

Aus dem Medizinischen Zentrum für Humangenetik  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik  
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik

---

**Verkürzung eines humanen Chromosoms 7 durch  
Telomer-verursachte Chromosomenfragmentierung  
als Basis zur Erzeugung eines artifiziellen  
Säugerchromosoms**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie  
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Alexander Schelbert  
aus Frankfurt am Main

Marburg, Januar 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 10. Mai 2001

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold

Referent: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

Korreferent: Prof. Dr. J. Hebebrand

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Chromosomen .....	1
1.2	Telomere .....	3
1.3	Replikationsursprünge .....	9
1.4	Zentromer und Kinetochor .....	11
1.5	Zentromer-DNA .....	13
1.5.1	Repetitive DNA humaner Zentromere .....	13
1.5.1.1	Klassische Satelliten-DNA .....	13
1.5.1.2	Alphasatelliten- (alphaide) DNA .....	14
1.5.1.3	Die Beta- und Gammasatelliten-DNA-Familien .....	15
1.5.1.4	Andere repetitive DNA-Sequenzen .....	16
1.5.2	Das Zentromer von Chromosom 7 .....	17
1.5.3	Alphasatelliten und Neozentromere .....	18
1.6	Künstliche Säugerchromosomen (MACs) und Mini-Chromosomen .....	21
1.6.1	Künstliche Chromosomen .....	23
1.6.2	Mini-Chromosomen .....	25
1.7	Physikalische Kartierung .....	27
1.7.1	STS-(Gehalt)-Kartierung .....	30
1.8	Aufgabenstellung .....	31
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.1	Material .....	32
2.1.1	Chemikalien .....	32
2.1.2	Nukleinsäuren, Nukleotide, Enzyme .....	34
2.1.3	Materialien für die Zellkultur .....	35
2.1.4	Materialien für die FISH .....	35
2.1.5	Kits und Sonstiges .....	36
2.1.6	Puffer, Medien und Lösungen .....	36
2.1.6.1	Für die Zellkultur: .....	36
2.1.6.2	Für die FISH-Analyse: .....	37
2.1.6.3	Für alle anderen verwendeten Methoden: .....	37
2.1.7	Geräte und Zubehör .....	39
2.1.8	Somatische Zellhybriden .....	42
2.1.8.1	Zellhybriden mit Anteilen von Chromosom 7 .....	42
2.1.8.2	Die Zelllinien Ru Rag 14-4-7-44-7 und Ru Rag 6-20-12 .....	42
2.1.8.3	Monochromosomale Zellhybriden .....	43
2.1.8.4	Bestrahlungshybriden .....	45
2.1.8.5	Normale diploide Zelllinien .....	46
2.1.9	Bakterielle Vektoren .....	47
2.1.9.1	Der BAC-Vektor pBAC108L (Shizuya et al., 1992) .....	47

2.1.9.2	andere Vektoren .....	48
2.1.9.3	verwendete Bakterienstämme.....	48
2.1.10	BAC-Klone.....	49
2.1.11	Künstliche Hefechromosomen, YACs .....	49
2.1.11.1	Hefestamm AB1380.....	51
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>52</b>
2.2.1	Kultivierung von Mikroorganismen .....	52
2.2.1.1	Kultur von Escherichia coli (E. coli).....	52
2.2.1.2	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	52
2.2.1.3	Kultur von Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae).....	53
2.2.2	DNA-Präparation und Reinigung .....	53
2.2.2.1	Präparation von genomischer DNA .....	53
2.2.2.2	Präparation von YAC-DNA .....	53
2.2.2.3	Plasmid Minipräparation (alkalische Lyse).....	54
2.2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA.....	54
2.2.2.5	Phenolextraktion.....	55
2.2.2.6	DNA-Präzipitation .....	55
2.2.2.7	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	55
2.2.3	Restriktionsspaltungen.....	56
2.2.4	Gelelektrophoresen.....	56
2.2.4.1	Horizontalgelelektrophorese in Agarosegelen .....	56
2.2.4.2	Denaturierende Polyacrylamidgele für die auto. Sequenzierung .....	57
2.2.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	57
2.2.5.1	Isolierung kleiner Fragmente aus Agarosegelen .....	57
2.2.5.2	Elektroelution .....	57
2.2.6	Klonierung .....	58
2.2.6.1	Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase.....	58
2.2.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten .....	58
2.2.6.3	Linkerligation .....	59
2.2.6.4	Ligation von Multimeren .....	59
2.2.6.5	Transformation .....	60
2.2.7	Nukleinsäuretransfer auf Nylonmembranen.....	60
2.2.7.1	DNA-Transfer durch aufwärtsgerichteten, alkal. Kapillartransfer.....	60
2.2.7.2	Vakuum-Transfer von DNA.....	61
2.2.8	DNA-Markierung (radioaktiv) .....	62
2.2.8.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch “random primed oligonucleotid labeling” .....	62
2.2.8.2	Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden.....	62
2.2.8.3	Entfernung freier Nukleotide.....	62
2.2.9	DNA-Hybridisierung .....	63
2.2.9.1	Hybridisierung.....	63
2.2.9.2	Waschen der Nylonfilter und Autoradiographie .....	63
2.2.10	Polymerase-Kettenreaktion .....	64
2.2.10.1	Primer für die Amplifikation genomischer DNA-Fragmente .....	65
2.2.11	DNA-Sequenzierung .....	68
2.2.11.1	Sequenzierung der BAC-Enden .....	69

2.2.12 Zellkultur .....	70
2.2.12.1 Routinekultur .....	70
2.2.12.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen .....	70
2.2.12.3 Auftauen von Zellen .....	71
2.2.12.4 Transfektion eukaryontischer Zellen durch Elektroporation.....	71
2.2.12.5 Färbung von $\beta$ -Galaktosidase positiven Zellen .....	72
2.2.13 Die Selektion transfizierter Zellen.....	72
2.2.13.1 Selektion mit Geneticin, G418 .....	72
2.2.13.2 Selektion mit Gancyclovir, Cymeven (GANC) .....	73
2.2.13.3 Selektion und Kultivierung einzelner Zellklone .....	73
2.2.14 Chromosomenpräparate von Hybridzelllinien.....	75
2.2.15 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....	76
2.2.15.1 Nicktranslation mit Biotin .....	76
2.2.15.2 Fällen der DNA .....	77
2.2.15.3 Vorbereitung der Sonden-DNA (Zugabe von Kompetitor-DNA) .....	77
2.2.15.4 Vorbereitung der Chromosomenpräparate .....	78
2.2.15.5 Hybridisierung.....	79
2.2.15.6 Nachweis der biotinylierten DNA-Sonde.....	79
2.2.15.7 Gegenfärbung .....	80
2.2.15.8 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung .....	80
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>82</b>
<b>3.1 STS-Gehalt-Kartierung der Zentromerregion von Chromosom 7 .....</b>	<b>82</b>
<b>3.2 Lokalisation des hsp27-Gens auf Chromosom 7q11.....</b>	<b>88</b>
3.2.1 Lokalisation durch PCR-Analyse auf Chromosom 7q .....	88
3.2.2 Lokalisation durch FISH .....	92
<b>3.3 Verkürzung eines humanen Chromosoms 7 durch Telomer-verursachte Chromosomenfragmentierung in der Maus-Mensch Hybridzelllinie Ru Rag 14-4-7-44-7 .....</b>	<b>93</b>
3.3.1 Strategie zur Verkürzung des menschlichen Chromosoms 7 .....	93
3.3.2 Konstruktion des Chromosomen-Fragmentierungsvektors .....	95
3.3.2.1 Umklonieren des Telomerrepeats (0.8TelpGEM7).....	96
3.3.2.2 Klonierung zweier Fragmente aus pYAC4 (ARS/CEN/URA) .....	99
3.3.2.3 Konstruktion des Vektors 0.8TelACU .....	102
3.3.2.4 Der Vektor pPNTel .....	103
3.3.2.5 Klonierung eines 2,7 kb großen $\alpha$ -Satelliten aus D7Z2.....	104
3.3.2.6 Konstruktion der Vektoren pPNTelD7Z2 .....	107
3.3.3 Chromosomenfragmentierung in der Zelllinie Ru Rag 14-4-7-44 .....	109
3.3.4 Transfektion der Zelllinie Ru Rag 14-4-7-44-7 mit dem Vektor pPNTelD7Z2(+) und Subklonierung von Zellklonen.....	111

---

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>115</b>
<b>4.1</b>	<b>STS-Gehalt-Kartierung der Zentromerregion von Chromosom 7 des Menschen.....</b>	<b>116</b>
4.1.1	Probleme bei der Kartierung im und in der Nähe des Zentromers.....	119
4.1.2	Das HSP27-Gen.....	121
4.1.2.1	Die chromosomale Lokalisation von HSP27 .....	122
<b>4.2</b>	<b>Verkürzung von Chromosomen in der Zelllinie Ru Rag 14-4-7-44-7 (RR14).....</b>	<b>123</b>
4.2.1	Einfügen neuer Telomere in Chromosomen der Zelllinie RR14.....	123
4.2.2	Die gerichtete Verkürzung des menschlichen Derivatvchromosoms 7p.....	125
4.2.2.1	Verwendung von Zentromerabschnitten für die homologe Rekombination .....	125
4.2.2.2	Wahrscheinlichkeit einer Integration durch homologe Rekombination .....	129
4.2.2.3	Selektion zur Anreicherung von homologen Rekombinations- ereignissen .....	130
4.2.3	Vermehrung von humanen Minichromosomen in Hefe .....	133
<b>4.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>134</b>
4.3.1	Schritte zur weiteren Verkürzung des Derivatvchromosoms 7p.....	134
<b>4.4</b>	<b>MACs, Minichromosomen und Chromosomenfragmente: Stand der Technik, Perspektiven und Anwendungen .....</b>	<b>136</b>
4.4.1	Entwicklung artifizierlicher Säugerchromosomen .....	136
4.4.2	Manipulation von Säugerchromosomen .....	137
4.4.3	Anwendungsmöglichkeiten .....	139
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>143</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>145</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>168</b>
8.1	FASTA-Vergleich von 7c23_sp6.....	168
<b>9</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</b>	<b>170</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>171</b>

# 1 Einleitung

Ein Ziel des Humanen Genom Projektes ist es, die Sequenzabfolge der einzelnen Bausteine der Erbsubstanz, der DNA, vollständig zu entschlüsseln (Abschnitt 1. 7). Daneben kann es auch zum besseren Verständnis der Struktur der Chromosomen und zur Identifizierung ihrer funktionellen Bausteine beitragen.

Der ungeheure Informationsgehalt einer Säugerzelle, der in ihrem Genom kodiert ist, muß nicht nur einwandfrei zeitlich und gewebspezifisch abgelesen werden, um einen Organismus entstehen und leben zu lassen (Transkription), sondern er muß auch identisch redupliziert werden (Replikation). Die immense Größe dieses Genoms (etwa 3 Milliarden Basenpaare) erfordert eine zeitliche (Zellzyklus) und strukturelle (Chromosomen) Organisation, die die Verdopplung und Weitergabe auf die Tochterzellen möglichst effizient gestaltet. Das gesamte Genom wird in einzelne Riesenmoleküle, die Chromosomen, unterteilt, die zyklisch strukturellen Veränderungen unterworfen werden, um so die verdoppelte DNA, die beiden Chromatiden, exakt auf die beiden Tochterzellen verteilen zu können.

Die funktionellen und strukturellen Bestandteile der Chromosomen sind nicht leicht zugänglich und nur ansatzweise verstanden. Ihre Funktionalität sollte aber ausgenutzt werden können, um aus ihnen künstliche Vektoren zu entwickeln, die ein wichtiges Werkzeug für die stabile Weitergabe großer DNA-Abschnitte und deren Untersuchung in Säugetieren sein könnten. Daher ist das Auffinden und Erforschen solcher funktioneller Chromosomenabschnitte eine der interessantesten Herausforderungen der modernen molekularen Zellbiologie.

## 1. 1 Chromosomen

Der Begriff Chromosom wurde 1888 von Wilhelm Waldeyer eingeführt. Er leitet sich von der im Zellkern anfärbaren Substanz ab, die bereits 1874 von Arnold und 1881 von Flemming beobachtet und von Flemming Chromatin genannt wurde. Von Sutton und Boveri wurde 1904 die Theorie formuliert, daß die Chromosomen die Träger der Erbanlagen seien. Der menschliche Zellkern enthält 46 Chromosomen, 22 Autosomenpaare und zwei Geschlechtschromosomen. Mit Ausnahme der Gameten, die die Reifeteilung (Meiose) durchlaufen, haben menschliche Zellen einen diploiden Chromosomensatz (Murken und Cleve, 1988; Traut, 1991).

Als Molekül, in dem die Erbinformation verschlüsselt ist, wurde 1944 von O.T. Avery die Desoxyribonukleinsäure (DNA) identifiziert. Sie wurde bereits 1871 von Friedrich Miescher zusammen mit der Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellkernen präpariert, und von ihm wurden auch die elementaren Bestandteile dieser Nukleinsäuren charakterisiert (Traut, 1991). Von Watson und Crick wurde 1953 ein Modell der dreidimensionalen Struktur der DNA entworfen (Watson und Crick, 1953). Nahezu die gesamte DNA einer eukaryontischen Zelle befindet sich in ihrem Zellkern, wo sie zusammen mit einer ganzen Reihe von Proteinen (wie etwa den Histonen) zu den Chromosomen organisiert ist.

Die Aufgabe der Chromosomen ist, neben der Verpackung der DNA-Fäden zu einer kompakten Struktur, die Gewährleistung und Ermöglichung der korrekten Verteilung der verdoppelten DNA auf die Tochterzellen in der Mitose, die Reduktionsteilung, sowie die Rekombination der homologen DNA-Moleküle in der Meiose. Der Kondensationsgrad der Chromosomen ist abhängig vom Zellzyklus und ist in der Mitose am höchsten. Während der Pro- und Metaphase ist es möglich, Chromosomen zu präparieren, die im Lichtmikroskop sichtbar sind. Durch spezifische Färbungen kann man eine Bänderung der Chromosomen erzeugen (z.B. G-, Q-Banden durch Giemsa oder Quinacrin), wodurch man einzelne Abschnitte der Chromosomen besser unterscheiden kann. In der Metaphase, kurz vor der Teilung der Chromosomen, lassen sich die beiden Schwesterchromatiden gut erkennen, sie sind dann nur noch an der primären Konstriktion, dem Zentromer, an dem die Spindelfasern ansetzen, verbunden (Wolstenholme, 1992).

Die Packungsdichte des Chromatins im Interphasekern hat einen Einfluß auf die Transkription der DNA. Stärker komprimiertes Heterochromatin ist transkriptionell inaktiver als weniger komprimierte Chromosomenabschnitte, Euchromatin, (Traut, 1991; Strachan und Read, 1996). Aber selbst in transkriptionell aktiven DNA-Abschnitten bleiben die Histone oft mit der DNA verbunden und haben einen direkten Einfluß auf die Transkriptionsmaschinerie der Zelle (Felsenfeld, 1992; Wolffe, 1992).

Nachdem die funktionellen DNA-Elemente der Chromosomen in der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) identifiziert worden waren, konnten Chromosomen künstlich konstruiert werden (Murray und Szostak, 1983). Für die ordnungsgemäße Funktion von Chromosomen sind drei DNA-Elemente notwendig: Das **Zentromer (CEN)** für die Chromosomensegregation, **Telomere (TEL)** für die Chromosomenintegrität und **Replikationsursprünge (ARS)** zur Replikation der DNA. Die aus diesen drei Elementen zusammengesetzten künstlichen Hefechromosomen (YACs) ermögli-



chen nicht nur die Analyse der Chromosomenfunktion, sondern sie sind auch hilfreich für die Klonierung großer DNA-Fragmente (Burke et al., 1987).

## 1. 2 Telomere

Die Telomere bilden das natürliche physikalische Ende des DNA-Doppelstranges aller linearen Chromosomen. Daß diese natürlichen Chromosomenenden spezielle terminale Strukturen aufweisen, wurde bereits Mitte des letzten Jahrhunderts aus Bestrahlungsversuchen an der Fruchtfliege *Drosophila* und der Maispflanze geschlossen (Muller, 1938; McClintock, 1941; McClintock, 1942). Die frischen Bruchenden der Chromosomen neigen nämlich dazu, im Gegensatz zu den natürlichen Enden, miteinander zu verschmelzen. Sie verschmelzen nicht mit natürlichen Chromosomenenden. Es muß daher eine Struktur an den natürlichen Chromosomenenden bestehen, die sich von der frisch induzierten Bruchstelle unterscheidet und sie gegen das Verschmelzen schützt.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die meisten Telomere von eukaryontischen Organismen aus kurzen guaninreichen Sequenzwiederholungen bestehen, die mit einer Reihe von Proteinen komplexiert sind, und eine heterochromatin-ähnliche Struktur bilden. Die Enden menschlicher Chromosomen enthalten einen 2-30 kb langen telomerischen Repeat der Sequenz (TTAGGG)<sub>n</sub> (Moyzis et al., 1988; Allshire et al., 1988; deLange et al., 1990). Diese Sequenzwiederholung ist durch die gesamte Vertebratenentwicklung konserviert (Meyne et al., 1989). Die Telomere von menschlichen Chromosomen enden, wie die vieler anderer Organismen, in einem 75-200 bp langen 3'-Überhang des guaninreichen DNA-Stranges (Makarov et al., 1997; McElligott et al., 1997).

Neben dem Schutz vor Chromosomenfusionen und DNA-Abbau ermöglicht die Struktur der Telomere die Replikation der Chromosomenenden. Während der DNA-Replikation wird der Folgestrang diskontinuierlich synthetisiert. Dazu muß aber im Gegenstrang noch ausreichend DNA vorhanden sein, um einen RNA-Primer binden zu können. Diese ist am Ende eines linearen DNA-Fragmentes nicht vorhanden. Das heißt die Chromosomen würden bei jeder DNA-Replikation ein Stück kürzer werden (Endreplikationsproblem). Nach einer endlichen Anzahl von Zellteilungen würden dadurch auch kodierende Abschnitte des Genoms abgebaut, bis das Überleben der Zellen nicht mehr gewährleistet ist. Das Problem, die Chromosomenenden zu replizieren, wird bei den meisten Eukaryonten dadurch gelöst, daß der Leitstrang mit Hilfe eines speziellen Enzyms, der Telomerase, weiter synthetisiert wird (Morin, 1989). Die Telomerase ist

eine Reverse Transkriptase, die ein RNA-Molekül (TR) enthält, welches zu dem terminalen Repeat der Chromosomen komplementär ist. Sie bringt also ihre eigene Matrize mit und ist dadurch in der Lage, neue Telomerrepeats an den G-reichen Strang der Chromosomenenden anzuhängen.

