131N20
PL216	1103L24
PL217	1137L3
PL218	188I21
PL219	145I3

Laborname	PAC-Name
PL220	187E10
PL221	187B2
PL222	189N10
PL223	189J7
PL224	25K1
PL225	818O4
PL226	830I1
PL227	848G1
PL228	808A3
PL229	841P3
PL230	847E22
PL231	847C22
PL232	837N7
PL234 = PL233	807M21
PL235	833J23
PL236	797I11
PL237	797I11
PL238	849C7
PL239	620P24
PL240	604I11
PL241	626H12
PL242	578B3
PL243	596B1
PL244	589L23
PL245	589F23
PL246	627O6
PL247	587K2
PL248	593K2
PL249	593F23
PL250	548N19
PL251	570J20
PL252	552H19
PL253	576A20
PL254	537J15
PL255	569E14
PL256	18P5
PL257	149N19
PL258	952F10
PL259	979C19
PL260	941H2
PL261	763K15
PL262	767H12
PL263	765I21
PL264	109G7
PL265	123A11
PL266	1038P19
PL267	1163H24

Anhang

Labornamen	PAC-Name
PL268	833C14
PL269	630K12
PL270	615J18
PL271	600J18
PL272	600H19
PL273	554M22
PL274	531B2
PL275	898N3
PL276	910G21
PL277	1120F11
PL278	1134C15

Die PAC-Klone wurden der Übersichtlichkeit halber als Labornamen durchnummeriert. Der wirkliche Name des jeweiligen PAC-Klons stammt aus den PAC-Bibliotheken RPC11-3,5. Diese Bezeichnungen sind eindeutig und können als Suchbegriff in öffentlichen Datenbanken eingegeben werden.

Die vorliegende Dissertation entstand in der Abteilung für Medizinische Genetik der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. v. Hauner'schen Kinderspital, Klinikum Innenstadt der LMU München in der Zeit von April 1995 bis Dezember 2000.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Jan Murken möchte ich mich herzlich für die Schaffung sehr guter Arbeitsbedingungen und die Unterstützung jeglicher Art bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Meitinger danke ich sehr für die wissenschaftlichen Anregungen, das stete Interesse am Fortgang und Gelingen dieser Arbeit und die Hilfestellung bei Vorträgen und Veröffentlichungen.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Simone Schuffenhauer für die hervorragende Betreuung und für die Unterstützung in der Endphase der Arbeit, insbesondere für die intensive Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey danke ich für seine Bereitschaft, meine Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München zu vertreten.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Tim-Matthias Strom für die Bereitstellung der Computer-Infrastruktur, ohne die diese Arbeit nur schwerlich machbar gewesen wäre.

Frau Dr. Hilde van Esch und Herrn Dr. Peter Groenen, Universität Leuven, danke ich für die Zusammenarbeit auf dem HDR-Syndrom-Projekt.

Herrn Prof. Dr. Michel Vekemans und Frau Dr. Tania Attié-Bitache, Hôpital Necker Paris, danke ich für die Zusammenarbeit auf dem RNA-In-Situ-Hybridisierungsprojekt.

Besonders großen Dank schulde ich meinen Laborkollegen Frau Dr. Bettina Lorenz-Depiereux, Frau Dr. Konstanze Hörtnagel, Herrn Dr. Klaus Herrmann, Frau Dr. Lena Grimm und Frau Dr. Popak Peykar-Derakhshandeh für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und das daraus resultierende sehr gute Arbeitsklima. Das gleiche gilt für Herrn Dr. Alfons Meindl, dem ich für wissenschaftliche Anregungen danke.

Meinen Kolleginnen Heide Hellebrand und vor allem Helene Achatz möchte ich für ihren Rat und ihre Unterstützung bei allen labortechnischen Dingen ganz herzlich danken.

Zum Schluß danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung beim Studium bis hin zur Anfertigung dieser Dissertation.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Peter Lichtner
Geburtsdatum: 30. September 1967
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig

Institutsanschrift

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Institut für Humangenetik
Ingolstädter Landstr. 1
85764 Neuherberg
Tel.: 089 3187 3546
E-mail: lichtner@gsf.de

Schulbildung

1974-1975 Polytechnische Oberschule I Seelow
1975-1978 Volksschule Neuried
1978-1985 Gymnasium Fürstenried-West München
1985-1987 Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg
Abschluß: Abitur

Studium

1987-1994
Universität: Ludwig-Maximilians-Universität München
Studiengang: Chemie
Wahlpflichtfach: Biochemie
Thema der Diplomarbeit: Untersuchung eines potentiellen Replikationsstartpunktes im Maus-Genom.
Abschluß: Diplom-Chemiker-Univ.
Abschlußnote: sehr gut

Berufstätigkeit

04/1995-04/2001
Tätigkeit: Abteilung für Medizinische Genetik der Kinderklinik,
Ludwig-Maximilians-Universität München
wissenschaftlicher Angestellter (Ziel: Promotion)
05/2001-lfd.
Tätigkeit: GSF, Institut für Humangenetik, Neuherberg
wissenschaftlicher Angestellter

München, den 17. August 2001

