

# Molekular- und Zellbiologie

Aktuelle Themen

Herausgegeben von  
N. Blin, M.F. Trendelenburg und E.R. Schmidt

Mit 52 Abbildungen

Springer-Verlag  
Berlin Heidelberg New York Tokyo 1985

# Inhaltsverzeichnis

Funktionsanalyse zellulärer Strukturproteine durch Mikroinjektion B.M. Jockusch und A. Füchtbauer (Mit 3 Abbildungen).	1
Methoden zur Charakterisierung von membranständigen Rezeptoren: Biochemische Charakterisierung und Rein- darstellung des Acetyl-LDL-Rezeptors von Makrophagen H.A. Dresel, D.P. Via und G. Schettler (Mit 2 Abbildungen).....	13
Isolation und Charakterisierung differenzierungs- spezifischer Antigene der Milchdrüse E.-D. Jarasch, G. Bruder und H. Heid (Mit 5 Abbildungen).....	22
Sequenzieren von DNA E.R. Schmidt (Mit 5 Abbildungen).....	35
Mathematische und informationstheoretische Hilfs- mittel zur DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse S. Suhai (Mit 5 Abbildungen).....	52
Vektor-Wirt Systeme zur DNA-Klonierung in <i>E. coli</i> W. Lindenmaier (Mit 3 Abbildungen).....	65
Zelloberflächenproteine - Klonierung ihrer Gene durch DNA vermittelten Gentransfer und fluoreszenz- aktivierte Zellsortierung R.K. Ball und B. Groner (Mit 2 Abbildungen).....	86
Linkshelikale Z-DNA: "DNA-Supercoiling" und Bindung von Anti-Z-DNA Antikörpern A. Nordheim (Mit 6 Abbildungen).....	93
Mikroklonierung von Chromosomenabschnitten H. Jäckle, V. Pirrotta und J.E. Edström (Mit 5 Abbildungen).....	110
Molekular- und Cytogenetik sortierter Methaphasen- chromosomen N. Blin (Mit 4 Abbildungen).....	123
Chromosomenspezifische DNA-Bibliotheken in der Humangenetik T. Cremer und C. Cremer (Mit 3 Abbildungen).....	132

Gen-Injektion und Transkript-Analyse in der Xenopus-Oocyte A. Hofmann, A. Laier und M.F. Trendelenburg (Mit 5 Abbildungen).....	144
Gentransfer in eukaryotische Zellen H. Hauser.....	159
SV40 als Modellsystem zum Studium eukaryontischer Genregulation K. Chowdhury, H. Schöler und P. Gruss (Mit 4 Abbildungen).....	177
Hormonal gesteuerte Transkription - Definition der regulatorischen Sequenzen im Genom des Maus-Mamma- tumorvirus B. Groner (Mit 1 Abbildung).....	189
Sachverzeichnis.....	197

# Chromosomenspezifische DNA - Bibliotheken in der Humangenetik

T. Cremer<sup>1</sup> und C. Cremer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut für Anthropologie und Humangenetik, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 328, D-6900 Heidelberg  
<sup>2</sup> Institut für Angewandte Physik I, Universität Heidelberg, Albert-Überle-Straße 3-5, D-6900 Heidelberg

Unter einer DNA-Bibliothek des menschlichen Genoms, wie sie zuerst in der Arbeitsgruppe von Maniatis erstellt wurde (Lawn et al. 1978), versteht man zunächst nichts weiter als eine Suspension von Vektoren (Phagen, Plasmide), die unterschiedliche menschliche DNA-Sequenzen enthalten. Dabei sollte in einer vollständigen Bibliothek jede im Genom vorkommende Sequenz wenigstens einmal enthalten sein. In diesem Zustand können die Möglichkeiten einer DNA-Bibliothek aber nur zum Teil ausgeschöpft werden. Einen weitreichenden Nutzen für die humangenetische Forschung und ihre klinische Anwendung kann eine menschliche DNA-Bibliothek erst entfalten, wenn die verschiedenen DNA-Sequenzen isoliert vorliegen und chromosomal lokalisiert sind. Aus diesem Grund ist es wünschenswert, von vorneherein DNA-Bibliotheken herzustellen, die nur Subfraktionen des Genoms enthalten, die einzelnen Chromosomen oder Chromosomenabschnitten entsprechen.

In diesem Kapitel sollen einige ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten chromosomenspezifischer DNA-Bibliotheken und Strategien zu ihrer Herstellung skizziert werden. Zur Vertiefung möchten wir den Leser auf die angegebene Literatur und die Kapitel der Herren Lindenmaier (S. 65 ff.), Jäckle et al. (S. 110 ff.) und Blin (S. 123 ff.) des Buches verweisen.

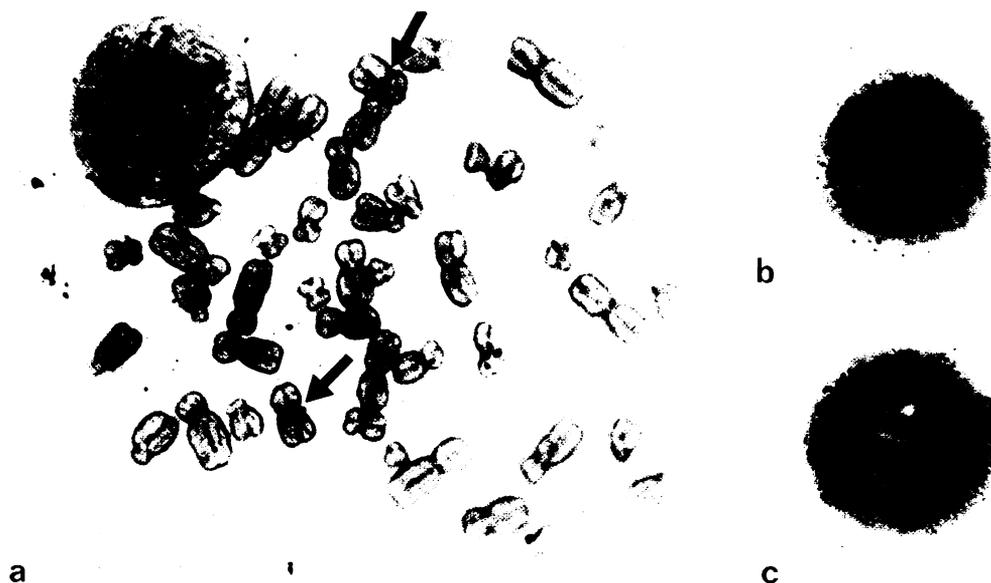
## 1. Perspektiven einer Anwendung chromosomenspezifischer DNA-Bibliotheken in der Humangenetik