In *S. cerevisiae* konnten durch die Untersuchungen von *ever shorter telomeres (est)*-Mutanten vier Proteine identifiziert werden, die für die *in vivo* Aktivität der Telomerase benötigt werden (Lundblad und Szostak, 1989; Lendvay et al., 1996). In *est*-Mutanten werden die Telomere stetig kürzer und nach 50-100 Generationen kommt es zum Wachstumsstillstand oder zu Seneszenz der Zellen. Die katalytische Untereinheit der Telomerase (TERT: Telomerase Reverse-Transkriptase) wird durch eines der so gefundenen Gene, *est2*, kodiert.

Die katalytische Untereinheit der Telomerase konnte zwischenzeitlich in vielen verschiedenen Organismen wie *Euplotes*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, Mensch, Maus, *Tetrahymena* und *Oxytrichia* identifiziert werden. Sie zeigt eine starke Konservierung während der Phylogenese (Lingner und Cech, 1996; Lingner et al., 1997a; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997; Bryan et al., 1998; Collins und Ghandi, 1998; Greenberg et al., 1998). Vergleiche in der Aminosäuresequenz zeigen eine Homologie der TERTs zu den Reversen Transkriptasen (RT) verschiedener Retroelemente. Sie enthalten alle sieben für Reverse Transkriptasen typischen Sequenzelemente, 1, 2 und A-E, (Xiong und Eickbush, 1990) und ein telomerasespezifisches Motiv, T. Dabei scheinen die TERTs der Reversen Transkriptase von *non-long terminal repeat* (non-LTR) Retrotransposons am ähnlichsten zu sein (Nakamura et al., 1997). In *in vitro* Versuchen ist alleine diese katalytische Untereinheit und ihr RNA-Template (TR) für die Telomeraseaktivität notwendig (Lingner et al., 1997b; Weinrich et al., 1997; Beattie et al., 1998).

Es ließ sich beobachten, daß nicht alle mehrzelligen Organismen Telomerase zur Verlängerung ihrer Telomere benutzen. Die Chromosomen der Fruchtfliege *Drosophila* besitzen keine kurzen Telomerrepeats. Sie verlängert ihre Telomere durch die Transposition der non-LTR Retrotransposons *HeT-A* und *TART* (Biessmann et al., 1990; Levis et al., 1993), also den Retroelementen, deren RT der Telomerase sehr ähnlich ist. Dies ist allerdings kein genereller Mechanismus bei Insekten, da in einer Reihe von anderen Arten, Chromosomen mit Telomerrepeats und Telomeraseaktivität nachgewiesen werden konnten (Okazaki et al., 1993; Sasaki et al., 2000).

Neben den TERT-Proteinen sind noch eine ganze Reihe von anderen Proteinen identifiziert worden, die entweder direkt an die Telomer-DNA binden oder mit diesen komplexiert sind. Als erstes Telomerase-assoziiertes Protein in Säugetieren wurde TP1/TLP1/TEP1 durch Sequen-

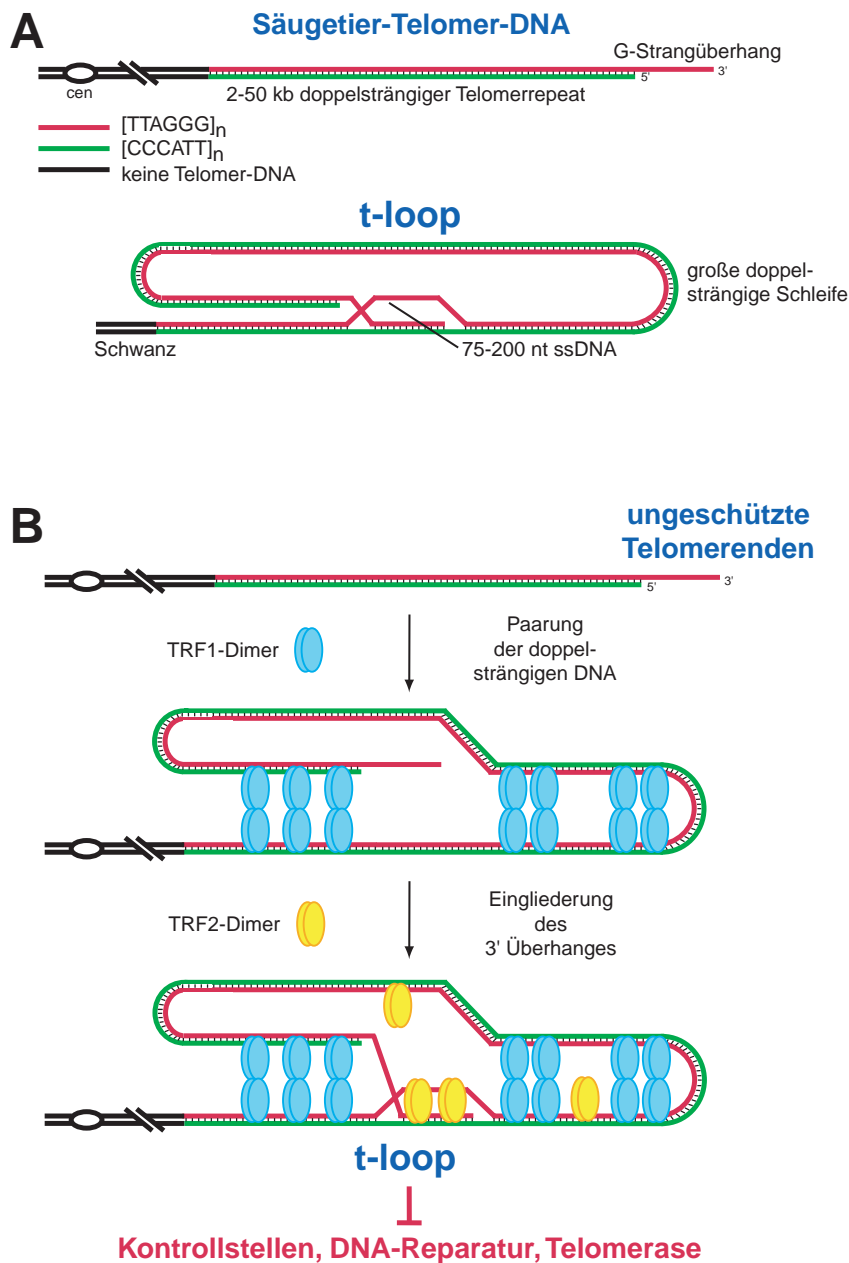
zhomologien zu p80 von *Tetrahymena* gefunden (Harrington et al., 1997a; Nakayama et al., 1997). Die Funktion von TEP1 ist allerdings unklar. TEP1 ist in der Lage, an die RNA-Einheit der Telomerase, hTR (Feng et al., 1995), und hTERT zu binden, ist aber für die Funktion der Telomerase *in vitro* nicht essentiell (Weinrich et al., 1997; Beattie et al., 1998).

Bisher konnten zwei Telomerrepeat bindende Faktoren, TRF1 und TRF2, identifiziert werden (Zhong et al., 1992; Chong et al., 1995; Bilaud et al., 1997). Beide Proteine enthalten ein Myb-Motiv mit dem Namen *telobox*, welches für die Erkennung des Telomerrepeats notwendig ist, und binden als Homodimer an den doppelsträngigen Anteil des Telomerrepeats (Broccoli et al., 1997). Sowohl TRF1 als auch TRF2 sind für die Kontrolle der Telomerlänge zuständig.

Eine Überexpression von TRF1 führt zu einer Verkürzung der Telomere um etwa 10 bp pro Zellverdopplung (van Steensel und deLange, 1997). Die Expression eines dominant negativen Allels von TRF1, welches das endogene TRF1 von den Telomeren verdrängt, führt dagegen zu einer Verlängerung des Telomerrepeats.

Die Überexpression von TRF2 führt ebenfalls zu einer Verkürzung des Telomerrepeats (Smogorzewska et al., 2000). Zellen, die ein dominant negatives Allel von TRF2 exprimieren, gehen allerdings in eine p53-abhängige Apoptose (Karlseder et al., 1999) und Telomere ohne TRF2 verlieren ihren 3'-Überhang und neigen zu Fusionen (van Steensel, 1998). TRF2 scheint somit eine wichtige Rolle bei der strukturellen Organisation der Chromosomenenden zu spielen.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Telomere von Säugetieren in einer Schlaufe enden (Griffith et al., 1999). Dazu wurden etwa 5 kb lange lineare DNA-Fragmente, die einen etwa 2 kb langen Telomerrepeat enthielten und einen 150-200 bp langen 3'-Überhang des G-reichen Stranges aufwiesen, mit rekombinantem, menschlichen TRF2 inkubiert. Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte, daß sich lassoartige Moleküle, die *t-loops* (Telomerschleifen) genannt werden, gebildet hatten (Abbildung 1), an deren Schleifen-Schwanz-Übergang in allen Fällen ein großer TRF2-Proteinkomplex vorhanden war (der Ausdruck "Schwanz" wird für die doppelsträngige DNA verwendet, die sich an den zirkulären Anteil des DNA-Moleküles anschließt). Eine ähnliche Struktur der DNA konnte auch an Telomeren aus Zellen beobachtet werden, deren Kerne zuvor mit Psoralen/UV (*crosslinking*) behandelt wurden (Griffith et al., 1999). Sowohl der Schwanz, wie auch die Schleife der Fragmente bestehen aus doppelsträngiger DNA. Der einzelsträngige 3'-Überhang hat sich am Schleifen-Schwanz-Übergang an die DNA angelagert.



**Abbildung 1: Modell der Struktur, Bildung und Funktion des t-loops**

(A) Die DNA-Struktur an den Enden von Säugetierchromosomen und die Beschreibung der vorgeschlagenen Struktur des *t-loops*.

(B) Die spekulative Rolle der beiden telomerbindenden Proteine TRF1 und TRF2 bei der *t-loop*-Bildung: TRF1-Dimere helfen beim Aneinanderlagern der doppelsträngigen Telomerrepeats. Die TRF2-Dimere sind gehäuft am Schleifen-Schwanz-Übergang des *t-loops* nachweisbar, was auf eine potentielle Rolle bei der Stabilisierung dieser Konformation hinweist.

*t-loops* könnten auf diese Weise die Chromosomenenden vor DNA-Reparaturenzymen, Telomerase und Kontrollstellen für DNA-Schädigungen abschirmen. (nach Griffith et al., 1999)

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Interesse, wonach TRF1 in der Lage ist, die DNA-Doppelhelix zu knicken (Bianchi et al., 1997) und *in vitro* Telomerrepeats aneinander zu lagern (Griffith et al., 1998). Die Bildung eines *t-loops* ist ein möglicher Mechanismus, um die natürlichen, linearen Enden der Chromosomen vor DNA-Reparaturenzymen, Telomerase und den Kontrollstellen für DNA-Schädigungen (p53) abzuschirmen (Griffith et al., 1999).

Die Bindung von TRF1 an telomere DNA kann durch das Enzym Tankyrase (*TRF1-interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase*) inhibiert werden (Smith et al., 1998). Tankyrase hat eine Homologie zu Ankyrinen und zur katalytischen Domäne von Poly(ADP-Ribose)Poly-

merase (PARP). Eine Colokalisation von Tankyrase und TRF1 an Telomeren von Metaphasechromosomen konnte beobachtet werden (Smith et al., 1998). Die ADP-Ribosylierung von TRF1 durch Tankyrase inhibiert die Bindung von TRF1 an ein doppelsträngiges [TTAGGG]<sub>12</sub>-Oligonukleotid *in vitro*. Daher ist Tankyrase ein potentieller Regulator der *t loop*-Bildung oder -Aufrechterhaltung an Chromosomenenden (Griffith et al., 1999).

Als ein weiterer Interaktionspartner von TRF1 wurde TIN2 identifiziert (Kim et al., 1999). TIN2 interagiert mit TRF1 in der Nähe von dessen Homodimerisationsdomäne, und eine Colokalisation der beiden Proteine in Zellkernen und Metaphasechromosomen konnte gezeigt werden. TIN2 hat zusammen mit TRF1 eine negative regulatorische Wirkung auf die Aktivität der Telomerase, denn die Expression von dominant negativem TIN2 führt zu einer Verlängerung der Telomerrepeats. Der Mechanismus dieser Regulation ist allerdings noch unklar: TIN2 und auch das dominant negative TIN2 binden selbst nicht an DNA und beeinflussen auch nicht die Bindung von TRF1 an die Telomer-DNA. TIN2 hat *in vitro* weder einen direkten Effekt auf die Telomerase, noch interagiert es direkt mit der katalytischen Untereinheit (Kim et al., 1999).

Als ein weiterer Regulator der Telomeraseaktivität wurde hRap1 identifiziert (Li et al., 2000). Das Protein hRap1 interagiert mit TRF2, bindet aber selbst nicht an Telomer-DNA. Eine Colokalisation von TRF2 und hRap1 an Telomeren von Metaphasechromosomen konnte gezeigt werden. Wird die Bindung von TRF2 an die Telomerrepeats durch die Expression einer dominant negativen Mutante von TRF2 effizient unterdrückt, kann auch keine Lokalisation von hRap1 an Telomere mehr beobachtet werden. Das humane Rap1 hat eine signifikante Sequenzübereinstimmung (24%-25%) mit scRap1p in drei unterschiedlichen Domänen. Das Rap1p-Protein der Hefe ist aber im Gegensatz zu hRap1 in der Lage, selbständig DNA als Homodimer zu binden (Buchman et al., 1988; Klein et al., 1992). Das Hefe Rap1 ist, ebenso wie TRF1 und TRF2 des Menschen, ein negativer Regulator der Telomerlänge (Kyrion et al., 1992; Marcand et al., 1997). Funktionell ist er also den TRF-Proteinen der Vertebraten ähnlich, hat aber keine Sequenzhomologie zu ihnen. Aufgrund der Sequenzübereinstimmungen und der Ähnlichkeit in ihrer Funktion ist es wahrscheinlich, daß hRap1 des Menschen und scRap1p der Hefe orthologe Proteine sind (Li et al., 2000)

Das erste telomerbindende Protein welches isoliert wurde, war das *telomere end-binding protein* (TEBP) des Ciliaten *Oxytrichia nova* (Gottschling et al., 1986; Price und Cech, 1987). *Oxytrichia* enthält etwa  $5 \times 10^7$  Minichromosomen, deren Telomere in einem Repeat aus 36 Nukleotiden mit der Sequenz G<sub>4</sub>T<sub>4</sub> enden. Die ersten 16 Nukleotide bilden dabei einen einzel-

strängigen 3'G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>-Überhang. TEBP erkennt spezifisch den 3'-Überhang und bildet einen sehr stabilen Protein-DNA-Komplex, der die DNA vor dem Abbau durch Nukleasen schützt (Fang und Cech, 1993; Horvath et al., 1998; Price, 1999). Proteine anderer Organismen, wie die Proteine Cdc13p (Lin und Zakian, 1996; Nugent et al., 1996) und Est1p (Virta-Pearlman et al., 1996) aus *S. cerevisiae* oder hnRNP A1 (LaBranche et al. 1998) des Menschen, sind zwar auch in der Lage, spezifisch einzelsträngige Telomer-DNA zu binden, zeigen aber keinerlei Homologie in der Aminosäuresequenz zu den TEBPs der Ciliaten.

Die heterogenen Kern Ribonukleoproteine A1 (hnRNP A1) und D (hnRNP D) binden *in vitro* spezifisch an einzelsträngige Telomerrepeat-DNA (LaBranche et al., 1998, Ding et al., 1999, Eversole et al., 2000). Das hnRNP A1, welches auch beim alternativen *splicing* eine Rolle spielt, scheint bei der Regulation der Telomerlänge involviert zu sein (LaBranche et al., 1998); Mauszellen die keine hnRNP A1 exprimieren können, haben kurze Telomere. Wird hnRNP A1 in den gleichen Zellen stabil exprimiert, führt dies zu einer Verlängerung der Telomere. Die Bindung von hnRNP A1 und einem Fragment des gleichen Proteins (UP1) an ein Telomeroligonukleotid [TTAGGG]<sub>10</sub> schützt die DNA in *in vitro*-Experimenten vor dem Abbau durch DNase I und *E. coli* 3'Exonuklease I. Die spezifische Bindung von UP1 verhindert außerdem die Replikation des Telomeroligonukleotids durch die DNA-Polymerase  $\alpha$ /Primase (Dallaire et al., 2000). Daher könnte hnRNP A1 beim Schutz des 3'-Überhanges des G-reichen Stranges der Telomere und bei der Regulation der Telomerreplikation *in vivo* eine Rolle spielen. Das heterogene Kern Ribonukleoprotein D bindet *in vitro* neben dem einzelsträngigen Telomerrepeat auch spezifisch Telomerase, was ein Hinweis auf eine potentielle Funktion des Proteins bei der Bindung der Telomerase an den 3' Überhang impliziert (Eversole et al., 2000).

Auch wenn sicherlich noch nicht alle Proteine, die an der Bildung und Aufrechterhaltung der Telomere beteiligt sind, identifiziert wurden und die komplette Funktion der einzelnen telomerbindenden Proteine nicht gänzlich geklärt ist, so steht die Wichtigkeit der Telomere für die Entwicklung von höheren Organismen steht schon jetzt außer Frage. Neben der Aufgabe als Schutz für die Chromosomenenden werden die Telomere, bzw. das Enzym Telomerase immer wieder in Zusammenhang mit Seneszenz (Harley et al., 1990; Hastie et al. 1990), Immortalisierung und Entartung von eukaryontischen Zellen gebracht (Greider, 1998; de Lange und DePinho, 1999; Hahn et al., 1999).

## 1.3 Replikationsursprünge

Die Replikation der DNA ist ein zentraler Mechanismus, der es Zellen aller Lebewesen ermöglicht, sich ohne DNA- und damit Informationsverlust identisch zu reduplizieren. Die DNA-Replikation wird durch DNA-Polymerasen durchgeführt, die häufig aus mehreren Proteinuntereinheiten bestehen. Aber auch nicht der Polymerase zugehörige Proteine sowie zelluläre Strukturen werden benötigt, um diese Aufgabe adäquat durchzuführen.

Zur Initiation der Replikation werden zudem bei den meisten, möglicherweise sogar allen Organismen, spezielle Sequenzen der DNA benötigt, an denen die Replikation beginnen kann (Replikationsursprung). Die Existenz einer speziellen Sequenz zur Initiation in mehrzelligen Organismen wird allerdings kontrovers diskutiert (Stillman, 1994; Aladjem et al., 1998). Wie bei den Promotoren der Transkription machen die Replikationsursprünge den Initiationsprozess effizienter, in dem sie alle benötigten Proteine an einer bestimmten Stelle zusammenführen und damit ihre Interaktion erleichtern. Diese Initiationsstellen müssen im ganzen Genom gleichmäßig verteilt sein, um die gesamte DNA einer Zelle innerhalb eines bestimmten Zeitraums replizieren zu können (Coverley und Laskey, 1994).

Der Zellzyklus, die Zeit zwischen zwei Zellteilungen, läßt sich in mehrere Phasen einteilen. Eine dieser Phasen dient vor allem der Replikation der DNA, sie wird daher als Synthese-, oder kurz S-Phase bezeichnet. Während der Entwicklung tierischer Organismen kann die Länge der S-Phase stark variieren. In Embryonen, deren Zellen sich schnell teilen, kann sie nur ein paar Minuten andauern, im erwachsenen, differenzierten, Gewebe aber auch mehrere Stunden. Dieser Zeitunterschied wird nicht durch die Geschwindigkeit bestimmt, in der sich die Replikationsgabel fortbewegt, sondern eher durch die Häufigkeit der Initiation der Replikation (Edenberg und Huberman, 1975; De Pamphilis, 2000).

Das am besten untersuchte eukaryontische DNA-Replikationssystem ist das der Hefe *S. cerevisiae*, in dem die relevanten Proteine durch genetische Mutanten identifiziert wurden. Eine ganze Reihe, wenn auch nicht alle der Proteine, die die Initiation der Replikation in der Hefe einleiten, konnten auch in höheren Organismen wie Fröschen (*Xenopus laevis*), Fliegen (*Drosophila melanogaster*) oder Säugetieren identifiziert werden. Zu ihnen gehören die *origin recognition proteins* (ORC) 1, 2 und 4, Proteine, die durch die Zellzyklus-Gene (Cdc) 6 und 45 kodiert werden, *mini-chromosome maintenance* (Mcm) Proteine 1-6 sowie die Cdc7 Protein-Kinase und ihr Co-faktor Dbf4 (Saha et al., 1998; Hua und Newport, 1998; Dutta und Bell, 1997; Rowles und

Blow, 1997; Sato et al., 1997). Für einige von diesen homologen Proteinen konnte sogar nachgewiesen werden, daß sie für die DNA-Replikation in höheren Organismen notwendig sind (Landis et al., 1997; Rowles und Blow, 1997; Yan et al., 1998; Kumagai et al., 1999).

Obwohl der Mechanismus der DNA-Replikation während der Evolution der Eukaryonten hoch konserviert zu sein scheint, ist der Aufbau von Replikationsursprüngen in mehrzelligen Organismen noch nicht so gut untersucht wie in Hefe. Dies hängt einerseits mit der Größe der Genome von Metazoen zusammen, andererseits damit, daß nicht nur die DNA-Sequenz alleine bestimmt, ob an einer bestimmten Stelle die DNA-Replikation initiiert wird (DePamphilis, 2000). Bisher sind mehrere spezifische Initiationsstellen in Chromosomen von Fliege, Frosch und Säugetieren beschrieben worden. Obwohl alle Daten mit dem Modell der bidirektionalen Replikation mit klassischen Replikationsblasen und -gabeln in Einklang zu bringen sind, ergibt sich eine komplexe und teilweise widersprüchliche Auffassung von Replikationsursprüngen in höheren Organismen. Die Größe des Bereichs, in dem die Replikation beginnt, scheint stark von der Analysemethode (DePamphilis, 1997) abhängig zu sein.

Untersuchungen von Replikationsgabeln mit 2D Gelelektrophoresen lassen eine 4-55 kb große "Initiationszone" vermuten, in der keine besondere Präferenz für eine bestimmte DNA-Sequenz zu erkennen ist. Dagegen läßt sich eine 0,5-2 kb große, spezifische Initiationsstelle, analog der in Hefen, erkennen, wenn der neusynthetisierte DNA-Strang durch den Einbau modifizierter Basen markiert und durch "nascent strand-Analysen" untersucht wird. Durch 2D-Gelanalysen wurde eine 31 kb große intergenische Region in humanen rRNA Genen (Little et al., 1993) und eine 55 kb große Region zwischen dem Hamster *DHFR*- und *2BE2121*-Gen (Dijkwel et al., 1995) entdeckt. Im Gegensatz dazu wurde eine primäre Initiationsstelle in einem 1-6 kb großen DNA-Locus *upstream* des rRNA Genpromotors durch "nascent strand-Analyse" identifiziert, die in allen bisher untersuchten rRNA-Genen von Eukaryonten konserviert ist (Sanchez et al., 1998). Auf ähnliche Art wurde im Hamster Dehydrofolatreduktasegen (*DHFR*) zwei *origins of bidirectional replication* (OBRs) entdeckt, wobei ori- $\beta$ , welches in einer 0,5-3 kb großen Sequenz liegt, aktiver ist als ori- $\gamma$  (Kobayashi et al., 1998). Durch andere Analyseverfahren wurden OBRs in 0,5-2 kb großen DNA-Abschnitten in der Nähe der *cMyc*, *ADA*, *RPS14*,  $\beta$ -*Globin* und *CAD*-Gene von Säugern gefunden (Waltz et al., 1996; Aladjem et al., 1998; Carroll et al., 1993; Tasheva et al., 1994; Kelly et al., 1995). Nur ein Replikationsursprung von Säugern konnte bisher durch 2D-Gelelektrophorese und "nascent strand-Analyse" auf eine kleine 1,7 kb große genomische Region in der Nähe des *GNAI3*-Genes eingegrenzt werden (Toledo et al., 1998).



Unabhängig davon, ob die Replikation von Säugetier-DNA an größeren "Initiationszonen", oder an spezifischen Initiationsstellen (OBRs) beginnt, scheinen in den meisten größeren Abschnitten genomischer DNA Replikationsursprünge vorhanden zu sein (Hand, 1979; Heinzel et al., 1991).

## 1.4 Zentromer und Kinetochor

Jedes Chromosom benötigt genau ein Zentromer, um regelmäßig und in konstanter Zahl in der Mitose auf die Tochterzellen verteilt zu werden. Die Chromosomen wandern dabei mit dem Zentromer voran zu den Spindelpolen. Die Chromosomen der Säugetiere gehören zum Typ der monozentrischen oder monokinetischen Chromosomen, bei denen das Zentromer lichtmikroskopisch in Mitosechromosomenpräparaten nur als primäre Konstriktion, oder als Haftpunkt der ansonsten schon voneinander gelösten Chromatiden zu erkennen ist. In C-gebänderten monozentrischen Chromosomen sieht man regelmäßig eine Bande aus konstitutivem Heterochromatin, in die das Zentromer eingebettet ist. Sie wird in Chromosomen, die keine weiteren C-Banden haben, zur Lokalisation des Zentromers verwendet. Im Elektronenmikroskop läßt sich an der Stelle des Zentromers das Kinetochor erkennen. Die Kinetochore aller Wirbeltiere gehören zum trilaminaren Typ, die aus einer dreilagigen Struktur aus zwei elektronendichten Platten bestehen, die eine elektronendurchlässige Schicht einschließen (Traut et al., 1991).

Die Autoantikörper von Sklerodermie-Patienten mit CREST-Syndrom (Calcinosis, Raynaud-Phänomen, Oesophagus-Dysmotilität, Sklerodaktylie, Telangiectasie) binden an die beiden Kinetochorplatten. Mit Hilfe solcher polyklonalen Anti-Kinetochor-Antikörper wurden die ersten drei Proteine der Kinetochorproteinfamilie CENP-A, CENP-B und CENP-C (CENP, *centromere proteins*) identifiziert (Earnshaw und Rothfield, 1985; Earnshaw and Cooke, 1989). Die Anzahl der identifizierten Proteine, die an normale Zentromere von Säugetieren binden, wächst stetig an und kann, aufgrund ihrer räumlichen Verteilung während des Zellzyklus, grob in zwei Gruppen eingeteilt werden.

Die erste Gruppe ist konstitutiv mit dem Zentromer assoziiert und enthält die Proteine CENP-A, -B und -C, welche strukturelle Aufgaben beim Aufbau des Kinetochors haben (Palmer et al., 1987; Masumoto et al., 1989a; Saitoh et al., 1992) sowie die beiden erst kürzlich gefundenen Proteine CENP-G und -H, deren Funktionen letztendlich noch nicht geklärt sind (He et al., 1998; Sugata et al., 1999).

In die zweite Gruppe fallen die Proteine, die nur zeitweise während des Zellzyklus (meist während später G2 und M-Phase bis Anaphase) mit dem Zentromer assoziiert sind und chromosomale *passenger* Proteine genannt werden (Earnshaw et al., 1991). Diese Gruppe enthält viele unterschiedliche Proteine, welche durch ihre verschiedenen Aufgaben bei der Zellteilung klassifiziert werden können. Einige Proteine sind beispielsweise an der Anheftung an den Spindelapparat und die Ausrichtung der Chromosomen in der Äquatorialebene [CLIP170 (Dujardin et al., 1998), Dynein (Steuer et al., 1990; Pfarr et al., 1990), Dynactin (Echeverri et al., 1996; Huang et al., 1999)], am Metaphase-zu-Anaphase-Übergang [BUB1 (Taylor und McKeon, 1997; Cahill et al., 1998), BUBR1 (Cahill et al., 1998; Chan et al., 1999), BUB3 (Taylor et al., 1998), MAD1 und -2 (Jin et al., 1998; Gorbsky et al., 1998), ZW10 (Starr et al., 1997), ERK (Shapiro et al., 1998), 3F3/2 Epitop (Campbel und Gorbsky, 1995), p55CDC (Kallio et al., 1998), Tsg24 (Jorgensen et al., 1998)], an der Auflösung und Segregation der geteilten Chromatiden oder aber am Zusammenhalt der Schwester-Chromatiden beteiligt. Eine ganze Reihe von Proteine haben anscheinend gleich mehrere Funktionen [INCENP (Mackay et al., 1998; Cutts et al., 1999), CENP-E (Wood et al., 1997), MCAK (Kim et al., 1997; Maney et al., 1998)]. Bei anderen Proteinen konnte zwar die Anheftung an das Kinetochor gezeigt werden, ihre Funktion ist aber bisher nicht bekannt [CENP-F (Liao et al., 1995), M31/HP1 (Wregget et al., 1994; Furuta et al., 1997), M33 (Wang et al., 1997), PcG (Saurin et al., 1998), Topoisomerase II (Warburton et al., 1997; Rattner et al., 1996), SUVAR39H1 (Aagard et al., 1999, Melcher et al., 2000)]. Für die Proteine CENP-A, CENP-E, CENP-F, MCAK, MAD2 und HZW10 konnte gezeigt werden, daß sie nur mit dem aktiven, nicht aber mit dem inaktiven Zentromer in dizentrischen Chromosomen assoziiert sind, was auf einen direkten Zusammenhang dieser Proteine mit der Funktion des Kinetochors hindeutet (Sullivan und Schwarz, 1995; Warburton et al., 1997; Faulkner et al., 1998).

## 1.5 Zentromer-DNA

Mit Ausnahme von punktförmigen Zentromeren der Bäckerhefe und der holozentrischen Chromosomen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, besitzen alle anderen bisher untersuchten Spezies von Pflanzen, Tieren, oder Pilzen große Bereiche von hoch und mittel repetitiven Elementen an der Stelle der primären Konstriktion (Eichler, 1999). Obwohl die spezifischen Details der DNA-Struktur zwischen den einzelnen Spezies erheblich variieren, scheint die molekulare Grundstruktur prinzipiell die gleiche zu sein: Blocks von AT-reichen, tandemartig wiederholten DNA-Sequenzen sind von Bereichen mit Sequenzen verschiedener Klassen von Retroposons unterbrochen (Dong et al., 1998; Cambareri et al., 1998; Sun et al., 1997; Round et al., 1997).

### 1.5.1 Repetitive DNA humaner Zentromere

Der Hauptanteil der menschlichen Zentromer-DNA besteht aus Blöcken tandemartig aufgereihter, repetitiver DNA (Satelliten DNAs). Davon besteht wiederum der größte Teil aus  $\alpha$ -Satelliten. Die  $\alpha$ -Satelliten sind meist in große Bereiche mit homogener Sequenzzusammensetzung gegliedert, die durch andere Sequenzen, die häufig wieder repetitiver Natur sind, unterbrochen werden. Zusätzlich zu den Satelliten-DNAs wurden noch andere hochrepetitive DNA-Familien im Bereich des Zentromers identifiziert, die auch in anderen Chromosomenabschnitten zu finden sind.

#### 1.5.1.1 Klassische Satelliten-DNA

Die erste humane DNA, die auch im Zentromer nachgewiesen werden konnte, wurde aus drei genomischen DNA Fraktionen mit leicht unterschiedlicher Dichte im  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ - oder  $\text{CsCl}$ -Gradienten gewonnen (Corneo et al., 1967, 1968, 1970, 1971). Diese DNA Fraktionen werden klassisch Dichte-Satelliten I ( $1,687 \text{ g/cm}^3$ ), II ( $1,693 \text{ g/cm}^3$ ) und III ( $1,696 \text{ g/cm}^3$ ) genannt. Aus diesen heterogenen DNA-Fraktionen konnten die dominanten Sequenzanteile identifiziert werden (Prosser et al., 1986). Die DNA-Familien werden analog zu den DNA-Fraktionen Satelliten-Familie 1, 2 und 3 genannt. Familie 1 besteht aus 42 bp langen Repeats aus zwei alternierenden 17 bp ( $\text{ACATAAAATAT}_G^C\text{AAAGT}$ ) und 25 bp ( $\text{ACCCAAAAT}_G^A\text{T}_G^A\text{TATTATATACTGT}$ ) Repeatuntereinheiten. Satelliten-Familie 2 ist ein schwach konservierter 5 bp ATTCC Repeat und Familie 3 ist ein ATTCC-Pentamer, daß gelegentlich durch die 10 bp-Sequenz ( $\text{A}_G^T\text{TCGGGTTG}$ ) unterbrochen wird. Alle 3 verschiedenen Satelliten Familien sind

auch, aber nicht ausschließlich, in perizentromerischen Regionen von verschiedenen menschlichen Chromosomen zu finden (Lee et al., 1997). Von Grady et al. (1992) wird behauptet, daß sich Satellit-3-ähnliche, pentamere Repeats in den Zentromerregionen aller menschlicher Chromosomen finden lassen. Einwandfrei konnte die Existenz von Satellit 3-DNA allerdings nur in der näheren Umgebung von  $\alpha$ -Satelliten auf Chromosom 10 (Jackson et al., 1992, 1993), 13, 14, 15, 21 und Y geklärt werden (Jabs et al., 1989; Vissel et al., 1992; Trowell et al., 1993; Cooper et al., 1993).

### 1.5.1.2 Alphasatelliten- (alrhoide) DNA

Alphasatelliten-DNA wurde ursprünglich als hochrepetitive DNA-Fraktion (Komponente  $\alpha$ ) aus dem Genom der afrikanischen grünen Meerkatze (AGM), *Cercopithecus aethiops*, isoliert (Maio et al., 1971). Es stellte sich heraus, daß diese Komponente  $\alpha$  hauptsächlich aus etwa 170 bp Repeatuntereinheiten besteht (Gruss und Sauer, 1975). In unklonierten, *EcoRI* geschnittenen DNA-Fragmenten humaner genomischer DNA konnte die homologe Sequenz des Menschen identifiziert werden (Manuelidis und Wu, 1978). Sie zeigt eine 70-80 prozentige Sequenzhomologie zur AGM  $\alpha$ -Satellitenkonsensussequenz (Rosenberg et al., 1978). Die Konsensussequenzen der menschlichen  $\alpha$ -Satelliten wurden aus 130 voneinander unabhängigen Monomeren von 14 nichthomologen Chromosomen (Willard und Wayne, 1987a) und aus 293 voneinander unabhängigen Monomeren aller 24 humanen Chromosomen ermittelt (Choo et al., 1991).

Die  $\alpha$ -Satelliten-DNA ist die erste und bisher einzige Satelliten-DNA Familie die zweifelsfrei in den Zentromeren aller menschlicher Chromosomen nachgewiesen wurde (Manuelidis, 1978). Die einzelnen Repeats sind häufig in große Bereiche, die eine Struktur höherer Ordnung aufweisen (*higher-order-repeat* [HOR]) organisiert (Willard und Wayne, 1987b). Voneinander unabhängige 171 bp Monomere der  $\alpha$ -Satelliten zeigen eine intermonomerische Sequenzabweichung von 20%-40%. Die meisten Monomere sind aber zu Einheiten chromosomenspezifischer HORs organisiert. Zusammengehörige chromosomenspezifische HORs weisen hingegen nur etwa 5% Sequenzabweichungen auf.

Die Sequenzähnlichkeiten der Monomere zwischen einzelnen Chromosomen lassen es naheliegen, daß alle menschlichen  $\alpha$ -Satelliten aus zwei oder drei fundamental unterschiedlichen Vorläufer-Monomeren entstanden sind, die sich durch Sequenzveränderungen auseinander entwickelt haben und heute 12 verschiedene Monomertypen bilden (Tabelle 1). Diese Monomertypen wurden dann umorganisiert, um 5 alrhoide "suprachromosomale Familien" zu bilden, die sich deutlich voneinander abgrenzen (Tabelle 1)(Alexandrov et al., 1988, 1991, 1992; Romanova et al., 1996).

Suprachromosomale Familie	Chromosomen	Monomertypen	Monomertyp Aufbau
1	1, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 16, 19	J-Typ	...-J1-J2-... (Dimer)
2	2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 18, 20, 21, 22	D-Typ	...-D1-D2-... (Dimer)
3	1, 11, 17, X	W-Typ	...-W1-W2-W3-W4-W5-... (Pentamer)
4	13, 14, 15, 21, 22, Y	M-Typ	...-M1-... (Monomer)
5	5, 7, 13, 14, 19, 21	R-Typ	...-R1-R2-... (Dimer)

**Tabelle 1:  $\alpha$ -Satelliten Aufbau**

Definition von 5 verschiedenen alphoiden suprachromosomalen Repeatfamilien (aus Lee et al., 1997)

Bis auf wenige bisher gefundene Ausnahmen (Wevrick et al., 1992; Cooper et al., 1993; Bayne et al., 1994) sind  $\alpha$ -Satelliten Monomere unidirektional hintereinander angeordnet und bilden so größere DNA-Abschnitte, die in ihrer Größe zwischen homologen und nicht homologen Chromosomen teilweise erheblich variieren. Jedes Chromosom enthält wahrscheinlich ein prädominanten, anscheinend ununterbrochenen  $\alpha$ -Satelliten-DNA-Bereich, der zwischen 250 kb auf dem Y-Chromosom (Cooper et al., 1993; Larin et al., 1994) und 5000 kb auf dem Chromosom 11 groß ist (Wevrick und Willard, 1989). Proteinbindungsstudien haben gezeigt, daß einige nukleäre Proteine an  $\alpha$ -Satelliten-DNA binden. Das bisher am besten charakterisierte ist CENP-B (Abschnitt 1. 4). Es bindet spezifisch an ein 17 bp langes Sequenzmotiv (CTTCGTTGGAAACGGGA), das CENP-B *box* genannt wird (Masumoto et al., 1989a; Kipling und Warburton, 1997). *CENP-B boxes* finden sich in einigen menschlichen  $\alpha$ -Satelliten und in der *minor*-Satelliten-DNA der Maus (Wong und Rattner, 1988).