### 1.1 Molekulare Cytogenetik

#### a) Analyse von Chromosomenaberrationen

Die Diagnostik von Chromosomenveränderungen mit Hilfe von Bänderungstechniken hat mit der Entwicklung des "high resolution banding" einen gewissen methodischen Abschluß gefunden. Selbst bei einer hochauflösenden Chromosomenbänderung mit 1000 Banden (Yunis und Lewandowski 1983) enthält eine einzelne Bande noch immer einen DNA-Faden von durchschnittlich 1000 µm Länge mit etwa 3 Millionen Basenpaaren, entsprechend etwa 50 Genen. Schon diese sehr grobe Schätzung zeigt, daß selbst mit den besten Bänderungsverfahren eine Festlegung chromosomaler Bruchpunkte auf dem Niveau einzelner Gene nicht möglich ist.

An einem Beispiel aus der Tumorcytogenetik soll zunächst erläutert werden, wie mit Hilfe klonierter DNA Proben eine molekulare Bruchpunktanalyse durchgeführt werden kann und welche Bedeutung derartige Analysen für das kausale Verständnis der Tumorentstehung haben (Mitelman 1984). Im Weiteren sollen dann einige generelle Aspekte der Verwendung chromosomenspezifischer Genbibliotheken bei der Analyse von Chromosomenveränderungen dargestellt werden.



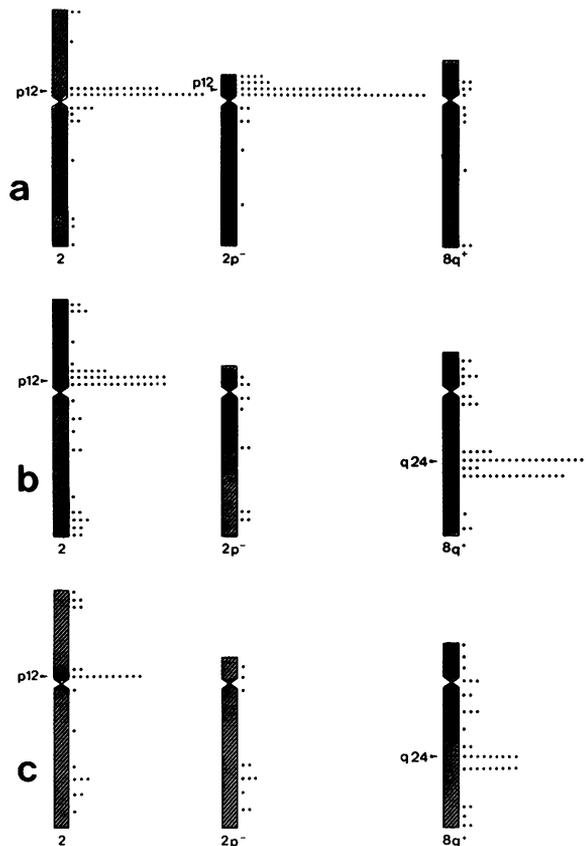
**Abb. 1a-c.** Autoradiogramme weiblicher, menschlicher Lymphozyten nach in situ Hybridisierung mit der DNA-Probe pXBR. Die Probe wurde mit  $(3H)dTTP$  radioaktiv markiert und hybridisiert an repetitive DNA in der Zentromerregion menschlicher X-Chromosomen. Die Abbildung ist aus Rappold et al. (1984a) entnommen. a) Metaphaseplatte und Interphasekern (links oben); b) und c) weitere Interphasekerne; Giemsa-Färbung. Anhäufungen von Silberkörnern über den Zentromerregionen der X-Chromosomen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Man beachte, daß die Position dieser Zentromere mit Hilfe dieser Methode auch in Interphasekernen sichtbar gemacht werden kann. Chromosomenspezifische, repetitive DNA Proben eröffnen so eine neue Möglichkeit, um die Frage einer zufälligen oder nicht-zufälligen Anordnung bestimmter Chromosomen im Zellkern zu prüfen. Zum Problem der Chromosomentopographie in menschlichen Zellkernen siehe Rappold et al. (1984a). Im Gegensatz zu der in dieser Abbildung demonstrierten in situ Hybridisierung mit chromosomenspezifischen repetitiven DNA-Proben, entstehen nach in situ Hybridisierung mit singulären DNA Proben nur einzelne Silberkörnchen an einem Ort spezifischer Hybridisierung der radioaktiven Proben-DNA mit einer komplementären DNA Sequenz. In diesem Fall übertrifft die Zahl unspezifischer Silberkörnchen ("Hintergrund") pro Metaphase die Zahl spezifischer Silberkörnchen um ein Mehrfaches. Auch in diesen Fällen ist jedoch eine Aussage möglich, wenn die Position aller Silberkörnchen in zahlreichen Metaphasen bestimmt und eine statistisch signifikante Häufung von Silberkörnchen über bestimmten Chromosomenregionen ermittelt wird (vgl. Abb. 2)

Das Burkitt Lymphom ist ein bösartiger Tumor, der von B-Zellen des lymphatischen Gewebes seinen Ausgang nimmt. Bei etwa 75% der Patienten findet sich in den Tumorzellen eine Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 14 (t 8;14), bei den übrigen 25% eine "variante" Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 22 (t 8;22) bzw. 2 und 8 (t 2;8). Mit den klassischen Bänderungsmethoden konnten die Bruchpunkte den Banden 2p12 (d.h. Bande 12 auf dem kurzen Arm von Chromosom 2), 8q24 (Bande 24 auf dem langen Arm von Chromosom 8), 14q32 und 22q11 zugeordnet werden. Mit Hilfe von Mensch-Maus Hybridzellen, die nur noch bestimmte menschliche Chromosomen enthalten, und der *in situ* Hybridisierungstechnik an menschlichen Metaphasechromosomen (siehe unten) konnten in den genannten Banden der Chromosomen 2, 14 und 22 Immunglobulingene lokalisiert werden und zwar das Gencluster Igk für die leichte Kette kappa in 2p12, das Gencluster für die schwere Kette in IgH in 14q32 und

Abb. 2a-c. Schematisch dargestellt sind das normale Chromosom 2 und die beiden Markerchromosomen 2p- und 8q+ der Burkittlymphom-Zelllinie BL21. Die Lage des Zentromers ist durch eine Einschnürung kenntlich gemacht. Der kurze Arm von Chromosom 2 fehlt bei 2p- und ist auf den langen Arm von Chromosom 8 transloziert, das dementsprechend verlängert ist (8q+).

In situ Hybridisierungsexperimente wurden mit drei klonierten DNA-Proben aus dem Gencluster für die leichte Immunglobulinkette kappa durchgeführt. a) mit einer Probe für die variablen Gene von kappa,  $V_k$ ; b) mit einer Probe für die Verbindungsregion ("joining region"),  $J_k$ ; c) mit einer Probe des Gens für den konstanten Teil von kappa,  $C_k$ . Die Proben wurden mit ( $^3\text{H}$ )dTTP radioaktiv markiert. Für die detaillierte Beschreibung der Proben und der damit durchgeführten Experimente siehe Rappold et al. (1984b). Jeder der rechts neben 2, 2p- und 8q+ eingezeichneten Punkte gibt die chromosomale Lokalisation eines Silberkorns an. Dazu wurden Autoradiogramme a) von 35 Metaphasen, b) von 87 Metaphasen und c) von 118 Metaphasen ausgewertet und die Position aller auf einem der drei Chromosomen sichtbaren Silberkörnchen festgestellt.

Die Pfeile kennzeichnen Chromosomensegmente mit einer statistisch signifikanten Häufung von Silberkörnchen als Ausdruck einer spezifischen Bindung einer radioaktiven Probe. Die übrigen Silberkörnchen sind als "Hintergrund" zufällig über die Chromosomen verteilt. Aus der Verteilung der Silberkörnchen läßt sich entnehmen, daß  $V_k$ ,  $J_k$  und  $C_k$  spezifisch im Bereich der Bande 2p12 des normalen Chromosoms 2 binden. Dagegen bindet am kurzen Arm des Markerchromosoms 2p- nur die Probe  $V_k$ .  $J_k$  und  $C_k$  zeigen dort keine Bindung, binden aber spezifisch am langen Arm des Markerchromosoms 8q+. Der Bruchpunkt in der Bande 2p12 muß demnach im Bereich zwischen  $V_k$  und  $J_k$  liegen. Man beachte, daß als Ergebnis dieser Experimente auch die Orientierung der Gene im kappa-Gencluster festgelegt werden konnte.  $V_k$  ist zum Zentromer hin orientiert,  $C_k$  zum Telomer



das Gencluster für die leichte Kette lambda  $Ig\lambda$  in 22q11, während in 8q24 das Onkogen c-myc lokalisiert werden konnte. Eine ausführliche Literaturübersicht findet sich bei Rappold et al. (1984b). Auf Grund dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, daß als Folge der genannten Translokationen c-myc in die Nachbarschaft von Immunglobulinen gerät. Diese abnorme Nachbarschaft wurde dafür verantwortlich gemacht, daß das c-myc Gen in den Tumorzellen im Gegensatz zu normalen B-Lymphozyten nicht inaktiviert wird. Daß diese Nachbarschaftshypothese zutrifft, konnte durch molekulare Bruchpunktanalysen entschieden werden.

Für diese Analyse bietet sich die Methode der in situ Hybridisierung klonierter DNA-Proben an Metaphasepräparaten an. Sie hat sich in jüngster Zeit als ein hervorragend geeignetes Verfahren für die Zuordnung

singulärer DNA-Sequenzen zu einzelnen Chromosomenbänden erwiesen (Zabel et al. 1983). Auf einem Objektträger fixierte Metaphase- oder Prometaphasechromosomen werden denaturiert. Die dadurch einzelsträngig gemachte DNA der Chromosomen wird mit einer radioaktiv markierten, ebenfalls einzelsträngigen DNA-Probe hybridisiert. Überschüssige radioaktive Probe wird durch sorgfältiges Waschen der Objektträger entfernt, die anschließend mit einer Filmemulsion bedeckt und im Dunkeln für Tage oder auch Wochen exponiert werden. Die Orte spezifischer Hybridisierung werden nach der Entwicklung der Autoradiogramme durch die dort entstehende Anhäufung von Silberkörnern sichtbar gemacht (Abb. 1).

Abb. 2 zeigt das Ergebnis einer Bruchpunktanalyse bei Tumorzellen eines Patienten mit der varianten Translokation  $t(2;8)$  (Rappold et al. 1984b). Die in situ Hybridisierung zeigt, daß die für den variablen Teil der Kappa-Kette kodierenden Gene  $V_k$  auf dem Markerchromosom 2p- verblieben sind, während die Gene für die "joining region"  $J_k$  und den konstanten Anteil der Kappa-Kette  $C_k$  offenbar auf das Markerchromosom 8q+ transloziert worden sind. Nach diesem Resultat muß der Bruchpunkt in der Bande 2p12 innerhalb des Kappa-Genclusters liegen. Das Onkogen c-myc konnte auf 8q+ lokalisiert werden (nicht dargestellt in Abb. 2). Der Bruchpunkt in der Bande 8q24 liegt demnach distal von c-myc. Es ist heute möglich, bei Bedarf Bruchpunkte auf dem DNA-Niveau bis auf die Base genau festzulegen (Piccoli et al. 1984).