### 1.5.1.3 Die Beta- und Gammasatelliten-DNA-Familien

Die menschliche SAU3A-DNA-Familie wurde ursprünglich von Meneveri et al. (1985) gefunden und wurde später als  $\beta$ -Satelliten-DNA bezeichnet (Waye und Willard, 1989a). Sie besteht aus tandemartig angeordneten, GC-reichen, 68 bp Monomeren. Betasatelitten konnten durch *in-situ*-Hybridisierung auf den perizentromeren Regionen von Chromosom 1, 3, 9 und Y sowie auf den akrozentrischen Chromosomen identifiziert werden (Agresti et al., 1987, 1989; Waye und Willard, 1989a; Greig und Willard, 1992; Cooper et al., 1992; Meneveri et al., 1993).

Gammasatelliten-DNA wurde aus einem Chromosom-8-spezifischen Cosmidklon als ein tandemartig angeordneter, 220 bp Repeat isoliert (Lin et al., 1993). Später wurde eine zweite

Subfamilie identifiziert, die aus dem Zentromer von Chromosom X stammt (Lee et al., 1995). Die Konsensussequenzen beider gefundenen Gammasatelliten haben eine 62 prozentige Sequenzhomologie und auf beiden Chromosomen sind schätzungsweise 0.5 Mb der chromosomenspezifischen  $\gamma$ -Satelliten-DNA zu finden.

#### 1.5.1.4 Andere repetitive DNA-Sequenzen

In den Zentromerregionen einiger Chromosomen wurden noch eine ganze Reihe anderer repetitiver DNA-Elemente identifiziert, die mit den anderen hier besprochenen Satelliten-DNAs in einer Tabelle zusammengefaßt sind:

Repeatfamilie	Chromosom
Satellit 1	3, 4, 13, 14, 15, 21, 22
Satellit 2	2, 10
Satellit 3	10, 13, 14, 15, 21, Y, alle? (Grady et al., 1992)
Satellit C	9, 13, 14, 15, 21, 22
$\alpha$ -Satelliten	alle
$\beta$ -Satelliten	3, 9, Y (13, 14, 15, 21, 22)
$\gamma$ -Satelliten	8, X
48 bp-Satelliten	21, 22, Y, 2 (13, 14, 15)
Sn5-Satelliten	2, 20, 13, 14, 15, 21, 22
SINEs / LINEs	überall, unterrepräsentiert in Zentromeren
724 Sequenzfamilie	(13, 14, 15, 21, 22)
lange Sau DNA-Familie (LSau)	1, 3, 9
AT-reiche DNA-Sequenz	7, 1, 2, 9, 16, 17
zentromerische, repetitive Elemente von Chromosom Y	Y, # (Cooper et al., 1993)
chAB4 Multisequenzfamilie	1, 3, 4, 9, Y, 13, 14, 15, 21, 22

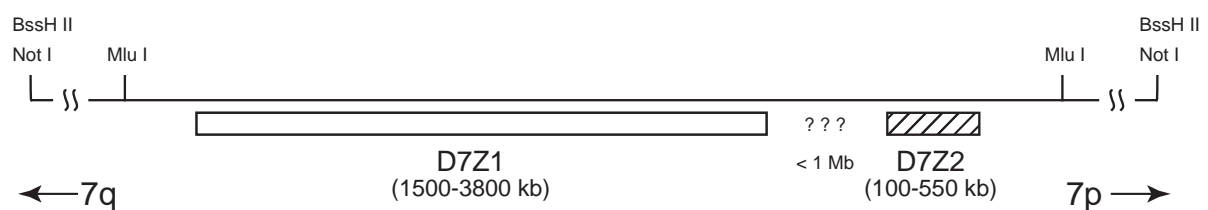
#### **Tabelle 2: Repeatfamilien in menschlichen Zentromerregionen**

Die Tabelle ist eine Zusammenfassung der in Lee et al.(1997) aufgeführten Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen. Chromosomenzahlen in Klammern weisen auf widersprüchlich Ergebnisse, die meist die Lokalisation der Repeats auf akrozentrischen Chromosomen betreffen, oder auf Hybridisierungsergebnisse mit niedriger Stringenz hin. #: Die Existenz der Repeats auf anderen als den aufgeführten Chromosomen wird von einzelnen Experimentatoren aufgrund indirekter Hinweise vermutet.

## 1.5.2 Das Zentromer von Chromosom 7

Die Zentromerregion von Chromosom 7 enthält zwei abgegrenzte  $\alpha$ -Satellitenbereiche (Jorgensen et al., 1986; Wayne et al., 1987). D7Z1 besteht aus mehreren sechs Monomer HORs, die selbst noch einmal tandemartig aufgereiht sind und ein durchschnittlich 2580 kb großes Gebiet bilden. Die Größe dieses  $\alpha$ -Satellitenbereiches variiert zwischen den verschiedenen Kopien von Chromosom 7 in einem Bereich von 1530-3810 kb, der durch Pulsfeldgelelektrophorese ermittelt wurde (Wevrick und Willard, 1989). D7Z2 gehört zu den kleinsten  $\alpha$ -Satellitenregionen, mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 265 kb (110-550 kb). Aus beiden  $\alpha$ -Satellitenbereichen existieren aus Phagen klonierte DNA-Subklone, die als DNA-Sonden zur physikalischen Kartierung verwendet wurden: Die D7Z2 spezifische Probe pMGB7 und die beiden D7Z1 spezifischen  $\alpha$ -Satellitenproben p $\alpha$ 7d1 und p $\alpha$ 7t1 (Wayne et al., 1987).

Von Wevrick und Willard (1991) wurde durch Pulsfeldgelelektrophorese die Anordnung der beiden  $\alpha$ -Satellitenregionen zueinander aufgeklärt. Dazu wurden von ihnen hochmolekulare DNA der beiden somatischen Mensch-Nagetier-Hybriden A50-1Acl3A (Wayne et al., 1987) und KO15 (Rommens et al., 1988), die nur eine Kopie des menschlichen Chromosoms 7 enthalten, mehrere Restriktionsendonukleasen und die oben beschriebenen  $\alpha$ -Satellitensonden verwendet. Aus den beiden zellinienspezifischen Restriktionskarten und den Ergebnissen aus früheren Untersuchungen (Wevrick und Willard, 1989) wurde ein Konsensuskarte der Zentromerregion von Chromosom 7 erstellt (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Konsensuskarte der Zentromerregion von Chromosom 7**  
nach Wevrick und Willard (1991)

Aufgrund starker Polymorphismen sowohl der Restriktionsschnittstellen, wie auch der Größe der  $\alpha$ -Satelliten (Wevrick und Willard, 1989, 1991) ist diese Karte nur eine grobe Abschätzung der tatsächlichen Größenverhältnisse im Zentromer anderer Chromosom 7 Kopien. Der Abstand zwischen den beiden  $\alpha$ -Satellitenregionen konnte von den Autoren nur grob geschätzt werden, ist aber kleiner als 1 Mb. Die Basenzusammensetzung dieser Region ist bisher unbekannt. Aufgrund mehrerer Restriktionsschnittstellen in diesem Bereich scheint es sich aber nicht

um einen höher organisierten Bereich anderer Satelliten-DNAs zu handeln. Die Orientierung der Karte (Abbildung 2) im Chromosom konnte durch zwei-Farben-*in-situ*-Hybridisierung abgeleitet werden (Wevrick und Willard, 1991) und wurde durch FISH und Elektronenmikroskop-*in-situ*-Hybridisierung (EMISH) an Metaphasechromosomen anderer Zelllinien bestätigt (Haaf und Ward, 1994; Fetni et al., 1997). Innerhalb des Zentromers von Chromosom 7 konnten noch andere repetitive Elemente L1, Alu und AT-reiche Sequenzen identifiziert werden (Wevrick et al., 1992). Diese Repeatsequenzen wurden in vier verschiedenen Phagen identifiziert, die zusätzlich noch Anteile von  $\alpha$ -Satelliten enthalten und zusammen mit D7Z1 und D7Z2 auf einem 3,3 Mb großen Restriktionsfragment liegen. In zwei dieser Phagen konnte zudem eine bis dahin noch nicht beobachtete *head to head*-Orientierung von  $\alpha$ -Satellitenmonomeren, im Gegensatz zur zuvor beschriebenen *head to tail*-Orientierung (Tyler-Smith und Brown, 1987; Waye et al., 1987), nachgewiesen werden (Wevrick et al., 1992). Es scheint daher wahrscheinlich, daß in den Randregionen der größeren  $\alpha$ -Satellitenblöcke  $\alpha$ -Satelliten sich mit anderen repetitiven Sequenzen mischen (Wevrick et al., 1992; Jackson et al., 1999).

### 1.5.3 Alphasatelliten und Neozentromere

Alphasatelliten-DNA ist die einzige Satelliten-DNA, die bisher in den Zentromeren aller menschlicher Chromosomen nachgewiesen werden konnte (Manuelidis, 1978). Durch *in-situ*-Hybridisierung mit hoher Auflösung läßt sich zeigen, daß alle  $\alpha$ -Satelliten sich an der Stelle der primären Konstriktion befinden (Willard, 1990). Durch die Verwendung von Methoden, um die  $\alpha$ -Satellitensequenzen und CENP-Antigene gleichzeitig auf dem selben Präparat nachzuweisen, konnte gezeigt werden, daß  $\alpha$ -Satelliten während des gesamten Zellzyklus mit Zentromerproteinen assoziiert sind (Masumoto et al., 1989b). Unterschiede in der Intensität von CENP-Färbungen zwischen den Zentromeren sind auf die Unterschiede im Gehalt an  $\alpha$ -Satelliten-DNA zurückzuführen (Peretti et al., 1986). Eines der zentromerbindenden Proteine CENP-B bindet *in vitro* und *in vivo* spezifisch an die *CENP-B box*, die in einer Reihe von  $\alpha$ -Satelliten und den Maus Minorsatelliten gefunden wurde (Masumoto et al., 1989a; Wong und Rattner, 1988). Das Zusammentreffen von primärer Konstriktion, Kinetochorproteinen und  $\alpha$ -Satelliten ließen Willard (1990) vermuten, daß  $\alpha$ -Satelliten in die Struktur und/oder Funktion von Zentromeren bei Primaten involviert sind. Die Übereinstimmung in der Grundstruktur der meisten bisher untersuchten eukaryontischen Zentromere (Abschnitt 1. 5) scheint diese These zusätzlich zu stützen. In den letzten zehn Jahren sind eine Vielzahl von Beobachtungen und Experimenten gemacht worden, die für oder gegen diese Hypothese sprechen.



Eines der wichtigsten Experimente, die für die Hypothese sprechen, wurde von Haff et al. (1992) durchgeführt. Dazu wurde menschliche  $\alpha$ -Satelliten-DNA in COS7-Zellen (der afrikanischen grünen Meerkatze) durch die  $\text{CaPO}_4$ -Methode transfiziert. An den Stellen, an denen  $\alpha$ -Satelliten-DNA in die endogenen Chromosomen integriert ist, konnte die Bindung von Zentromerproteinen durch CREST-Autoimmunsera nachgewiesen werden. Chromosomen, die sowohl das endogene AGM-Zentromer wie auch humane  $\alpha$ -Satelliten enthielten, zeigten häufig Brücken zwischen den separierenden Schwesterchromatiden in der Anaphase sowie eine höhere Anzahl isolierter Chromosomen in der Metaphase. Die Integration großer Mengen humaner  $\alpha$ -Satelliten in die Chromosomen der AGM führt anscheinend zu einer Störung der normalen Chromosomensegregation in der Mitose. Diese Beobachtungen wurden nicht gemacht, wenn die Chromosomen nur  $\alpha$ -Satelliten des Menschen und kein AGM-Zentromer enthielten (Haff et al., 1992).

Durch das Einbringen von zentromeren  $\alpha$ -Satelliten, Telomerrepeats und genomischer DNA in humane HT1080-Zellen konnten die ersten *de novo* MACs (Abschnitt 1. 6) erzeugt werden (Harrington et al., 1997b; Ikeno et al., 1998; Henning et al., 1999). Bei diesen Experimenten wurden in den neu erzeugten Chromosomen keine anderen als die transfizierten  $\alpha$ -Satelliten beobachtet. Allerdings waren die erzeugten Chromosomen alle wesentlich größer als die in die Zelle transfizierten Vorläufermoleküle. Das heißt, daß alle Chromosomen durch Rekombination vieler Einzelmoleküle entstanden sind, so daß die Integration kurzer unbekannter Sequenzen (mit Zentromeraktivität) in die neugebildeten Chromosomen nicht ausgeschlossen werden kann (Murphy und Karpen, 1998).

Eine weitere Beobachtung spricht für die oben beschriebene Hypothese. CENP-A ist ein Histon H3 ähnliches Protein, welches in den Nukleosomen der Zentromerregion vorkommt. Nukleosomen die CENP-A anstelle von H3 enthalten, scheinen eine erhöhte Affinität zu Satelliten-DNA zu haben (Vafa und Sullivan, 1997; Shelby et al., 1996). Dabei ist weniger die spezifische Sequenz, als der regelmäßige Aufbau der DNA, der zu einer regelmäßigen Chromatinstruktur führt, ausschlaggebend.

Eine ganze Reihe von Versuchen sprechen allerdings auch gegen diese Hypothese. So ist die Rolle von CENP-B als  $\alpha$ -satellitenbindendes Protein überschätzt worden. Es hat sich gezeigt, daß beispielsweise das Zentromer des humanen Y-Chromosoms keine CENP-B *boxes* aufweist und auch kein CENP-B-Protein bindet (Pluta et al., 1995). CENP-B bindet zudem sowohl an aktive als auch an inaktive Zentromere in stabilen dizentrischen Chromosomen. CENP-A,

CENP-C und CENP-E sind hingegen nur an aktiven Zentromeren zu beobachten (Sullivan und Schwartz, 1995; Warburton et al., 1997). Alle drei bisher beschriebenen CENP-B *knockout*-Mutanten der Maus haben zudem keinen auffälligen Phänotyp (Hudson et al., 1998; Perez-Castro et al., 1998; Kapoor et al., 1998).

Neozentromere sind eine Klasse von Zentromeren, die in mitotisch stabilen rearrangierten Chromosomen vorkommen, die sich von ihren endogenen Zentromeren gelöst haben. Ihre Analyse hat gezeigt, daß sie keine nachweisbare  $\alpha$ -Satelliten-DNA enthalten. Neozentromere bilden voll funktionstüchtige Kinetochore, was durch die mitotische Stabilität der rearrangierten Chromosomen und die Bindung von CENP-C, -E (Depinet et al., 1997) und CENP-A (Warburton et al., 1997) nachgewiesen werden konnte. Ein Derivatvchromosom des menschlichen Y-Chromosoms, welches ein Neozentromer enthält, wurde sogar über drei Generationen stabil an die Nachkommen weitergegeben (Tyler-Smith et al., 1999). Die Sequenzanalyse eines 80 kb großen Neozentromers in der Region 10q25, welches sich nicht von der eines normalen Chromosoms 10q25 unterscheidet, hat gezeigt, daß es keine  $\alpha$ -Satelliten-DNA enthält (Barry et al., 1999). Daher scheinen  $\alpha$ -Satelliten für die Formierung von Zentromeren nicht zwingend notwendig zu sein (Voullaire et al., 1993; Brown und Tyler-Smith, 1995; Depinet et al., 1997; Choo, 1997; du Sart et al., 1997).

Die Untersuchungen von normalen Zentromeren, und Neozentromeren spricht für die Existenz von nicht sequenzdeterminierten, epigenetischen Faktoren, die bei der Markierung der Stelle, an der das Kinetochor gebildet wird, beteiligt sind. Als Faktoren kommen eine spezielle Chromatinstruktur, chemische Modifikationen, oder Zeitunterschiede bei der Replikation der DNA in Frage (Karpen und Allshire, 1997; Wiens und Sorger, 1998; Murphy und Karpen, 1998; Choo, 1998). Das Heterochromatin der Zentromere enthält nicht nur das Histon-H3-ähnliche CENP-A, sondern die N-terminalen Lysinreste von Histon H3 und H4 sind im Vergleich zu anderen genomischen Regionen hypoacetyliert (Jeppesen und Turner, 1993; O'Neill und Turner, 1995). Über den genauen Zeitpunkt der Replikation der Zentromer-DNA gibt es jedoch keine einheitlichen Ergebnisse. Früher ist man davon ausgegangen, daß das zentromere Heterochromatin, die am spätesten replizierte DNA einer Zelle ist (Camargo und Cervenka, 1982), doch neuere Untersuchungen weisen auf die mittlere S-Phase, bzw. die zweite Hälfte der S-Phase als Replikationszeitpunkt hin (O'Keefe et al., 1992; Ten et al., 1990). Untersuchungen, ob Neozentromere später replizieren als die gleiche Region in normalen Chromosomen, könnte darüber Aufschluß geben, ob der Replikationszeitpunkt ein möglicher epigenetischer Faktor für die Zentromerdetermination ist (Eichler, 1999). Die Fusion zweier menschlicher Chromosomen kann zu einem dizentrischen Chromosom führen, bei dem eines der beiden Zentromere inakti-

viert ist (Karpen und Allshire, 1997; Sullivan und Schwarz, 1995), was eindeutig für die Beteiligung epigenetischer Faktoren bei der Kinetochorbildung spricht.

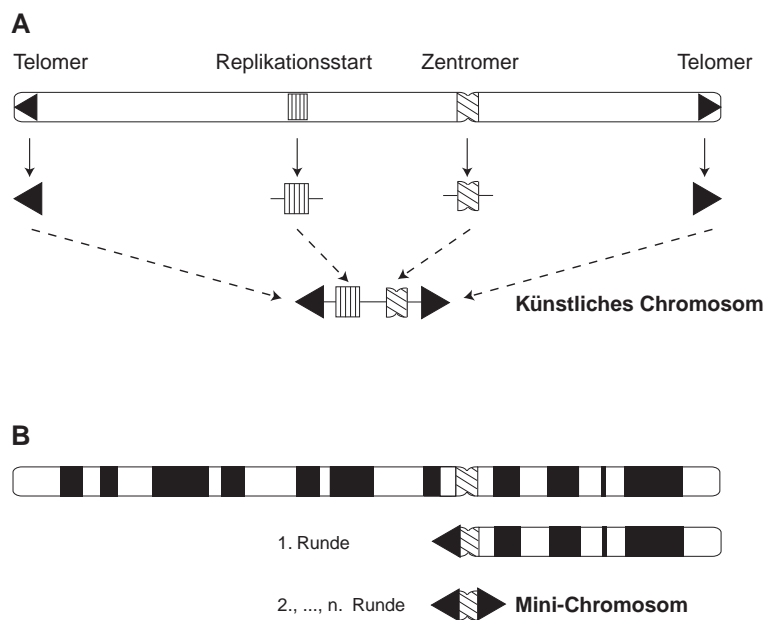
Die Experimente, bei denen gezeigt wurde, daß  $\alpha$ -Satelliten *de novo* Zentromere, bzw. Chromosomen induzieren können (Harrington et al., 1997b; Ikeno et al., 1998; Henning et al., 1999; Ebersole et al., 2000), zeigen, daß sich Zentromere an  $\alpha$ -Satelliten möglicherweise bevorzugt bilden, jedoch scheinen nicht alle  $\alpha$ -Satelliten die gleiche Potenz dazu zu besitzen (Harrington et al., 1997b; Ikeno et al., 1998; Masumoto et al., 1998). Spekuliert wird daher über die Existenz einer "magischen" Sequenz, die zur Zentromerbildung führt (Murphy und Karpen, 1998). Aufgrund der Sequenzanalyse von  $\alpha$ -Satelliten und einer AT-reichen Sequenz, AT28 aus der Neozentromerregion 10q25 (Barry et al., 1999) lassen sich strukturelle Gemeinsamkeiten in der Symmetrie der DNA-Sequenzen erkennen (Koch, 2000), die einige Übereinstimmungen mit dem Aufbau von Zentromeren der Hefe *S. cerevisiae* haben. Doch ob es sich dabei um eine funktionelle Sequenzähnlichkeit, oder nur um eine Übereinstimmung aufgrund eines gemeinsamen Ursprungs der VNTRs (*various number of tandem repeats*) handelt, muß noch experimentell gezeigt werden.