Mit Hilfe molekularer Bruchpunktanalysen konnte gezeigt werden, daß die exakte Lage der Bruchpunkte in den Tumorzellen verschiedener Patienten variiert. Doch stimmen alle bislang untersuchten Fälle darin überein, daß als Folge der Translokation das c-myc Gen in die Nachbarschaft eines Immunglobulins gerät, und zwar immer auf die 5'-Seite des für den konstanten Teil der jeweiligen Immunglobulinkette codierenden Gens. Da somatische Mutationen in den variablen Abschnitten der Immunglobuline eine wichtige Rolle bei der Erzeugung der Antikörpervielfalt spielen und die Gene für den variablen Teil der Immunglobulinketten ebenfalls auf der 5'-Seite der Gene für den konstanten Teil der Immunglobulinketten liegen, besagt eine attraktive Hypothese, daß auch das c-myc Gen in der neuen Nachbarschaft somatische Mutationen erleiden kann. Diese wiederum könnten entscheidend für das unbegrenzte, der Kontrolle des Körpers entzogene Wachstum der Tumorzellen sein.

Mit Hilfe chromosomenspezifischer Genbibliotheken können die am Beispiel des Burkitt Lymphoms dargestellten Möglichkeiten einer molekularen Cytogenetik generell angewendet werden, um Translokationen, Duplikationen oder Deletionen von Chromosomenabschnitten wesentlich genauer als mit den klassischen Verfahren der Chromosomenanalyse festzulegen. Monosomien und Trisomien von Chromosomensegmenten führen zu einer entsprechenden Verminderung bzw. Vermehrung der in den betroffenen Segmenten lokalisierten DNA-Sequenzen, die mit Hilfe quantitativer DNA-Hybridisierungsverfahren erfaßt werden können. Die Genauigkeit, mit der der Umfang selbst submikroskopisch kleiner Veränderungen erfaßt werden kann, wird im Prinzip nur von der Verfügbarkeit einer genügenden Zahl klonierter DNA-Proben für den zu analysierenden Chromosomenbereich begrenzt. Neben singulären DNA-Sequenzen könnten hier auch klonierte repetitive DNA-Sequenzen Bedeutung erlangen, die im Hinblick auf ihre Basensequenz bzw. ihre Organisation spezifisch für bestimmte Chromosomenabschnitte sind (Gusella et al. 1982; Rappold et al. 1984a).

Diese neuen Möglichkeiten sollten dazu führen, daß in Zukunft Ort und Umfang chromosomaler Defekte und die damit verbundenen Veränderungen im Phänotyp der betroffenen Individuen wesentlich genauer miteinander korreliert werden können. Wie dies geschehen kann, soll am Beispiel der Deletion des kurzen Arms von Chromosom 5 erläutert werden. Sie ist

die Ursache des Cri du chat-Syndroms, das seinen Namen auf Grund des charakteristischen katzenschreiartigen Wimmerns der betroffenen Kinder erhalten hat. Für den Phänotyp dieses Syndroms ist offenbar der Verlust der Bande 5p15 entscheidend. Doch gibt es auch Kinder mit Cri du chat-Symptomen, bei denen sich eine Chromosomenaberration bislang nicht nachweisen läßt (Niebuhr 1978). Möglicherweise besteht hier eine submikroskopisch kleine Deletion im Bereich 5p15. Die Etablierung einer DNA-Bibliothek für den kurzen Arm von Chromosom 5 würde einen Test dieser Hypothese ermöglichen. Die genaue Eingrenzung der chromosomalen Region, die für die charakteristischen Veränderungen eines bestimmten chromosomalen Fehlbildungssyndroms verantwortlich ist, könnte in Zukunft die Klonierung der für den veränderten Phänotyp wesentlichen DNA-Sequenzen ermöglichen. Mit dem Methodenarsenal der Molekularbiologie könnte dann die Rolle der in einem pathogenetischen Chromosomensegment lokalisierten Gene über die Identifizierung von Genprodukten, Ort und Zeitpunkt der Genexpression bis hin zur Ebene der primären Genfunktion an menschlichen Gewebekulturen kausal verfolgt werden. Ein Teil der Analysen könnte auch an Labortieren durchgeführt werden, da sich mit Hilfe der klonierten, menschlichen Gene die entsprechenden Gene aus DNA-Bibliotheken anderer Säugetierspezies relativ leicht isolieren lassen sollten.

Die klinischen Cytogenetiker kennen zahlreiche Chromosomensegmente, die im monosomen oder trisomen Zustand charakteristische Fehlbildungssyndrome hervorrufen, die in der Regel mit ausgeprägtem Schwachsinn einhergehen (vgl. Tab. 2 bei Yunis und Lewandowski 1983). Doch gibt es bis heute keine überzeugende Theorie, auf welchen Wegen und über welche pathogenetischen Mechanismen die Verminderung bzw. Vermehrung der in den betroffenen Segmenten lokalisierten DNA-Sequenzen ein Fehlbildungssyndrom auslöst. Die am Beispiel des Cri du chat-Syndroms skizzierte Strategie eröffnet einen neuen Weg, auf dem man der Lösung dieses Problems einen Schritt näher kommen kann.

#### b) Molekulare Struktur und Evolution von Chromosomen

Ein bedeutsamer Schritt im Verlauf der Evolution, die zu den heutigen Genomen der Säugetiere einschließlich des Menschen geführt hat, bestand nach Ohno in einer Verdoppelung der Chromosomenzahl und damit des DNA-Gehaltes vor 200 bis 300 Millionen Jahren. Comings (1972) hat diese Hypothese im Hinblick auf die Evolution des menschlichen Karyotyps weiter präzisiert. Danach sind die Chromosomen 1 und 2, 4 und 5, 7 und 8, 11 und 12, 14 und 15, 16 und 17, 19 und 20 sowie 21 und 22 aus je einem gemeinsamen Paar homologer Chromosomen hervorgegangen ("ancestral homologues"). Die Hypothese wird gestützt durch Ähnlichkeiten der Bandenmuster und in einigen Fällen durch den Vergleich von genetischen Markern. So findet man beispielsweise das Gen für die Lactatdehydrogenase A auf Chromosom 11p12, während das Gen für die Lactatdehydrogenase B auf Chromosom 12p12 lokalisiert werden konnte. Durch einen Vergleich chromosomenspezifischer DNA-Bibliotheken läßt sich feststellen, in welchem Umfang Ähnlichkeiten zwischen repetitiven und singulären DNA Sequenzen in den homologisierten Banden der "ancestral homologues" bestehen. Die Hypothese von Comings könnte so kritisch getestet werden.

Eine weitere faszinierende Frage betrifft die Evolution der Chromosomen bei den Primaten. Es zeichnet sich ab, daß die genetischen Unterschiede zwischen den Hominiden und den Pongiden, beispielsweise zwischen Mensch, Schimpanse und Gorilla, auf eine relativ geringe Anzahl chromosomaler Umbauten zurückzuführen ist. Vor allem Dutrillaux (1984) hat umfangreiche Untersuchungen zur chromosomalen Phylogenese der Primaten mit Hilfe der klassischen Bänderungstechniken durchgeführt. Es scheint heute,

daß die genetischen Grundlagen für die Evolution der Hominiden eher auf dem Niveau der Genregulation als auf dem Niveau prinzipieller Unterschiede in den Strukturgenen der höheren Primaten zu suchen sind. Solche Unterschiede der Genregulation dürften beispielsweise für die Zahl der Zellteilungen der Nervenzellen bei der Entwicklung des Großhirns entscheidend sein. Die im vorigen Abschnitt für die Untersuchung von Chromosomenaberrationen dargestellten Möglichkeiten einer molekularen Bruchpunktanalyse können auch für Untersuchungen der Chromosomenevolution eingesetzt werden. Dabei interessiert vor allem die Frage, welche Gene bei den einzelnen Chromosomenumordnungen, die zum heutigen Karyotyp des Menschen geführt haben, in enge Nachbarschaft gerückt sind. Es steht zu erwarten, daß mit Hilfe molekularer Techniken Chromosomenumordnungen auch im submikroskopischen Bereich erkannt werden können, die bislang einer Analyse nicht zugänglich waren. Chromosomenspezifische DNA-Bibliotheken der höheren Primaten stellen für dieses Arbeitsgebiet die entscheidende Grundlage dar.

## 1.2 Chromosomale Kartierung und Diagnose von Krankheitsbildern mit monogenem Erbgang

In diesem Abschnitt soll auf die Bedeutung chromosomenspezifischer DNA-Bibliotheken im Rahmen einer Verwirklichung des "Botstein-Konzepts" zur genetischen Kartierung und Diagnose mendelnder Erbkrankheiten eingegangen werden.

Botstein et al. (1980) haben ein Verfahren zur Konstruktion einer Kopplungskarte des menschlichen Genoms mit Hilfe von DNA-Polymorphismen der Länge von Restriktionsfragmenten (restriction fragment length polymorphism, RFLP) vorgeschlagen. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, daß etwa eine von hundert Basen im DNA-Strang eines Chromosoms verschieden ist von der Base, die sich an identischer Stelle bei dem homologen Chromosom des gleichen Individuums oder bei einem anderen Individuum befindet. Wenn von solchen Sequenzunterschieden die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen betroffen sind, dann führen sie zu unterschiedlichen Spaltungsmustern der DNA an den entsprechenden Stellen, die mit Hilfe der Southern-Blot Technik nachgewiesen werden können (Southern 1975; Davies 1981, dort Abb. 2). Derartige DNA-Polymorphismen, die auch durch Deletionen oder Insertionen von DNA-Fragmenten entstehen können, werden den mendelnden Regeln entsprechend vererbt. Inzwischen gibt es bereits eine große Anzahl singulärer DNA-Proben, mit denen sich solche Polymorphismen nachweisen lassen (Schmidtke und Cooper 1983). Jede derartige DNA-Probe definiert einen "DNA-Marker-Locus". Liegt nun ein solcher Locus in naher Nachbarschaft eines für eine mendelnde Erbkrankheit verantwortlichen Gens, dann wird er in der Regel gemeinsam mit diesem Gen vererbt. Der Restriktionslängen-Polymorphismus kann dann als Marker für die Erfassung dieses monogen vererbten Leidens verwendet werden. Beispiele für autosomal dominante und rezessive Erbgänge sind bei Gusella et al. (1983) und Woo et al. (1983) zu finden. Damit werden auch solche Krankheiten einer pränatalen Diagnose aus Fruchtwasserzellen oder Chorionzotten zugänglich, bei denen über den Gendefekt selbst noch nichts bekannt ist und bei denen es bislang keine Möglichkeit gibt, pathophysiologische Veränderungen auf dem Niveau der für eine Analyse zugänglichen Zellen zu erfassen.

Ein spektakuläres Beispiel für die erfolgreiche Anwendung des Botstein-Konzepts zeigt die Entdeckung eines polymorphen DNA-Marker Locus, der mit dem Gen für Chorea Huntington eng gekoppelt ist und auf Chromosom 4 lokalisiert werden konnte (Gusella et al. 1983). Es handelt sich hier um eine autosomal dominante Erkrankung des Zentralnervensystems, die

meist im mittleren Lebensalter beginnt und zu Hirnatrophie verbunden mit schweren Bewegungsstörungen und fortschreitendem geistigen Verfall führt. Die Arbeit von Gusella et al. ist zugleich beispielhaft für die Schwierigkeiten, die bei einer Realisierung des Botstein-Konzepts überwunden werden müssen.

Das methodische Nadelöhr besteht in der Etablierung einer Koppelung zwischen einem polymorphen DNA Marker Locus und dem interessierenden Gen. Voraussetzung dafür sind genügend große, informative Stammbäume und genügend singuläre DNA Proben zur Erfassung der Marker Loci. Der DNA Gehalt des haploiden menschlichen Chromosomensatzes umfaßt etwa 3 Milliarden Basenpaare. Das entspricht etwa 3000 cM. (Die Einheit 1 cM (centi-Morgan) ist definiert als Rekombinationswahrscheinlichkeit von 1% pro Meiose zwischen zwei benachbarten Loci.) Daraus folgt, daß ein Minimum von 100 bis 200 gleichmäßig über das Genom verteilten Marker Loci benötigt wird, damit Aussicht besteht, für jedes interessierende Gen wenigstens eine "lockere" Koppelung zu etablieren (Botstein et al. 1980). Um die Etablierung eines Netzes von polymorphen Marker Loci auf allen Chromosomen zu beschleunigen, bieten sich singuläre DNA-Proben aus chromosomenspezifischen DNA-Bibliotheken als Ausgangsbasis an, die mit der Technik der in situ Hybridisierung (siehe oben) bestimmten Chromosomenbanden zugeordnet werden können. Sobald eine erste, lockere Koppelung gefunden ist, können weitere DNA-Marker Loci in der Nachbarschaft des ersten Locus herangezogen werden, um gezielt nach einer engeren Koppelung zu suchen und die Position des interessierenden Gens so weiter einzugrenzen.