## 1. 6 Künstliche Säugerchromosomen (MACs) und Mini-Chromosomen

Die Entwicklung von künstlichen Chromosomen in der Hefe *S. cerevisiae* (Murray et al., 1986; Burke et al., 1987) ließ die Idee aufkommen, auch für andere eukaryontische Organismen ähnliche Vektoren zu entwickeln (Cooke, 1992). Die Vorteile eines solchen Vektors gegenüber anderen Vektorsystemen sind offensichtlich, da zu erwarten ist, daß künstliche Chromosomen, wie natürliche Chromosomen auch, von den Zellen stabil auf ihre Tochterzellen weitergegeben werden, ohne zuvor in endogene Chromosomen integrieren zu müssen. Die Kopienzahl der Vektoren in der Zelle sollte konstant, in der Regel eine pro Zelle, und die Menge an zusätzlich aufnehmbarer DNA im Vergleich zu konventionellen Vektoren groß sein (Huxley, 1994). Ein solcher Vektor wäre zur Übertragung und Untersuchung großer genomischer DNA-Abschnitte in Zellen geeignet, um damit *in situ*-Genexpressionsstudien durchzuführen, transgene Tiere zu erzeugen und er wäre eine hilfreiche Alternative zu viralen Vektoren in der Gentherapie (Cooke, 1992; Huxley, 1994; Monaco und Larin, 1994; Farr et al., 1995; Harrington et al., 1997b; Willard, 1998; Vos, 1998).

Hefe- und Säugerchromosomen sind lineare Chromosomen die anscheinend dieselben fundamentalen, funktionellen Elemente verwenden: Telomere, Replikationsursprünge und Zentromere. Im Unterschied zu künstlichen Hefechromosomen scheint die Entwicklung von künstlichen Säugetierchromosomen jedoch weitaus schwieriger zu sein. Ein deutlicher Unterschied zwischen Hefe- und Säugerchromosomen ist unter anderem ihre Größe. So sind die größten Chromosomen der Hefe *S. cerevisiae* <3 Mb, die der Hefe *S. pombe* variieren zwischen ~3 und 5,7 Mb und die des Menschen zwischen 50 und 250 Mb. Neben diesen erheblichen Größenunterschieden benötigen Hefechromosomen nur einen Mikrotubulus um mit dem Spindelapparat während der Mitose in Verbindung zu treten, damit sie ohne Fehler auf die Tochterzellen verteilt werden. Die der Säugetiere hingegen benötigen dutzende (Blomm et al., 1993). Erschwerend kommt hinzu, daß für die Untersuchungen an Säugetierchromosomen kein so weit entwickeltes, manipulierbares, genetisches System wie das der Hefe oder der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zur Verfügung steht (Willard, 1996). Aufgrund des fehlenden manipulierbaren Modellsystems sind, wie in den vorangegangenen Abschnitten ausführlich beschrieben, die funktionellen DNA-Sequenzen von Replikationsursprüngen und Zentromeren der Säuger noch nicht oder nur ansatzweise identifiziert worden, was die Neukonstruktion eines artifiziellen Chromosoms zusätzlich erschwert.

Trotz aller Schwierigkeiten sind in den letzten Jahren einige Erfolge bei der Erforschung menschlicher Chromosomen und bei der Entwicklung von künstlich erzeugten Säugetierchromosomen gemacht worden. Dabei lassen sich die Experimente in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Ansätzen unterteilen (Abbildung 3). In die erste Gruppe (A) fallen alle Experimente, bei denen versucht wurde, aus zuvor klonierten oder künstlich erzeugten potentiell funktionellen Elementen ein neues, künstliches Chromosom zusammenzusetzen. Bei der zweiten Gruppe (B) wurde versucht, vorhandene Chromosomen zu verkürzen, um kleinere Mini-Chromosomen für weitere Untersuchungen und/oder weitere Verkürzungen zu erhalten. Um die dabei resultierenden Chromosomen auch sprachlich voneinander zu unterscheiden wird von Willard (1996) der Terminus Künstliche Chromosomen [*mammalian artificial chromosome* (MAC), *human artificial chromosome* (HAC)], analog zu den künstlichen Chromosomen der Hefe oder Bakterien (YAC, BAC), für die erste Gruppe (A) und Mini-Chromosomen (B) für die zweite Gruppe verwendet.



**Abbildung 3: Mögliche Vorgehensweisen bei der Erzeugung von Säugerchromosomen.**

(A) Erzeugung künstlicher Chromosomen durch Neukonstruktion aus zuvor klonierten Einzelelementen.

(B) Verkürzung eines natürlichen Säugerchromosoms durch Telomer-verursachte Chromosomenfragmentierung bis zu einer minimal benötigten Größe (Mini-Chromosom).

### 1.6.1 Künstliche Chromosomen

Bei den bisher durchgeführten Versuchen, bei denen *de novo* Chromosomen entstanden sind, wurde davon ausgegangen, daß  $\alpha$ -Satelliten in der Lage sind, Zentromere neu zu initiieren (Haaf et al., 1992). Bei dem ersten publizierten, erfolgreichen Versuch *de novo* Chromosomen zu erzeugen, bildeten sich, in der Fibrosarkomzelllinie HT 1080 durch Cotransfektion von bis zu 1 Mb großer  $\alpha$ -Satelliten-DNA, langen Telomerrepeats (bis zu mehreren kb) und hochmolekularer menschlicher genomischer DNA (Harrington et al., 1997b) MACs. Sie waren zwischen 6 und 10 Mb groß und enthielten 0,3 Mb bis 2 Mb  $\alpha$ -Satelliten-DNA. Die meisten der selektierten Zellklone hatten allerdings die transfizierte DNA nur in das Genom der Zelle aufgenommen und viele Minichromosomen entstanden durch Telomer-verursachte Chromosomenfragmentierung schon vorhandener Chromosomen. Nur ein Klon enthielt einen MAC ohne nachweisbare endogene Chromosomenabschnitte, der sich sozusagen *de novo* gebildet hatte. Dieses *in situ*-Zusammensetzen der transfizierten DNA wurde durch die Cotransfektion von hochmolekularer menschlicher DNA stark begünstigt, nicht aber durch hochmolekulare DNA der Maus (Harrington et al., 1997b).

Die künstlichen  $\alpha$ -Satelliten wurden durch eine geschickte Klonierungsstrategie in Bakterien aus zwei kürzeren HORs (Abschnitt 1.5.1.2) aus dem Zentromer der menschlichen Chromosomen 17 und Y zusammengesetzt und anschließend durch eine *in vitro* Reaktion *head to tail*

aneinanderliegt, um noch größere Abschnitte zu erhalten. Neue Chromosomen, die nur exogene  $\alpha$ -Satelliten enthielten, bildeten sich interessanterweise nur mit  $\alpha$ -Satelliten-DNA aus Chromosom 17. Die neu gebildeten Chromosomen waren mit den Proteinen CENP-C und CENP-E assoziiert, die nur an aktive Zentromere binden, und wurden auch in Zellen, die nicht unter Selektion wuchsen, effizient an die Tochterzellen weitergegeben (Harrington et al., 1997b).

Bei einem anderen Versuch bildeten sich die MACs aus zuvor konstruierten YACs nachdem sie in die Zelllinie HT1080 transfiziert wurden. Die YACs enthielten ein ca. 100 kb großes Teil eines  $\alpha$ -Satelliten des menschlichen Chromosoms 21 und menschliche Telomerrepeats an den Enden des linearisierten YACs (Ikeno et al., 1998). Der  $\alpha$ -Satellit aus dem Bereich  $\alpha$ 21-I wurde in einem rekombinationsdefizienten Hefestamm kloniert, um eine Rekombination des  $\alpha$ -Satellitenbereichs in der Hefe zu verhindern. Die Chromosomen der Hefe haben eine andere Telomersequenz als Säugetierchromosomen, deshalb wurden die Telomere des YAC-Vektors durch menschliche Telomere ersetzt. Da die Telomerase der Hefe ihre eigenen Telomerrepeats an diese Telomere anhängt, bestanden die Telomere des YACs zur Zeit der Transfektion in die menschliche Zelllinie HT1080 aus chimären Repeats beider Spezies. Die Größe der neu gebildeten Chromosomen lag zwischen 1 und 5 Mb. Bei der ausführlichen Analyse der Klone konnte keine DNA endogener Chromosomen in den *de novo* gebildeten Chromosomen nachgewiesen werden. Die MACs hatten sich durch eine Amplifikation des transfizierten YACs gebildet (Ikeno et al., 1998).

Kultivierungsversuche verschiedener Zellklone ohne Selektionsmedium ergaben, daß größere MACs (2,5-5 Mb) stabiler auf die Tochterzellen weitergegeben wurden als kleinere (1-2 Mb). Ob es sich bei den neu gebildeten Chromosomen um lineare oder zirkuläre Moleküle handelt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Bei parallel durchgeführten Transfektionsversuchen mit YACs, die anstelle der  $\alpha$ 21-I-Satelliten eine etwa gleichgroße Sequenz aus  $\alpha$ 21-II und ca. 2 kb Satellit III enthielt, entstanden keine neuen Chromosomen. Die YACs integrierten stattdessen ausschließlich in schon vorhandene Chromosomen. Anscheinend ist der  $\alpha$ -Satellit  $\alpha$ 21-II, im Gegensatz zu  $\alpha$ 21-I, nicht oder erheblich schlechter in der Lage, *de novo* Zentromere zu induzieren (Ikeno et al., 1998; Masumoto et al., 1998). Auffällig an diesen beiden Versuchen ist, daß sich MACs nur mit  $\alpha$ -Satelliten gebildet haben, die *CENP-B boxes* enthalten und damit auch CENP-B binden können. Auch wenn dieses Protein nicht unbedingt notwendig zu sein scheint, um Kinetochore auszubilden (Pluta et al., 1995; Hudson et al., 1998; Perez-Castro et al., 1998; Kapoor et al., 1998), könnte die Bindung von CENP-B deren Bildung erleichtern.

Bei einem weiteren Versuch wurden ebenfalls YACs verwendet, um MACs in der Zelllinie HT1080 zu erzeugen. Dabei wurden die Hefetelomere des CEPH-YACs 674E2 durch humane Telomerrepeats und einen putativen Replikationsursprung des menschlichen  $\beta$ -Globingens ersetzt (Hennig et al., 1999). Der YAC enthielt neben einem  $\alpha$ -Satelliten des D-Typs unbestimmter Größe auch nichtalphanhoide DNA aus verschiedenen Chromosomen. Aus dem ursprünglich ca. 1 Mb großen YAC hatten sich MACs gebildet, die eine Größe zwischen 3,5 und 12,9 Mb hatten. Einer der MACs, der nicht durch die Fragmentierung eines endogenen Chromosoms entstanden war, enthielt keine größeren DNA-Abschnitte anderer Chromosomen als die in dem YAC enthaltenen. Detaillierte Untersuchungen ergaben, daß der MAC menschliche Telomere enthält, CENP-E bindet und in der Abwesenheit der G418-Selektion über mehr als 100 Zellgenerationen mitotisch stabil ist (Henning et al., 1999).

Die oben aufgeführten Versuche haben gezeigt, daß lineare  $\alpha$ -Satelliten-DNA, wenn sie mit humanen Telomeren versehen wird, in der Zelllinie HT1080 *de novo* MACs erzeugen können. Der gleiche  $\alpha$ -Satellitenabschnitt aus  $\alpha$ 21-I, der von Ikeno et al. (1998) verwendet wurde, ist jedoch auch in einem zirkulären PAC-Vektor in der Lage, Chromosomen neu zu erzeugen (Ebersole et al., 2000). Wird der gleiche Vektor linearisiert, sinkt die Effizienz der Chromosomenneubildung drastisch, versehen mit zwei humanen Telomeren an beiden Enden steigt sie hingegen wieder an. Die entstandenen Chromosomen hatten unabhängig davon, ob der verwendete Ausgangsvektor Telomerrepeats enthielt oder nicht, keine Telomere. Sehr wahrscheinlich hatten sich bei diesen Experimenten nur zirkuläre Chromosomen gebildet (Ebersole et al., 2000).

### 1.6.2 Mini-Chromosomen

Eine Alternative zur Erzeugung kleiner Chromosomen ist die Manipulation bereits existierender Chromosomen. Beispielsweise konnten durch die Bestrahlung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit  $\gamma$ -Strahlung niedriger Dosis (500 rad) stabile Mini-Chromosomen erzeugt werden (Murphy und Karpen, 1995a; 1995b). In dem dazu verwendeten *Drosophila*-Stamm existierte schon ein zusätzliches Minichromosom (Dp1187), welches durch die radioaktive Bestrahlung weiter verkürzt wurde. Dadurch konnten die zentromerischen und extrazentromerischen Sequenzen, die für die mitotische und meiotische Chromosomensegregation in *Drosophila melanogaster* notwendig sind, identifiziert werden (Murphy und Karpen, 1995a; 1995b).

Zur Erzeugung kleiner Säugerchromosomen kann man sich zu Nutze machen, daß DNA-Fragmente, die aus der Telomersequenz  $(TTAGGG)_n$  bestehen, bei Transfektion in Säugerzel-

len in der Lage sind, *de novo* Telomere zu bilden und die Chromosomen an der Integrationsstelle zu brechen (Farr et al., 1991, 1992; Itzhaki et al., 1992; Barnett et al., 1993; Hanish et al., 1994). Kombiniert mit geschickten Methoden zur Selektionierung der Zellen und aufwendigen Screeningverfahren ist es gelungen, eine Reihe recht gut charakterisierter Mini-Chromosomen zu erzeugen, die von den nativen, humanen Chromosomen X und Y abstammen (Farr et al., 1992; Brown et al., 1994; Farr et al., 1995; Heller et al., 1996; Mills et al., 1999). Bei dieser Methode ist es nicht unbedingt notwendig, die erforderlichen Strukturelemente von Säugerchromosomen in allen Einzelheiten zu kennen. Die Identifizierung dieser Elemente ist vielmehr ein Teilaspekt der durchgeführten Versuche.

Bei den ersten Experimenten zur systematischen Erzeugung von menschlichen Minichromosomen wurde die Methode der Telomer-verursachten Chromosomenfragmentierung mit einer positiv/negativ Selektionsstrategie zur Identifizierung von Zellen, in denen eine Integration der Telomer-DNA zur gezielten Fragmentierung des Chromosoms geführt hat, kombiniert (Farr et al., 1992). Dieses "*Pushmi-Pullyu*" Gegenselektionssystem selektioniert auf Chromosomenbrüche in einer Region auf dem menschlichen X-Chromosom zwischen zwei selektierbaren Markern (Brown et al., 1989). Zellhybriden, die diese Selektion überleben, müssen das Chromosomensegment auf dem der positive Selektionsmarker liegt, behalten, den Chromosomenanteil auf dem das negative Markergen liegt, jedoch aus dem Genom entfernt haben. Diese Strategie zur systematischen Verkürzung des X-Chromosoms wurde angewandt, um in zwei Schritten zuerst den langen und danach den kurzen Arm des Chromosoms zu brechen und neue Telomere zu induzieren (Farr et al., 1992, 1995). Das kleinste der erhaltenen Mini-Chromosomen war dabei ca. 7-8 Mb groß und die mitotische Stabilität entsprach der eines normalen X-Chromosoms in der Mensch/Hamster-Hybridzelllinie. Die tatsächliche Länge dieses Chromosoms war jedoch erheblich größer als der physikalische Abstand beider Bruchpunkte auf dem Ausgangschromosom. Diese Größendifferenz wurde wahrscheinlich durch eine Amplifikation des terminalen DNA-Abschnitts, während der zweiten Fragmentierungsrunde verursacht (Farr et al., 1995).

Wenn keine geeigneten Selektionsmarker auf dem Ausgangschromosom zur Verfügung stehen, ist die Suche nach gezielt verkürzten Chromosomen in den Zellklonen erheblich aufwendiger. Um aus dem normalen menschlichen Y-Chromosom zwei Derivatvchromosomen, die dem kurzen und dem langen Arm des Chromosoms entsprachen zu erzeugen, mußten etwa 70.000 Zellklone auf den Verlust eines der beiden Chromosomenarme untersucht werden, obwohl die zur Verkürzung verwendeten Telomerkonstrukte einen kurzen DNA-Abschnitt des zentromerischen  $\alpha$ -Satelliten des Y-Chromosoms enthielten, der eine homologe Rekombinati-



on des Vektors in die Zentromerregion ermöglichen sollte (Brown et al., 1994). Um die Chromosomenarme der dabei entstandenen Derivatvchromosomen zu verkürzen, mußten in einem zweiten Schritt, nach der Transfektion eines weiteren Telomerkonstrukts nochmals 80.000 Zellklone auf den Verlust terminaler Chromosomenabschnitte untersucht werden (Heller et al., 1996). Durch das Einbringen eines negativ selektionierbaren Markers durch das Telomerkonstrukt dieser zweiten Fragmentierungsrunde, konnte bei einer dritten auf Zellklone selektioniert werden, in denen die Chromosomen ein weiteres mal gebrochen waren, was den Aufwand bei der Analyse der Zellklone erheblich reduzierte. Die durch diese zeit- und arbeitsintensive Prozedur erhaltenen Mini-Chromosomen des humanen Y-Chromosoms hatten eine Größe zwischen 4 und 9 Mb und sie wurden während 100 Zellteilungen stabil auf die nächste Zellgeneration weitergegeben (Heller et al., 1996).