Entscheidend für die Brauchbarkeit solcher Marker Loci als diagnostisches Instrument ist die Häufigkeit von Austauschereignissen (crossing-over) im Bereich zwischen Marker Locus und dem interessierenden Gen während der Meiose und der Prozentsatz an Familien mit informativem Paarungstyp. In jeder Familie muß zunächst individuell ermittelt werden, ob gesunde und kranke Familienmitglieder mit Hilfe der in dieser Familie nachweisbaren Restriktionslängen-Polymorphismen des verwendeten Marker Locus einwandfrei unterschieden werden können (Woo et al. 1983). Um das Risiko falsch positiver oder falsch negativer Diagnosen als Folge eines crossing-over zu reduzieren, wird man nach Möglichkeit Marker-Loci auf beiden Seiten des Gens verwenden. Diese Schwierigkeiten entfallen, wenn das interessierende Gen (beispielsweise nach Anreicherung der spezifischen m-RNA) selbst kloniert werden kann und ein polymorpher DNA Marker Locus im Bereich des Gens selbst liegt. Der Idealfall ist dann gegeben, wenn die für eine Krankheit verantwortliche Mutation selbst die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym betrifft und über einen Restriktionslängen-Polymorphismus an dieser Stelle nachgewiesen werden kann. Im Fall der Sichelzellanämie konnte dieser Idealfall inzwischen realisiert werden (Chang und Kan 1981).

Ziel einer genetischen Analyse mendelnder Krankheiten ist letztlich die Isolierung des die Krankheit verursachenden Gens selbst. Diese Isolierung erscheint auch heute noch nahezu aussichtslos, wenn über Struktur und Funktion eines Gens keinerlei Information vorliegt, wie das beispielsweise beim Gen der Huntingtonschen Chorea der Fall ist. Die Genauigkeit der Genlokalisierung mittels Koppelungsanalyse ist beim Menschen auf einen DNA-Bereich von etwa ein bis drei Millionen Basenpaaren begrenzt. Eine genauere Kartierung mittels noch enger mit dem Gen gekoppelter Marker Loci scheidet einfach darin, daß informative crossing-over zwischen diesen Loci und dem Gen bei dem begrenzten Umfang informativer Familien nicht mehr zu erwarten sind. Für eine ausführliche Darstellung der Methode der Koppelungsanalyse siehe Vogel und Motulsky (1979). Jedoch werden für das Chorea Huntington Gen bereits

Strategien diskutiert, wie auch diese neue Barriere überwunden werden kann (Cantor 1984). Falls mit einer dieser Strategien, bei denen wiederum chromosomenspezifische Genbanken, hier von Chromosom 4, eine wesentliche Rolle spielen, die Klonierung des gesuchten Gens gelingen sollte, zeichnet sich eine prinzipiell neue Möglichkeit einer kausalen Analyse der Chorea Huntington und anderer monogener Erbkrankheiten ab. Für die Analyse der primären Genfunktion gilt dann, was bereits im Abschnitt 1.1 zur Analyse von Genen aus pathogenetischen Chromosomensegmenten gesagt wurde.

Ob das Botstein-Konzept auch zur Analyse multifaktorieller Erkrankungen beitragen kann, bleibt abzuwarten. Immerhin scheint seine Anwendung dort möglich, wo Hauptgene eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsdisposition spielen.

## 2. Methodische Aspekte

Zur Herstellung von chromosomenspezifischen DNA-Bibliotheken gibt es gegenwärtig drei verschiedene Verfahren.

### 2.1 Chromosomenfraktionierung

Ein attraktiver und direkter Weg zur Etablierung von chromosomenspezifischen DNA-Bibliotheken besteht darin, Metaphasechromosomen eines bestimmten Typs mit möglichst großem Reinheitsgrad zu isolieren ("fraktionieren, sortieren") und deren DNA in einem geeigneten Vektor zu klonieren (Davies et al. 1981, Krumlauf et al. 1982, Müller et al. 1983, Griffith et al. 1984, Lalonde et al. 1984).

Eine auf diese Weise etablierte DNA-Bibliothek enthält im Idealfall nur noch DNA-Sequenzen eines bestimmten Chromosoms. Ein derartiges Vorhaben ist über die Erstellung von DNA-Bibliotheken der 24 verschiedenen menschlichen Chromosomentypen (22 Autosomen, X und Y) hinaus interessant, da durch die Klonierung der DNA von aberranten Chromosomen (Chromosomen mit Deletionen oder Translokationen, dizentrischen Chromosomen, Isochromosomen) Bibliotheken erstellt werden können, die die DNA bestimmter Chromosomenabschnitte repräsentieren. Auch Chromosomen mit amplifizierten Sequenzen, die sich als homogen gefärbte Regionen im Bandenmuster zeigen, können in ausreichender Menge sortiert werden.

Voraussetzung für die hier skizzierte Methode der Etablierung chromosomenspezifischer DNA-Bibliotheken ist die Gewinnung von Chromosomenfraktionen möglichst großer Reinheit. Solche Chromosomenfraktionen wurden erstmals durch die Technik der fluoreszenzaktivierten Sortierung gewonnen (Horan and Wheelless 1977; siehe auch Kapitel 10). Es gelang Chromosomenfraktionen mit über 80% Reinheit zu sortieren. In einigen Fällen wurden sogar Reinheiten von bis zu 99% angegeben (Lebo et al. 1984).

Die Trennmöglichkeiten können noch erheblich verbessert werden, wenn gleichzeitig mehrere physikalische Größen gemessen und als Sortierungskriterium genutzt werden können (Gray et al. 1979, Lebo et al. 1984). Hier besteht ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu anderen Methoden, wie z.B. Zentrifugation. Mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Sortierung gelang in den letzten Jahren eine Fraktionierung verschiedener Typen von menschlichen Chromosomen. Die sortierten Chromosomen wurden erfolgreich für die Etablierung chromosomenspezifischer DNA-

Bibliotheken eingesetzt. Solche DNA-Bibliotheken wurden inzwischen für die menschlichen Chromosomen 1, 2, 6, 19, 20, 21, 22, X und Y gewonnen (Sparkes et al. 1984).

Die Ausbeute an sortierten Chromosomen kann durch Voranreicherungsverfahren erheblich verbessert werden. Hier haben sich vor allem Sedimentations- und Zentrifugationsverfahren als geeignet erwiesen. So wurden Chromosomen aus menschlichen Zellen isoliert und mithilfe von Geschwindigkeitssedimentation (52 g) in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. In einigen dieser Fraktionen waren spezifische Typen von Chromosomen (z.B. Nr. 18-22) stark angereichert. Solche Fraktionen wurden anschließend durch fluoreszenzaktivierte Sortierung weiter aufgetrennt. Auf diesem Wege gelang es, die Sortierungsrate für die Chromosomen 21 und 22 um etwa das zehnfache zu steigern (Collard et al. 1984). Alternativ kann man versuchen, die Sortierungsgeschwindigkeit des Sorters selbst zu erhöhen.

## 2.2 Zellhybride

Eine weitere vielgenutzte Möglichkeit zur Etablierung chromosomenspezifischer DNA-Bibliotheken besteht in der Verwendung von Interspezies-Zellhybriden. Hierbei werden Zellen (z.B. Mensch, Maus) miteinander fusioniert. Die fusionierten Zellen verlieren nach und nach menschliche Chromosomen. Durch geeignete biochemische Selektion erhält man schließlich Hybridzellen, die außer den Nagerchromosomen nur noch ein oder wenige menschliche Chromosomen enthalten. Alternativ können Nagerzellen zunächst mit "Minizellen" (Zellfragmenten) fusioniert werden, die nur ein oder wenige Chromosomen enthalten. Die so gewonnenen Hybridzellen werden weiter vermehrt.

Die DNA geeigneter Hybridzellen wird isoliert und kloniert. Die auf diesem Wege gewonnene DNA-Bibliothek enthält nur noch Sequenzen der in den verwendeten Hybridzellen enthaltenen menschlichen Chromosomen, sowie Sequenzen der Nagerchromosomen. So wurden beispielsweise für die menschlichen Chromosomen 11 und 12 DNA-Bibliotheken errichtet, die aus Gesamt-DNA von Hamster-Mensch-Zellhybriden gewonnen wurden, welche ausschließlich das Chromosom 11 oder das Chromosom 12 enthielten (Gusella et al. 1980).

Solche DNA-Bibliotheken aus Hybridzelllinien bedeuten einen wesentlichen Fortschritt und wurden inzwischen auch für andere Chromosomen angelegt. Sie haben jedoch den Nachteil, daß die interessierenden Sequenzen (hier eines spezifischen Chromosoms) nur einen geringen Bruchteil der Bibliothek ausmachen. Die DNA-Bibliothek muß also zunächst nach den seltenen Sequenzen menschlichen Ursprungs abgesucht werden. Hierzu wurden Hybridisierungsverfahren (Gusella et al. 1980) und Rekombinationstechniken (Neve et al. 1983) beschrieben. Diese beiden Methoden beruhen auf der Speziespezifität von repetitiven Sequenzen. Um in einer DNA-Bibliothek in fast allen Klonen ( $\geq 95\%$ ) mindestens eine solche repetitive Sequenz zu finden, müssen die klonierten Fragmente 15 - 20 kb lang sein.

## 2.3 Kombination von Chromosomenfraktionierung und Hybridzellverfahren

Beide bisher genannten Methoden zur Etablierung chromosomenspezifischer DNA-Bibliotheken haben charakteristische Vor- und Nachteile. Die Zellhybridisierungsmethode kann DNA-Bibliotheken liefern, deren menschliche DNA-Segmente mit Sicherheit einem bestimmten Chromosom zugeordnet werden können. Dagegen sind diese Sequenzen relativ selten. Auf der anderen Seite kann mit der Chromosomenfraktionierungsmethode ein

gewünschter Chromosomentyp stark angereichert werden. Ein wesentliches Problem ist hier die Reinheit der sortierten Chromosomen. Diese hängt entscheidend von der durchflußphotometrischen Unterscheidbarkeit der Chromosomen und von der Qualität der zur Sortierung benutzten Chromosomensuspension ab.

Eine Kombination beider Verfahren erlaubt die Etablierung von DNA-Bibliotheken mit hoher Ausbeute und Reinheit. So konnte am Beispiel einer Hamster-Mensch-Hybridzelllinie, die nur noch das Y-Chromosom als einziges freies menschliches Chromosom enthielt, gezeigt werden, daß die Sortierung ausgewählter Chromosomen auf diesem Wege erheblich besser durchgeführt werden kann (Cremer et al. 1984). Ein Vergleich der aus sortierten Y-Chromosomen etablierten DNA-Bibliothek (Müller et al. 1983) mit einer DNA-Bibliothek aus Gesamt-DNA von Hybridzellen, die nur noch das Y-Chromosom als einziges menschliches Chromosom enthielten, zeigte, daß der Anteil der Y-chromosomalen Sequenzen bei Verwendung der kombinierten Methode (Sortierung von Hybridzellchromosomen) um ein Vielfaches (ca. 30x) höher lag (Cremer et al. 1984).

Es ist zu erwarten, daß die Kombination der Chromosomenfraktionierungs- und der Zellhybridmethode auch bei anderen Chromosomen erfolgreich eingesetzt werden kann, insbesondere in Verbindung mit Immunfluoreszenzverfahren (Trask et al. 1984).

Bei Verwendung geeigneter Hybridzelllinien sollte es möglich sein, alle menschlichen Chromosomen mit hoher Ausbeute und Reinheit zu sortieren, einschließlich der Chromosomen 10 - 12, die bislang durchflußphotometrisch nicht voneinander getrennt werden können (Lebo et al. 1984). Die Verwendung von Hybridzellen mit geeigneten aberranten Chromosomen würde darüber hinaus eine elegante Möglichkeit zur Etablierung von DNA-Bibliotheken bestimmter Chromosomenabschnitte liefern.