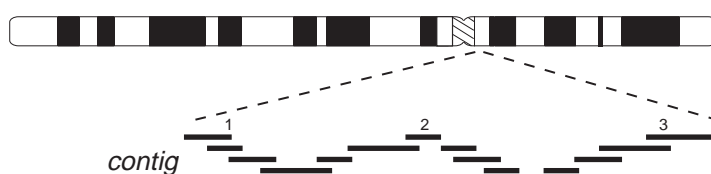
Da eine homologe Rekombination in somatischen Zellhybriden ein sehr seltenes Ereignis ist (Brown et al., 1994), wurde zur Verkürzung eines der X-Derivatvchromosomen (Farr et al. 1995) das Chromosom in eine Hühnererythrozyten-Zelllinie (DT40) transferiert (Mills et al., 1999), die eine erhöhte Rate an homologen Rekombinationen aufweist (Dieken et al., 1996). In dieser Zelllinie konnte das Chromosom gezielt zu einem 2,4 Mb großen Mini-Chromosom verkürzt werden (Mills et al., 1999). Das Mini-Chromosom wird in verschiedenen Zelllinien stabil auf die nächsten Zellgenerationen weitergegeben, wobei die Anzahl der in den Zellen enthaltenen Minichromosomen stark variiert. Durch die relativ kleine Größe dieses Minichromosoms eignet es sich besonders gut für weitergehende Untersuchungen sowie zur Entwicklung eines Mini-Chromosomenvektors zum stabilen Einbringen neuer Gene in Säugerzellen (Mills et al., 1999).

## 1.7 Physikalische Kartierung

Ein Ziel des Humanen Genom Projektes (HGP) ist die Erstellung einer physikalischen Karte des menschlichen Erbgutes mit höchster Auflösung; die Gesamtsequenz des Genoms. Um handhabbare Sequenzabschnitte des Gesamtgenoms zu erhalten, wurde die genomische DNA mit Restriktionsenzymen partiell gespalten und in verschiedenartige Vektoren eingefügt, die in *E. coli* oder *S. cerevisiae* vermehrt werden können. Die Information über die ursprüngliche Anordnung der DNA-Fragmente im Genom geht durch diesen Vorgang verloren. Da diese Information jedoch elementar ist, um eine fortlaufende physikalische Karte zu erstellen, müssen die klonierten DNA-Fragmente wie bei einem großen Puzzlespiel durch geeignete Verfahren wie-

der aneinander gesetzt werden. Gruppen sortierter Klone, deren Inserts sich überlappen, werden Klon-*contigs* genannt. Sie bilden also Teilstücke, die sich fortlaufend überlappend in die zu erstellende physikalische Karte aneinander reihen. Sind alle Teile des Genoms wieder aneinander gesetzt, überspannt ein *contig* jeweils ein Chromosom.

Zum Sortieren der Klone existieren vielerlei Verfahren. Das bekannteste ist das *chromosome walking* (Chromosomenwanderung). Ausgehend von einem Startklon werden dabei benachbarte Klone gesucht, indem mit den Endfragmenten des Startklons Genbanken durchsucht werden, um überlappende Klone zu identifizieren (Royal et al., 1979). Von diesen Klonen werden jeweils wieder die Endfragmente verwendet, um die nächsten überlappenden Klone zu identifizieren (Abbildung 4). Die Geschwindigkeit des Voranschreitens auf dem Chromosom ist dabei abhängig von der Klonegröße (Tabelle 3) und der Anzahl der Startpunkte. Zur Identifizierung überlappender Klone mit großen Inserts, wie etwa BACs oder YACs, werden häufig die Endfragmente der Startklone ansequenziert um, spezifische Primerpaare für eine PCR-Analyse zu generieren. Durch die Verwendung solcher klonspezifischen Primer lassen sich überlappende Klone durch PCR-Analyse aus großen gesamtgenomischen Klonbibliotheken "relativ schnell" herausuchen (Anand et al., 1990; Stachan und Read, 1996)



**Abbildung 4: Chromosome walking mit 3 Startklonen**

Ausgehend von drei Startklonen (1-3) werden aus einer Genbank überlappende Klone gesucht. Die gefundenen Klone dienen jeweils als neue Startklone für die nächste Runde des *chromosome walking*, bis der gesamte Chromosomenabschnitt durch Klone repräsentiert wird.

Klonierungsvektor	Größe der klonierten DNA (kb)
übliche Plasmide mit hoher Kopienzahl	0-10
Insertionsvektor des Bakteriophagen $\lambda$	0-10
Replacementvektor des Bakteriophagen $\lambda$	9-23
Cosmide	30-44
Bakteriophage P1	70-100
PAC (künstliches P1-Chromosom)	130-150
BAC (künstliches Bakterienchromosom)	bis zu 300
YAC (künstliches Hefechromosom)	200-2000

**Tabelle 3: Größe der DNA, die man in verschiedene Klonierungsvektoren einbringen kann** (nach Stachan und Read, 1996)

Zur genaueren Untersuchung der erhaltenen überlappenden Klone wird meist eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dabei wird Klon-DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten und die Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Durch Vergleiche der Fragmentgrößen der überlappenden Klone und ergänzende Southernblot-Analysen lassen sich die gemeinsamen Sequenzanteile ermitteln. Die Klone, die am wenigsten mit dem Startklon überlappen, sind für die nächste Runde des *chromosome walking* besonders geeignet, da sie den größten Anteil bisher unbekannter genomischer DNA abdecken und man dadurch am schnellsten auf dem Chromosom voranschreitet.

Da diese Methode sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, eignet sie sich nur bedingt zur Erstellung von Klon-*contigs*, die größere Bereiche eines Chromosoms oder gar das ganze Genom überspannen. Daher sind andere Verfahren entwickelt worden, die allgemeiner und weniger zeitaufwendig sind. Einige dieser Methoden beruhen auf der Erstellung von sogenannten Fingerabdrücken (*fingerprints*) zufällig ausgewählter genomischer Klone.

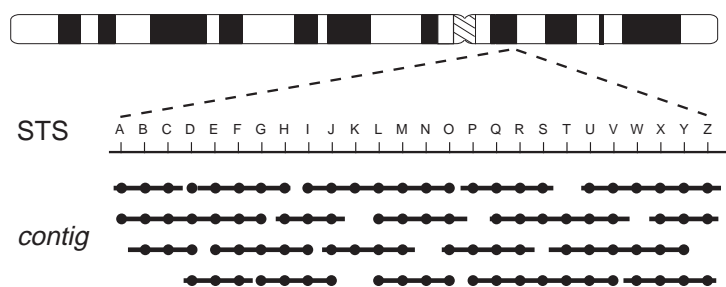
Im Genom von Säugetieren kommen zu einem großen Anteil verstreute, hochrepetitive Sequenzen vor. Einige dieser Sequenzen wie beispielsweise die *Alu*- oder LINE-1 (*Kpn*)-Sequenzen sind im menschlichen Genom durchschnittlich alle 4 kb, bzw. 50 kb anzutreffen. Da die Abstände zwischen den repetitiven Sequenzen in den verschiedenen genomischen Abständen variieren, kann man die Klone, die überlappende Sequenzanteile enthalten, aufgrund übereinstimmender Hybridisierungsmuster identifizieren. Dazu wird genomische DNA der Klone mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten, die enthaltenen Restriktionsfragmente auf einem Gel aufgetrennt und Southernblots der Gele mit repetitiven DNA-Sonden hybridisiert (Bellanné-Chantelot et al., 1992).

Die Existenz von häufig auftretenden, verstreuten Sequenzelementen im Genom kann man sich auch zunutze machen, um von genomischen Klonen einfach und schnell humane DNA-Fragmente zu erhalten. So kann man durch die Verwendung von Oligonukleotiden, die komplementär zur *Alu*-Sequenz sind, die zwischen diesen Repeatelementen liegenden genomischen Sequenzen in einer PCR-Reaktion amplifizieren (Nelson et al., 1989). Diese durch Inter-*Alu*-PCR, kurz *Alu*-PCR genannt, erhaltenen PCR-Produkte bestehen, abgesehen von den eingebauten Primern, in der Regel aus Einzelkopie-DNA, die sich als Hybridisierungssonden für die Untersuchung anderer genomischer Klone oder daraus abgeleiteter *Alu*-PCR-Produkte (Green und Olson, 1990a) sowie zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) (Lengauer et al., 1992) eignen.

### 1.7.1 STS-(Gehalt)-Kartierung

Eine weitere Methode ist die STS-Gehalt-Kartierung [(STS)-content mapping](Kere et al., 1992). Eine *sequence-tagged site* (STS) ist ein kleiner Teil des Genoms (einige hundert Basenpaare) von dem die Sequenz bekannt ist. Ausgehend von dieser Sequenz lassen sich Oligonukleotidprimer generieren, mit denen man anschließend die Sequenz in einem PCR-Test nachweisen kann. Damit die Sequenz ein Ankerpunkt im Genom darstellt, sollte sie im gesamten Genom nur einmal vorkommen. Durch Verwendung somatischer Hybridzellen (Abschnitt 2.1.8) lassen sich STSs spezifisch einzelnen Chromosomen und Chromosomenabschnitten zuzuordnen.

Bei der STS-Gehalt-Kartierung wird versucht, möglichst viele STSs auf einem klonierten DNA-Fragment nachzuweisen. Haben verschiedene Klone gemeinsame STSs, können diese überlappenden Klone zu *contigs* sortiert werden. Werden bei verschiedenen Kartierungsprojekten gemeinsame STSs verwendet, kann man die einzelnen Karten zueinander in Beziehung setzen. Daher stellen die STSs Bindeglieder zwischen verschiedenen physikalischen und genetischen Karten des humanen Genoms dar (Green et al., 1994).



**Abbildung 5: STS-Gehalt-Kartierung**

Klone, die gemeinsame STSs besitzen enthalten auch gemeinsame Sequenzanteile. Die klonierten genomischen DNA-Fragmente werden aufgrund ihrer enthaltenen STSs zu *contigs* sortiert.

Die schwarzen Punkte auf den Linien repräsentieren STSs, die in dem genomischen Klon (Linie) enthalten sind.

Die Durchführung einer PCR-Reaktion ist gut automatisierbar und standardisierbar. Daher ist die STS-Kartierung ein geeignetes Verfahren, um Klon-*contigs* von großen genomischen Abschnitten, ganzen Chromosomen oder dem gesamten Genom zu erstellen (Green und Olson, 1990b; Hudson et al., 1995; Bouffard et al., 1997).

Zur chromosomalen Lokalisation von genomischen Klonen kann die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) an Metaphasechromosomen eine hilfreiche Methode sein (Kunz et al., 1994; Abschnitt 3.2.2). Dazu wird die DNA des Klons oder aus der DNA amplifizierte *Alu*-PCR-Produkte fluoreszenzmarkiert und als Hybridisierungssonde verwendet. Die aus den Hybridisierungen resultierenden Ergebnisse können die Grundlage für die Kartierung einzelner chromosomaler Regionen darstellen (Krebs, 1994).

Bei der Kartierung von Zentromerregionen ergeben sich aufgrund der Sequenzzusammensetzung dieser Regionen technische Schwierigkeiten. Der hohe Gehalt an Sequenzwiederholungen erhöht die Rekombinationshäufigkeit in dem für die Klonierung der YAC-Banken verwendeten Hefestamm AB1380 (Neil et al., 1990). Zusätzlich ist davon auszugehen, daß die Verteilung der Restriktionsschnittstellen in diesen Regionen nicht statistisch ist. Eine Restriktionskartierung des Zentromers wird so erschwert, wenn nicht gar unmöglich gemacht. Weiterhin ist zu beachten, daß Klone, benachbart zu Klonen mit hochrepetitiven Sequenzanteilen, nur dann eindeutig identifiziert werden können, wenn zusätzlich nichtrepetitive Anteile enthalten sind, die die Lokalisation eindeutig machen. Nur so lassen sich überlappende Sequenzabschnitte in den Klonen zweifelsfrei nachweisen.

## 1.8 Aufgabenstellung

Die DNA der Zentromerregion von Chromosomen enthält Sequenzabschnitte, die potentiell wichtig für die Funktionalität der Chromosomen sind. Um die Basis zur Sequenzaufklärung dieses wichtigen Chromosomenabschnitts zu legen, sollte die Zentromerregion von Chromosom 7, also der Chromosomenabschnitt, der das Kinetochor bildet, durch STS-Gehalt-Kartierung (Kere et al., 1992) unter Verwendung von DNA aus genomischen Klonen verschiedener Genbanken kartiert werden. Dabei sollten die genomischen Klone, meist YACs, in möglichst große Gruppen überlappender Klone, *contigs*, angeordnet werden. Als STSs dienten viele Marker, die zuvor bei genetischen Kartierungen verwendet wurden (Dib et al., 1996) und deren Lage in oder um das Zentromer von Chromosom 7 angenommen wird.

Es sollte weiterhin ein Vektor entworfen und konstruiert werden, mit dem man Chromosomen durch Telomer-vermittelte Chromosomenfragmentierung (Farr et al., 1991) brechen kann, um so ein möglichst kleines, verkürztes Chromosom zu erzeugen. Ein solches minimal großes Chromosom wäre ein gutes Modell zur Aufklärung der funktionell wichtigen Bestandteile von Säugerchromosomen und wäre ideal als Ausgangsbasis zur Entwicklung eines artifiziellen Säugerchromosoms.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Adenin	Difco, USA
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Alconox	Alconox, USA
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, USA
Bacto-Trypton	Difco, USA
Bacto-Hefe-Stickstoff-(Basis), ohne Aminosäuren, dehydriert	Difco, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Casein-Hydrolysat	Gibco BRL, Eggenstein
Chloramphenicol	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dextransulfat	Merck, Darmstadt
DTT	Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll (Typ 400)	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glaswolle, silanisiert	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt

---

Glyzerin	Merck, Darmstadt
Hoechst 33258	Hofer, USA
Isoamylalkohol	Riedel-de-Haën, Seelze
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumferricyanid	Merck, Darmstadt
Kaliumferrocyanid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	Fluka, UK
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol-Chloroform	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrolidon	Merck, Darmstadt
Rinder Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure mind. 37%	Merck, Darmstadt
Sorbitol	Merck, Darmstadt
Spermidin	Fluka, UK
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma Chemical Company, UK
Wasser	
HPLC-H <sub>2</sub> O	J.T. Backer, Niederlande
Ampuwa	Fresenius, Oberursel
X-Gal	Serva, Heidelberg

Xylencyanol

Merck, Darmstadt

## 2.1.2 Nukleinsäuren, Nukleotide, Enzyme

DNA-Größenmarker:

100 bp DNA-Leiter

MBI-Fermentas, St. Leon-Roth

Gibco BRL, Eggenstein

 $\lambda$ -DNA *EcoRI* / *HindIII*, Marker 3

MBI-Fermentas, St. Leon-Roth

pUC Mix, Marker 8

MBI-Fermentas, St. Leon-Roth

Nukleotide:

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP

Amersham, Braunschweig

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP

Amersham, Braunschweig

2'-Desoxinukleosid 5'-Triphosphate

Pharmacia Biotech, Schweden

DNA-Polymerisationsmix

Pharmacia Biotech, Schweden

Oligonukleotide

Roth, Karlsruhe

MWG-Biotech, München

ARK-Scientific, Darmstadt

Gibco BRL, Eggenstein

hsDNA (Heringssperma DNA)

Sigma, Deisenhofen

Enzyme:

Alkalische Phosphatase:

*Calf Intestinal Phosphatase* (CIP)

Boehringer Mannheim

Lytikase

Sigma, Deisenhofen

Pronase

Boehringer Mannheim

Proteinase K

Boehringer Mannheim

Restriktionsendonukleasen

Boehringer Mannheim

New England Biolabs, Schwalbach

MBI-Fermentas

RNase A

Boehringer Mannheim

10x Inkubationspuffer Sure

Boehringer Mannheim

T4-DNA Ligase

Boehringer Mannheim

T4-Polynukleotid Kinase

Gibco BRL, Eggenstein

*5x forward reaction buffer*

Gibco BRL, Eggenstein

*Taq*-DNA Polymerase

Amersham, Braunschweig

Appligen, Heidelberg

Boehringer Mannheim



### 2.1.3 Materialien für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit GLUTAMAX	Gibco BRL, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FKS)	Boehringer Mannheim
Penicillin	Grünenthal, Stolberg
Streptomycin (10 mg/ml)	Grünenthal, Stolberg
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Eggenstein
Einfriermedium (Cryoprotective Medium)	BIOWhitaker, Walkersville, USA
Geneticin, G418	Boehringer Mannheim
Gancyclovir, Cymeven	Syntex/Roche, USA
Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen
	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
12-Loch Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Neubauerzählkammer	Braun, Melsungen

### 2.1.4 Materialien für die FISH

Anti-Avidin-AK Nr. BA-0300 (biotinyliert)	Vector, Kanada
Biotin 7-dATP (0,4 mM)	Gibco BRL, USA
Cot-1-DNA	Gibco BRL, USA
DABCO	Sigma, Deisenhofen
DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol)	Sigma, Deisenhofen
FITC-Avidin DCS Nr. A-2011	Vector, Kanada
Formaldehyd 37%	Eastman Kodak, USA
Nick Translation System Nr. 8160SB	Gibco BRL, USA
Lösung A1	je 0,2 mM dCTP, dGTP, dTTP
Lösung C	0,4 U/μl DNA Polymerase I + 40 pg/μl DNase I
Pepsin	Sigma Chemical Company, UK
RNase A	Boehringer Mannheim
ssDNA (Lachssperma DNA)	Sigma, Deisenhofen

### 2.1.5 Kits und Sonstiges

DNA Labelling Kit	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 402079	ABI, Weiterstadt
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini, Midi und Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
Nick-Column	Pharmacia Biotech, Schweden
Röntgenfilme für die Autoradiographie:	
Kodak X-OMAT AR	Kodak, Stuttgart
Kodak Biomax MR	Kodak, Stuttgart
Kodak Biomax MS	Kodak, Stuttgart
Autoradiographiekassetten	DuPont, Bad Homburg
Verstärkerfolien für Biomax MS	Kodak, Stuttgart

### 2.1.6 Puffer, Medien und Lösungen

#### 2.1.6.1 Für die Zellkultur:

DMEM 20% FKS (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	400 ml DMEM mit GLUTAMAX 100 ml Fetales Kälberserum 10 ml PS 5 ml 100 x nicht essentielle Aminosäuren
Fixativ für Chromosomen	25% Essigsäure in Methanol (v/v)
Formaldehyd/ Glutaraldehyd-Lösung	2% Formaldehyd 0,2% Glutaraldehyd in PBS, pH 7,4
PS	1% Streptomycin (v/v) 9 x 10 <sup>6</sup> IE Penicillin ad. 1 l H <sub>2</sub> O
PBS , pH 7,5	150 mM NaCl 35 mM KCl 15 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 mM EDTA pH 7,5
PBS, pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

	1,8 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4
X-Gal Reagenz	1 mg/ml X-Gal 4 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 4 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2 mM $\text{MgCl}_2$ in PBS, pH 7,4

**2.1.6.2 Für die FISH-Analyse:**

DABCO Antifading	2,33% DABCO (w/v) 90% Glyzerin (v/v) 20 mM Tris-HCl, pH 8,0
DAPI-Stammlösung	20% in $\text{H}_2\text{O}$ (w/v)
Dextransulfat	50% in $\text{H}_2\text{O}$ (w/v)
Formamid (deionisiert)	1 l Formamid 3 große Löffel Sardolit pH 7,0
PBS	150 mM NaCl 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5