#### Danksagung

Wir danken Frau Prof. T.M. Schroeder-Kurth und Prof. F. Vogel für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

#### Literatur

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331
- Cantor CR (1984) Charting the path to the gene. *Nature* 308:404-405
- Chang JC, Kan YW (1981) Antenatal diagnosis of sickle cell anaemia by direct analysis of the sickle mutation. *Lancet* II:1127-1129
- Collard JG, Philippus E, Tulp A, Lebo RV, Gray JW (1984) Separation and analysis of human chromosomes by combined velocity sedimentation and flow sorting applying single- and dual-laser flow cytometry. *Cytometry* 5:9-19
- Comings DE (1972) Evidence for ancient tetraploidy and conservation of linkage groups in mammalian chromosomes. *Nature* 238:455-457
- Cremer C, Rappold G, Gray JW, Müller CR, Ropers HH (1984) Preparative dual beam sorting of the human Y chromosome and in situ hybridization of cloned DNA probes. *Cytometry*, im Druck
- Davies KE (1981) The application of DNA recombinant technology to the analysis of the human genome and genetic disease. *Hum. Genet.* 58: 351-357
- Davies KE, Young BD, Elles RG, Hill ME, Williamson R (1981) Cloning of a representative genomic library of the human X chromosome after sorting by flow cytometry. *Nature* 293:374-376

- Dutrillaux B (1984) Chromosomale Herkunft des Menschen. In: Passarge E (Hrsg) Genetische Herkunft und Zukunft des Menschen. Verlag Chemie, Weinheim, S 55-69
- Gray JW, Langlois RG, Carrano AV, van Dilla MA (1979) High resolution chromosome analysis: One and two parameter flow cytometry. *Chromosoma* 73:9-27
- Griffith JK, Cram LS, Crawford BD, Jackson PJ, Schilling J, Schimke RT, Walters RA, Wilder ME, Jett JH (1984) Construction and analysis of DNA sequence libraries from flow-sorted chromosomes: Practical and theoretical considerations. *Nucl. Acids Res.* 12:4019-4034
- Gusella JF, Keys C, Varsanyi-Breiner A, Kao F-T, Jones C, Puck TT, Housman D (1980) Isolation and localization of DNA segments from specific human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:2829-2833
- Gusella JF, Jones C, Kao F-T, Housman D, Puck TT (1982) Genetic fine-structure mapping in human chromosome 11 by use of repetitive DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:7804-7808
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MP, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson J, Bonilla E, Martin JB (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306:234-238
- Horan PK, Wheelless LL Jr. (1977) Quantitative single cell analysis and sorting. *Science* 198:149-157
- Krumlauf R, Jeanpierre M, Young BD (1982) Construction and characterization of genomic libraries from specific human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:2971-2974
- Lalande M, Kunkel LM, Flint A, Latt SA (1984) Development and use of metaphase chromosome flow sorting methodology to obtain recombinant phage libraries enriched for parts of the human X-chromosome. *Cytometry* 5:101-107
- Lawn RM, Fritsch EF, Parker RC, Blake G, Maniatis TC (1978) The isolation and characterization of linked  $\beta$ - and  $\delta$ -globin genes from a cloned library of human DNA. *Cell* 15:1157-1174
- Lebo RV, Gorin F, Fletteric RJ, Kao F-T, Cheung MC, Bruce BD, Kan YW (1984) High-resolution chromosome sorting and DNA spot-blot analysis assign McArdle's syndrome to chromosome 11. *Science* 225:57-59
- Mitelman F (1984) Restricted number of chromosomal regions implicated in aetiology of human cancer and leukaemia. *Nature* 310:325-327
- Müller CR, Davies KE, Cremer C, Rappold G, Gray JW, Ropers HH (1983) Cloning of genomic sequences from the human Y chromosome after purification by dual beam flow sorting. *Hum. Genet.* 64:110-115
- Neve RL, Bruns GAP, Dryja TP, Kurnit DM (1983) Retrieval of human DNA from rodent-human genomic libraries by a recombination process. *Gene* 23:343-354
- Niebuhr E (1978) The cri du chat syndrome. *Epidemiology, cytogenetics and clinical features.* *Hum. Genet.* 44:227-275
- Piccoli SP, Caimi PG, Cole MD (1984) A conserved sequence at c-myc oncogene chromosomal translocation breakpoints in plasmocytomas. *Nature* 310:327-330
- Rappold GA, Cremer T, Hager HD, Davies KE, Müller CR, Yang T (1984a) Sex chromosome positions in human interphase nuclei as studied by in situ hybridization with chromosome specific DNA probes. *Hum. Genet.* 67:317-325
- Rappold GA, Hameister H, Cremer T, Adolph S, Henglein B, Freese UK, Lenoir GM, Bornkamm GW (1984b) C-myc and immunoglobulin kappa light chain constant genes are on the 8q+ chromosome of three Burkitt lymphoma lines with t (2;8) translocations. *EMBO J., im Druck*
- Schmidtke J, Cooper DN (1983) A list of cloned human DNA sequences. *Hum. Genet.* 65:19-26
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517

- Sparkes RS, Berg K, Evans HJ, Klinger HP (eds) (1984) Human Gene Mapping 7. Cytogen. Cell Genet. 37:1-665
- Trask B, v.d. Engh G, Gray JW, Vanderlaan M, Turner B (1984) Immunofluorescent detection of histone 2B on metaphase chromosomes in suspension using flow cytometry. Chromosoma, im Druck
- Vogel F, Motulsky AG (1979) In: Human Genetics, Problems and Approaches. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Woo SLC, Lidsky AS, Güttler F, Chandra T, Robson KJH (1983) Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. Nature 306:151-155
- Yunis JJ, Lewandowski RC (1983) High-resolution cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series 19,5, March of Dimes Birth Defects Foundation. Alan R. Liss, New York, pp 11-37
- Zabel BU, Naylor SL, Sakaguchi AY, Bell GI, Shows TB (1983) High-resolution chromosomal localization of human genes for amylase, proopiomelanocortin, somatostatin, and a DNA fragment (D3S1) by in situ hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. 80:6932-6936