**2.1.6.3 Für alle anderen verwendeten Methoden:**

AHC-Agar	AHC-Medium mit 2% Bacto-Agar (w/v)
AHC-Medium	0,002% Adenin (w/v) 0,5% Casein Hydrolysat (w/v) 0,17% Hefe-Stickstoff-(Basis) (w/v) 0,005% Ampicillin (w/v) 2% Glucose (w/v) pH 5,8
Agarosegelladepuffer I (6x)	0,25% Bromphenolblau (w/v) 15% Ficoll (w/v)
Agarosegelladepuffer II (6x)	0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25% Xylencyanol 30 % Glyzerin (v/v)
APS	10% in $\text{H}_2\text{O}$ (w/v)
Dehybridisierungslösung	0,1% SDS 1 mM EDTA
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl

Denhardt-Reagenz	2% Ficoll (v/w) 2% Polyvinylpyrrolidon (w/v) 2% BSA (w/v)
DNaseI-Stop-Mix (5x)	62,5 mM EDTA 2,5% SDS (w/v)
Hybridisierungslösung:	
für DNA-Fragmente	1 mM EDTA 0,5 M Na-Phosphatpuffer, pH 6,8 7% SDS (w/v) 100 µg/ml denaturierte hsDNA
für Oligonukleotide	6x SSC 5x Denhardt-Reagenz 0,5% SDS 100 µg/ml denaturierte hsDNA
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar (w/v)
LB-Agar mit X-Gal und Amp.	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar (w/v) 100 µg/ml Ampicillin 40 µg/ml X-Gal 50 µg/ml IPTG
LB-Medium	0,5% Hefeextrakt (w/v) 1% Trypton (w/v) 85 mM NaCl
Mg <sup>++</sup> -Stock (2 M)	1 M MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 1 M MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
1 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8	51% 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 49% 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
Neutralisationspuffer	0,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,0
P1-Lösung	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
P2-Lösung	200 mM NaOH 1% SDS (w/v)
P3-Lösung	3M KaAc, pH 5,5
PCR-Puffer (10x; CEPH)	500 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 1% Triton X-100 0,1 % Gelatine
SCEM-Lösung	1 M Sorbitol 0,1 M Natriumcitrat 10 mM EDTA

	0,05 M $\beta$ -Mercaptoethanol
SOB-Medium	2% Trypton (w/v) 0,5% Hefeextrakt (w/v) 10 mM NaCl 2,5 mM KCl
SOC-Medium	2% Trypton (w/v) 0,5% Hefeextrakt (w/v) 20 mM Glucose 20 mM $Mg^{++}$ 10 mM NaCl 2,5 mM KCl
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,5
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat, pH 8,0 50 mM EDTA
5x TBE	0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 0,5 M Borsäure 10 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
10x TNE	100 mM Tris-HCl, pH 7,4 1 M NaCl 10 mM EDTA
Waschlösung I	2x SSC 0,1% SDS
Waschlösung II	0,1x SSC 0,1% SDS
Waschlösung III	6x SSC 0,1% SDS
X-Gal-Lösung	20 mg/ml in Dimethylformamid

### 2.1.7 Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
ABI DNA-Sequencer 373	Perkin Elmer, USA
Biodyne A Transfermembran	Pall, Dreieich
Brutschrank Typ B 5042E und T 5050	Heraeus, Hanau
Dokumentationssystem E.A.S.Y.	Herolab, Wiesloch
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
EASYJECT Plus Elektroporator	EquiBio, Angleur, Belgien

Fluorometer TKO 100	Hoefler Scientific Instruments, USA
Fluoreszenzmikroskop (Axioplan)	Zeiss, Oberkochen
Geiger-Müller-Zähler LB1210B	Berthold, Wildbad
Gelelektrophoresekammern (horizontal)	AGS, Heidelberg
	Gibco, BRL, USA
	MWG-Biotech, München
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungssofen Sonder 30	Bachofer, Reutlingen
Kühlzentrifuge Sorvall RT 6000 B	DuPont, USA
Küvetten für die Elektroporation	Eurogentec, Serain, Belgien
Magnetrührer Ikamag RO	Ika-Werk, Staufen
Mikrowelle	Bosch, München
Netzgeräte (Power Supply):	
EPS 500/400	Pharmacia Biotech, Schweden
Phosphorimager Fujix BAS 1000	Fujix, Japan
Software zur Auswertung: Tina ver. 2.7	Raytest, Karlsruhe
Photometer:	
Pharmacia Novospec II	Pharmacia Biotech, Schweden
GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Schweden
Pipetten:	
Eppendorf-Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipette 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipette 50-250 µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipette 200-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Reference 2-20 µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Reference 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette P 20	Gilson
Eppendorf Multipette	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße:	
50 ml	Falcon, USA
	Greiner, Frickenhausen
14 ml	Falcon, USA
MicroAmp Reaction Tubes	Perkin Elmer Cetus, USA
Micro Test Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

Micro Test Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nürmbrecht
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Scientific Co., USA
Serilbank Microflow Intermed	Stolco, Düsseldorf
Sterilbank Lamin Air Flow HA 2448GS	Heraeus, Hanau
Thermocycler für die PCR:	
GeneAmp PCR System 2400 und 9600	Perkin Elmer Cetus, USA
Trio Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Tischzentrifugen:	
Biofuge A	Heraeus, Hanau
Eppendorf Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Umkehr-Mikroskop	Leitz, Wetzlar
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator UVT2035 (302 nm)	Herolab, Wiesloch
VacueGene Blotting-Einheit 2016	Pharmacia-LKB, Schweden
Vakuumpumpe	Pharmacia-LKB, Schweden
Vortex Reax 2000	Heidolph, Hamburg
Waagen:	
AE 240	Mettler, Schweiz
PM 2000	Mettler, Schweiz
Wasserbäder:	
Typ 3042	Köttermann, Hänigsen
Typ 1083	GFL, Burgwedel
Whatman-Papier:	
Gel-Blotting-Paper GB002	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkultur-Brutschrank Cytoperm	Heraeus, Hanau
Computer PC 486, 586er (IBM-Komp.)	div. Hersteller
MacIntosh Iicx/Iici und PowerPC	Apple Computer GmbH, Ismaning

Alle Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Falcon (USA), Greiner (Frickenhausen), Perkin Elmer (USA), Sarstedt (Nürmbrecht), Becton Dickinson (New Jersey/USA) bezogen. Einmalpipetten wurden von der Firma Greiner (Frickenhausen) und Mikropipetenspitzen von den Firmen Sarstedt (Nürmbrecht), Micro-Bio-Tec Brand (Gießen) und Eppendorf (Hamburg) erworben. Nicht aufgelistetes Standardzubehör wurde von der Fa. Kobe (Marburg) und der Medizintechnik (Universitätsklinikum Marburg) bezogen.

## 2.1.8 Somatische Zellhybriden

### 2.1.8.1 Zellhybriden mit Anteilen von Chromosom 7

Die Maus/Mensch Hybridzelllinien mit Anteilen von Chromosom 7 (Tabelle 4) entstanden durch Fusion menschlicher Fibroblasten mit HPRT-negativen Tumorzellen der Maus (RAG) (Bender und Grzeschik, 1976; Vortkamp et al., 1991).

Zelllinie	Lokalisation	Quelle
Ru Rag 6-20-12 (RR6)	7cen-qter	Bauch et al., 1978
Ru Rag 14-4-7-44-(7) (RR14)	7pter-cen	Vortkamp et al., 1991
GN6 Rag	7p11.2-qter	Vortkamp et al., 1991
4IRB Rag18-17	7p11.2-qter	unpubliziert
5387cl10	7pter-qter	Croce und Koprowski, 1974
Rag	Mauszellinie	Klebe et al., 1970

**Tabelle 4: Hybridzelllinien mit Chromosom 7-Anteil**

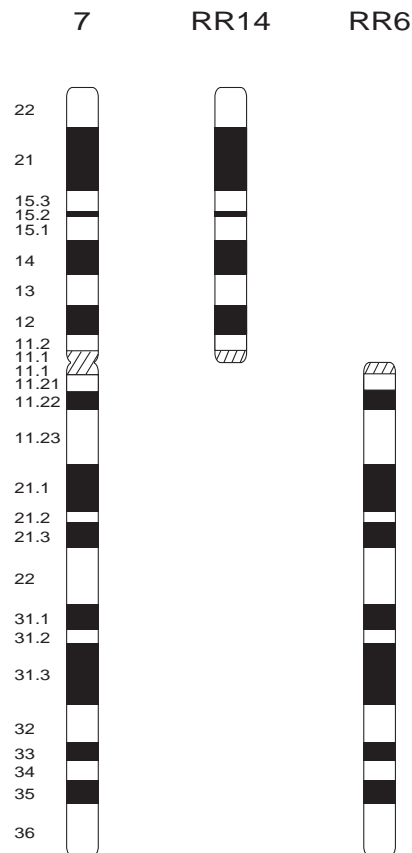
### 2.1.8.2 Die Zelllinien Ru Rag 14-4-7-44-7 und Ru Rag 6-20-12

In den Zellen eines phänotypisch unauffälligen Mannes, bei dem durch einen nicht näher charakterisierten Prozeß eines der beiden Chromosomen 7 im Zentromer geteilt wurde, entstanden neben dem normalen Chromosom 7 zwei kleinere Chromosomen, die zytogenetisch dem kurzen (7p) und dem langen Arm (7q) des Chromosoms entsprechen (Hansen et al., 1975). Die beiden Chromosomen werden in der Mitose wie ein zusammenhängendes Chromosom 7 an die Tochterzellen weitergegeben. Je eines dieser Chromosomenteile ist als einzelnes menschliches Chromosom in den beiden Mensch-Maus-Hybridzelllinien Ru Rag 6-20-12 (RR6) und Ru Rag 14-4-7-44-7 (RR14) neben den Mausechromosomen enthalten (siehe Abbildung 6). In der Zelllinie RR6 befindet sich 7q. RR14 enthält 7p als separates Chromosom (Bauch et al., 1978; Vortkamp et al., 1991). Die Zelllinien ließen sich durch Fusion von Fibroblasten des Mannes mit HPRT-negativen RAG Mäusezellen und anschließender Subklonierung etablieren (Bender und Grzeschik, 1976).

Durch eine Southernblotanalyse (Abbildung 11, Seite 83) und eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (persönliche Mitteilung von Herrn PD Dr. Kunz) konnte gezeigt werden, daß RR14 Sequenzen aus den  $\alpha$ -Satellitenbereichen D7Z1 und D7Z2 des menschlichen Chromosoms 7



enthält. In der Zelllinie RR6 konnten hingegen nur Sequenzen aus dem Bereich D7Z1 nachgewiesen werden. Daraus läßt sich folgern, daß das Chromosom 7 des Mannes in D7Z1 gebrochen ist.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des menschlichen Chromosoms 7 und zweier Derivatchromosomen**

Die Abbildung zeigt schematisch ein normales Chromosom 7 des Menschen und die Derivatchromosomen der Zelllinien Ru Rag 14-4-7-44-7 (RR14) und Ru Rag 6-20-12 (RR6) .

### 2.1.8.3 Monochromosomale Zellhybriden

Der NIGMS Mensch/Nager Zellhybrid Mapping-Panel 2 (Tabelle 5) wurde von *NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository* (Camden, New Jersey) bezogen. Er enthält 24 unterschiedliche Hybridzelllinien, die neben den Nagerchromosomen jeweils eins der 24 menschlichen Chromosomen tragen. Die Zelllinien wurden cytogenetisch, durch Southernblotanalyse und PCR charakterisiert (Drwinga et al., 1993). Einige Zelllinien weisen Translokationen zwischen Mensch- und Nager-Chromosomen auf oder haben zusätzliche menschliche Chromosomenfragmente. Als Kontrollen enthält der Panel 3 zusätzliche Zelllinien von Mensch, Maus und chinesischem Hamster.

<b>Hybridzelllinie</b>	<b>mensch. Chromosom</b>	<b>mensch. Elternzelllinie</b>	<b>Nager</b>
NA06317	Y		Chin. Hamster
NA06318C	X		Chin. Hamster
NA10114	5		Chin. Hamster
NA10115	4		Chin. Hamster
NA10156B	8		Chin. Hamster
NA10253	3		Chin. Hamster
NA10323	21	AG06814	Maus
NA10449	19		Chin. Hamster
NA10479	14		Maus
NA10498	17	GM00271	Maus
NA10567	16	GM02860	Maus
NA10611	9	GM07890	Chin. Hamster
NA10629	6		Chin. Hamster
NA10791	7		Chin Hamster
NA10826B	2		Chin. Hamster
NA10868A	12	GM07890	Chin. Hamster
NA10888	22		Chin. Hamster
NA10898	13		Chin. Hamster
NA10926D	10		Chin. Hamster
NA10927A	11		Chin. Hamster
NA11010	18	GM04025	Chin. Hamster
NA11418	15		Chin. Hamster
NA13139	1	MRC5	Maus
NA13140	20	MRC5	Maus
NAIMR91		Humane Linie IMR91	
NA05862			Maus Linie 3T6
NA10658			Chin. Ha. Linie. RJK88

Tabelle 5: NIGMS Human/Rodent Somatic Cell Hybrid Mapping Panel #2 Version 2

#### 2.1.8.4 Bestrahlungshybriden

Der GeneBridge 4 Maus/Hamster Bestrahlungshybriden-Panel (Tabelle 6) wurde von der Firma Research Genetics bezogen. Die Zellhybriden wurden durch Fusion der humanen, diploiden Fibroblastenlinie HFL121 (Karyotyp: 46, XY) mit der Thymidin-Kinase-negativen Hamsterzelllinie A23tk erzeugt. Um Chromosomenbrüche in den Zellen zu erzeugen, wurden die humanen Fibroblasten vor der Fusion mit Röntgenstrahlen (3000 rad) bestrahlt. Nach der Fusion wurden die Hybriden in HAT haltigem Medium selektioniert (Walter et al., 1994). Die einzelnen Zellhybriden wurden durch eine inter-*Alu* PCR auf menschliche DNA getestet. Die Zelllinien, die ein komplexes Muster von amplifizierten humanen DNA-Fragmenten ergaben und positiv für die humane TK (den Selektionsmarker) waren, wurden zur Erstellung des Hybrid-Panels herangezogen. Von den 199 selektionierten Hybriden wurden zunächst 168 ausgewählt (Gyapay et al., 1996), die später auf 93 Hybridklone für den GeneBridge 4 Maus/Hamster Bestrahlungshybriden-Panel reduziert wurden.

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mit dem Programm "*rhmapper*" am *Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research (WICGR)* beim *mapping service* unter der Internetadresse "<http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>". Das Programm wertet die PCR-Ergebnisse aus und ordnet den Marker in ein zuvor erstelltes Grundgerüst und die Bestrahlungshybrid-Karte des WICGR ein.

Index	Linie	Index	Linie	Index	Linie	Index	Linie	Index	Linie
1	4A4	21	4E2	41	4J9	61	4P11	81	4V2
2	4A5	22	4E4	42	4K5	62	4Q2	82	4V3
3	4AA5	23	4E6	43	4K7	63	4Q4	83	4V7
4	4AA7	24	4E11	44	4K8	64	4R1	84	4V8
5	4B2	25	4F6	45	4K9	65	4R2	85	4W1
6	4B3	26	4F7	46	4K12	66	4R3	86	4Y4
7	4B9	27	4F13	47	4L3	67	4R5	87	4Y8
8	4BB1	28	4G1	48	4L4	68	4R6	88	4Y9
9	4BB6	29	4G5	49	4L6	69	4R10	89	4Z5
10	4BB8	30	4G6	50	4M4	70	4R12	90	4Z6
11	4BB10	31	4G7	51	4M5	71	4S3	91	4Z9
12	4BB12	32	4G11	52	4N3	72	4S6	92	4Z11
13	4C3	33	4H1	53	4N5	73	4S10	93	4Z12
14	4C11	34	4H8	54	4N6	74	4S12		
15	4CC8	35	4H9	55	4N7	75	4T3		
16	4D1	36	4H12	56	4N12	76	4T4		
17	4D7	37	4I1	57	4O5	77	4T10		
18	4DD2	38	4I4	58	4O10	78	4T11		
19	4DD5	39	4J2	59	4P2	79	4U1		
20	4DD8	40	4J5	60	4P9	80	4U3		

**Tabelle 6: GeneBridge4 Radiation Hybrid Mapping Panel**

Die Tabelle beinhaltet die verwendeten Zelllinien mit den zugehörigen Indices (nach WICGR "[http://carbon.wi.mit.edu:8000/ftp/pub/human\\_STS\\_releases/dec95/rhmap/genebridge4.html](http://carbon.wi.mit.edu:8000/ftp/pub/human_STS_releases/dec95/rhmap/genebridge4.html)")

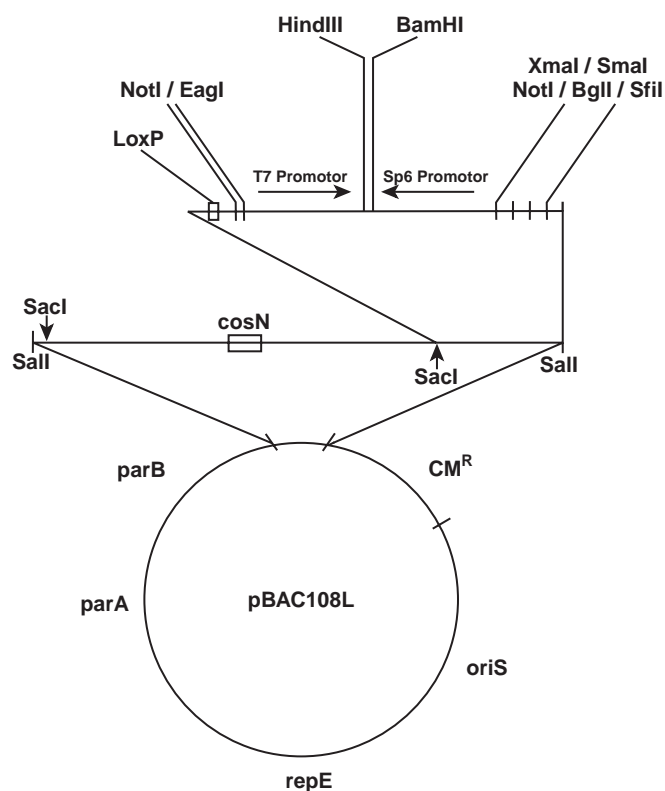
### 2.1.8.5 Normale diploide Zelllinien

Die humane lymphatische Zelllinie GM3104 (46, XX) wurde vom NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository (Camden, New Jersey) bezogen.

## 2.1.9 Bakterielle Vektoren

### 2.1.9.1 Der BAC-Vektor pBAC108L (Shizuya et al., 1992)

Viele bakterielle Vektoren, die in mittlerer bis hoher Kopienzahl in Bakterien replizieren, zeigen oft eine Instabilität der Inserts. Sie neigen zum Deletieren und Rearrangieren der klonierten DNA, besonders bei eukaryontischen DNA-Inserts, welche eine Vielzahl von verschiedenen repetitiven Sequenzen enthalten. Deshalb sind für große genomische Inserts Vektoren entwickelt worden, die in geringer Kopienzahl (hier 1-2) in *E. coli* repliziert werden. Das Plasmid pBAC108L (Abbildung 7) enthält die Gene *oriS*, *repE*, *parA* und *parB*, die die Kopienzahl und die unidirektionale Replikation regulieren. Zur Selektion der Bakterien enthält es ein Chloramphenicol-Resistenzgen ( $CM^R$ ). Das Klonierungssegment enthält die Bakteriophagen  $\lambda$  *cosN*- und P1 *loxP*-Loci, zwei Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der Insert-DNA (*HindIII* und *BamHI*), und mehrere G+C-reiche Schnittstellen (*NotI*, *EagI*, *XmaI*, *SmaI*, *BglI* und *SfiI*), um das Insert gezielt ausschneiden zu können. Die *HindIII*- und *BamHI*-Schnittstellen sind von den T7 und Sp6-Promotoren flankiert, die zur Generierung von RNA-Proben für das *chromosome walking* und zum Sequenzieren des Vektor-Insert-Übergangs eingefügt wurden.



**Abbildung 7: Der BAC-Vektor pBAC108L**

Die Abbildung ist im wesentlichen der Publikation von Shizuya et al., 1992, entnommen.

### 2.1.9.2 andere Vektoren

In Tabelle 7 sind alle anderen verwendeten Vektoren aufgeführt.

Vektor	Herkunft
pBlueScriptIIKS(+) Phagemid	Stratagene, La Jolla/USA
pGEM7-Zf(+)	Promega, Madison/USA
pPNT	Tybulewicz et al., 1991
pSXneo0.8T <sub>2</sub> AG <sub>3</sub>	Hanish et al., 1994
pcDNA3.1/His B/lacZ	Invitrogen, NV Leek, Niederlande
pMGB7	Waye et al., 1987
pα7d1	Waye et al., 1987
pBeloBAC11 <sup>#</sup>	Shizuya et al., nicht publiziert
pYAC4	Burke et al., 1987

**Tabelle 7: andere Vektoren**

# wie pBAC108L jedoch mit *lacZ*-Gen im Klonierungssegment

### 2.1.9.3 verwendete Bakterienstämme

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurden die in Tabelle aufgeführten *E. coli*-Stämme verwendet.

Stamm	Genotyp	Herkunft
DH10-B (EASY-PORE-H)	F', φ <sub>para</sub> D139 Δ( <i>ara</i> , <i>leu</i> )7697, Δ <i>lacX</i> 74, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ-, <i>mcrA</i> Δ-( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ), <i>rpsL</i> , <i>dxr</i> , φ80Δ <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i>	Eurogentec, Seraing, Belgien
SURE	e14 <sup>-</sup> ( <i>McrA</i> <sup>-</sup> ) Δ( <i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i> )171 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> <i>recB</i> <i>recJ</i> <i>sbcC</i> <i>umuC::Tn5</i> ( <i>Kan</i> <sup>r</sup> ) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> <sup>d</sup> Δ(M15 <i>Tn10</i> ( <i>Tet</i> <sup>r</sup> )]	Stratagene, Heidelberg

**Tabelle 8: verwendete Bakterienstämme**

### 2.1.10 BAC-Klone

Die verwendeten BAC-Klone (Tabelle 9) wurden von Prof. Dr. Dr. Julie R. Korenberg (Los Angeles, USA) zur Verfügung gestellt und von Ihr durch FISH lokalisiert.

BAC	Locus	Vektor
7D5	7cen	pBAC108L
7C1404	7cen	pBeloBAC11
372E12	7cen, 2cen, 16cen	pBAC108L
7c23	7cen (flankierend)	pBAC108L

**Tabelle 9: verwendete BAC-Klone**

### 2.1.11 Künstliche Hefechromosomen, YACs

Die verwendeten YACs entstammen zwei verschiedener YAC-Bibliotheken. Zur Konstruktion beider Bibliotheken wurde der Vektor pYAC4 (Abbildung 20) verwendet (Burke et al., 1987). Der Vektor enthält drei unterschiedliche Strukturelemente, die eine geregelte Weitergabe des künstlichen Chromosoms während der Zellteilung in *S. cerevisiae* ermöglichen. Es handelt sich dabei um das Zentromer des Hefechromosoms Nr. 4 (CEN4), den autonomen Replikationsursprung (ARS1) von Chromosom 1 und zwei Telomere (Tel). Zur Selektion in Hefe werden die beiden Marker TRP1 und URA3 verwendet. Beide Banken wurden in dem Hefestamm AB1380 (Tabelle 12) kloniert.

Eine YAC-Bibliothek (Tabelle 10) wurde aus der Mensch/Hamster-Hybridzelllinie 4AF1/102/KO15 kloniert, die als einziges menschliches Chromosom das Chromosom 7 enthält (Scherer et al., 1992). Durch FISH-Analyse wurden 725 dieser chromosomenspezifischen YAC-Klone auf cytogenetisch definierte Regionen des menschlichen Chromosoms 7 kartiert (Kunz et al., 1994). Alle Klone, die auf die Zentromerregion lokalisiert werden konnten, wurden zur weiteren Analyse im Rahmen dieser Arbeit herangezogen.

Klon Nr.	Locus	Analyse- methode	Klon Nr.	Locus	Analyse- methode
HSCE9	7cen-q22	*	HSCE1066	7cen	D7Z1
HSCE33	7cen	*	HSCE1067	7cen	D7Z1
HSCE45	7p12-cen	*	HSCE1070	7cen	D7Z1
HSCE72	7cen-q22	*	HSCE1071	7cen	
HSCE73	7cen	*, D7Z1	HSCE1073	7cen	
HSCE110	7cen-q22	*	HSCE1075	7cen	D7Z1
HSCE187	7cen	D7Z2	HSCE1077	7cen	D7Z1
HSCE188	7cen	*	HSCE1078	7cen	D7Z1
HSCE299	7cen	*	HSCE1080	7cen	D7Z1
HSCE305	7p11.1-q11.1	*	HSCE1083	7cen	D7Z2
HSCE513	7p12-cen	*	HSCE1088	7cen	D7Z2
HSCE527	7cen	*	HSCE1090	7cen	D7Z2
HSCE601	7cen	*	HSCE1091	7cen	D7Z2
HSCE647	7p11.2-q11.21	*	HSCE1092	7cen	D7Z2
HSCE847	7cen	*	HSCE200	7q11.23	*
HSCE853	7p12-cen	*	HSCE263	7q11.21-q11.23	*
HSCE856	7p12-cen	*	HSCE531	7q11.21-q11.23	*
HSCE863	7cen	*	HSCE833	7q11.21-q11.23	*
HSCE902	7p12-cen	*	HSCE841	7q11.21-q11.23	*
HSCE1065	7cen	D7Z1	HSCE842	7q22	

**Tabelle 10: YAC-Klone aus der Chromosom 7 spezifischen Bibliothek** (Scherer et al., 1992)

Die mit \* gekennzeichneten Klone sind durch FISH vorlokalisiert worden. Die restlichen Klone wurden durch Marker für die Regionen D7Z1 und D7Z2 identifiziert (Kunz et al., 1994).

Die anderen verwendeten YACs (Tabelle 11) entstammen der YAC-Bibliothek des Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) / Généthon (Chumakov et al., 1995). Die Klone haben eine durchschnittliche Insertgröße von 1,054 kb und wurden aus einer humanen lymphatischen Zelllinie (46, XY) kloniert. Wegen der relativ großen Inserts werden diese Klone auch Mega-YACs genannt. YACs dieser Bibliothek wurden auf Grund der Publikationen von Chumakov et al. (1995) und Hudson et al. (1995) für die Untersuchungen in dieser Arbeit ausge-



wählt.

Pool	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon	Klon
1	644-D-3	644-E-1	654-C-3	665-C-12	690-B-3	
2	694-H-12	698-D-5	714-A-12	725-F-5	738-F-7	
3	752-B-1	754-F-11	754-G-3	755-A-8	763-G-2	
4	764-F-3	771-E12	774-B-8	777-H-1	777-H-2	
5	790-G-2	795-A-11	795-A-6	802-D-4	803-H-7	
6	805-C-3	807-B-9	807-D-2	807-D-3	809-E-2	
7	812-E-7	816-D-7	825-B-4	844-C-9	846-A-11	
8	854-E-11	870-A-6	890-A-4	890-B-1	907-F-5	
9	928-B-4	930-G-9	932-G-9	937-B-8		
10	941-H-12	946-A-4	946-H-8			
11	715-E-2	721-B-4	726-D-7	728-B-7	734-A-6	
12	742-A-8	744-C-11	747-E-7	754-A-12	754-E-7	
13	767-E-11	773-A-1	777-C-11	778-C-4	790-B-8	
14	791-H-7	803-F-7	811-E-2	823-H-6		
15	846-E-10	847-B-9	850-F-8	853-B-2	857-C-2	
16	857-G-1	859-C-2	874-C-2	880-A-10	883-F-3	
17	884-E-3	885-F-11	890-F-2	895-H-3	913-C-1	
18	919-A-8	930-H-6	935-G-3	938-F-6	944-E-3	
19	963-G-11	964-A-7	965-H-9	971-A-9	982-E-10	983-A-3

**Tabelle 11: Mega-YACs aus der CEPH YAC-Bibliothek**

### 2.1.11.1 Hefestamm AB1380

Stamm	Genotyp	Quelle
AB1380	MATa ade2-1 can1-100 trp1 ura3 his5 $\Psi^+$	Burke et al., 1987; ATCC

**Tabelle 12: Der Hefestamm AB1380**

## 2. 2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen

#### 2.2.1.1 Kultur von *Escherichia coli* (*E. coli*)

##### Agar-Kultur

Zur Vereinzelnung von Bakterien wurden diese nach Anzucht in Flüssigmedium oder aus einem Glycerolstock auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C ca. 16 h inkubiert. Einzelne Kolonien konnten mit einer Impföse oder einem sterilen Zahnstocher zur weiteren Kultivierung der Platte entnommen werden.

##### Übernachtkultur

5 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und bei 37 °C und 200 Upm 16 h im Schüttler aerob inkubiert.

##### 250-500 ml-Kultur

Aus einer frischen Übernachtkultur wurde 1 ml in 250-500 ml LB-Medium (2 l -Erlenmeyerkolben mit Deckel) überführt und bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,5 angezüchtet. Zur Amplifikation von Plasmiden wurde den Kulturen zu diesem Zeitpunkt je nach Bedarf 170 µg/ml Chloramphenicol zugegeben und weitere 12-20 h inkubiert. Ohne Amplifikation wurden die Kulturen bis zu einer max. Dichte von OD<sub>595</sub> 0,8 kultiviert.

Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde 50-100 µg/ml Ampicillin oder 12,5 µg/ml Chloramphenicol zu den LB-Medien zugegeben. Zur langfristigen Lagerung von Bakterien wurde zu 1 ml frischer Bakterienkultur 15% Glycerin gegeben und unmittelbar nach dem Mischen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente Bakterien wurden aus einer 500 ml Kultur (S.O.B.-Medium), im exponentiellen Wachstum (OD<sub>550</sub> 0,7 bis 0,8) präpariert. Dazu wurden die Bakterien abzentrifugiert, das Medium abgegossen und das Sediment in 500 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O (MilliQ) resuspendiert. Es wurde anschließend noch 2 mal mit 500 ml H<sub>2</sub>O und 1 mal mit 50 ml eiskaltem 10% Glycerin gewaschen. Abschließend wurden die Bakterien bei einer Dichte von 10<sup>10</sup> Zellen pro ml in 10% Glycerin aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.3 Kultur von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

Zur Isolierung von YAC-DNA wurde der entsprechende Klon aus einem Glyzerinstock auf einer AHC-Agarplatte ausgestrichen und für 48 bis 72 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml AHC-Medium mit einer einzelnen Hefekolonie beimpft und 48 h bei 30 °C und 200 Upm im Schüttler kultiviert. 1-3 ml der Vorkultur wurden in 100 ml AHC-Medium überführt und bei 30 °C und 200 Upm weitere 24 h im Schüttler inkubiert. Um bakterielle Kontaminationen zu verhindern wurden 50 µg/ml Ampicillin zum Medium gegeben.

## 2.2.2 DNA-Präparation und Reinigung

### 2.2.2.1 Präparation von genomischer DNA aus kultivierten eukaryontischen Zellen

Zur Präparation von genomischer DNA wurden Zellen aus 250 ml Kulturflaschen und 12-Loch Platten verwendet. Subkonfluente Zellen (ca. 80%-90% des Kulturgefäßes ist durch Zellen bedeckt) wurden nach Waschen des Zellrasens mit 5 ml bzw. 500 µl PBS, durch Zugabe von 20 ml bzw. 500 µl 1xDNaseI-Stop-Mix auf den Zellkulturplatten lysiert. Eine Spaltung der RNA wurde in den selben Gefäßen, durch Zugabe von 20 µg bzw. 2 µg RNase A zum Lysat, bei 37 °C für 30 min durchgeführt. Nach Zugabe von 400 µg bzw. 40 µg Proteinase K wurde das Zelllysate über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der Proteine wurde das Lysat in 50 ml bzw. 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, eine Phenolextraktion (Abschnitt 2.2.2.5) durchgeführt, die DNA anschließend mit NaCl und Isopropanol (Abschnitt 2.2.2.6) gefällt und in 500 µl bzw. 50 µl TE aufgenommen.

(Von der DNA aus 12-Loch-Kulturplatten wurden 10 µl für die anschließende Restriktionsanalyse verwendet. Zur Verwendung als PCR-Template wurde die DNA aus den 12-Loch-Kulturplatten 1:10 verdünnt und in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt.)

### 2.2.2.2 Präparation von YAC-DNA

Die Anzucht der Hefe-Klone erfolgte in 90-100 ml AHC-Medium. Zum Sedimentieren der Hefe wurde 10 min bei 3000 Upm in einer Sorvall RT6000-Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml 0,05 M EDTA resuspendiert und 10 min bei 3000 Upm abzentrifugiert. Zum Zerstören der Zellwand wurde das Sediment in 8 ml SCEM aufgenommen, 100 U U Lyticase zugegeben und 1h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten 5 min bei 800 Upm abzentrifugiert und in 6,4 ml TE aufgenommen. Nach Zu-

gabe von 160 µl 20% SDS wurde die Suspension 15 min bei 68 °C inkubiert. Zum Entfernen der denaturierten Proteine wurden 2,7 ml 3 M KAc zur Suspension zupipettiert, 20 min auf Eis inkubiert und bei 3000 Upm und 4 °C, 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur DNA-Fällung mit 12 ml Isopropanol versetzt, 10 min bei 3000 Upm zentrifugiert und anschließend mit 70% EtOH gewaschen. Die DNA wurde nach dem Trocknen in 3 ml TE aufgenommen und 10 min bei 68 °C gelöst. Danach erfolgte bei 68 °C durch Hinzufügen von 100 µg RNase A zur Lösung eine Spaltung der RNA. Nach der anschließenden Phenolextraktion wurde die DNA mit NaAc und EtOH gefällt und 15 min bei 14000 Upm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die DNA wurde in 50 µl TE gelöst. Die Konzentration der DNA wurde nach dem vollständigen Lösen mit dem Fluorometer bestimmt.

### **2.2.2.3 Plasmid Minipräparation (alkalische Lyse)**

Kleine Mengen Plasmide und BACs wurden aus 5 ml Bakteriensuspension gewonnen. Dazu wurden die Bakterien 10 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Medienüberstandes wurde das Sediment in 300 µl P1-Lösung resuspendiert. Danach wurden 300 µl P2-Lösung zur Suspension dazugegeben, durch vorsichtiges Schütteln gemischt und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dabei muß eine transparente, nicht trübe Lösung entstehen. Anschließend wurden zur klaren Flüssigkeit langsam 300 µl P3-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und genau 5 min auf Eis inkubiert. Dadurch bildet sich ein dickes weißes Präzipitat aus *E. Coli* DNA und Proteinen, welches anschließend 10 min bei 10000 Upm abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit einer Mikropipette in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 800 µl eiskaltem Isopropanol die DNA gefällt. Nach einer 15-minütlichen Zentrifugation bei 14000 Upm wurde der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Zum Waschen wurde der DNA 500 µl 70% EtOH zugegeben und diese nochmals 5 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Alkohol wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Nach dem Trocknen der DNA wurde sie in 30-50 µl TE oder HPLC-H<sub>2</sub>O gelöst. Für die Verwendung der Plasmid-DNA zum Sequenzieren wurde die DNA mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### **2.2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA**

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit dem Qiagen Plasmid Kit, oder dem QIAfilter Plasmid Kit nach den Angaben des Herstellers präpariert.

### 2.2.2.5 Phenolextraktion

Zur Entfernung von Proteinen wurden DNA-Lösungen mit 1/2 Volumen Phenol versetzt und gut gemischt. Durch Zentrifugieren wurde die wässrige von der organischen Phase getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde mit einer Mikropipette vorsichtig abgenommen und mit 1/4 Volumen Phenol und 1/4 Volumen Chloroform erneut extrahiert. Die wässrige Phase wurde zum Entfernen von Phenolanteilen nochmals mit 1/2 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.2.2.6 DNA-Präzipitation

#### Isopropanol-Fällung

Die DNA-Lösung wurde mit 1/5 Volumen 5 M NaCl und 1,5 Volumen Isopropanol versetzt und gut gemischt. Danach wurde die DNA bei 3000 Upm (Sorvall Tischzentrifuge) bzw. 14000 Upm (Eppendorf-Mikrozentrifuge) 10 min zentrifugiert. Zum Waschen der DNA wurde 70% EtOH zugegeben 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Je nach Bedarf wurde der Waschschrift wiederholt und anschließend die DNA bei RT getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in TE oder HPLC-H<sub>2</sub>O gelöst.

#### Ethanol-Präzipitation

Zur DNA-Lösung wurde 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen EtOH zugegeben. Anschließend wurde die Lösung gut gemischt und 15 min bei -20 °C inkubiert, danach wurde die DNA bei 14000 Upm in der Eppendorf-Mikrozentrifuge 10 min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das DNA-Sediment wurde danach in 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in TE oder HPLC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration (Sambrook et al., 1989)

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dazu wurde die DNA 1:50 bis 1:200 verdünnt, in eine 70 µl Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke gefüllt und im Photometer gemessen. Bei einer optischen Dichte von 1 hat doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/ml, einzelsträngige DNA 37 µg/ml und kurze Oligonukleotide 30 µg/ml. Aus dem Verdünnungsfaktor und der Extinktion der gemessenen Probe wird die Konzentration der DNA-Lösung errechnet. Um eine mögliche Phenol- oder Proteinkontamination der Lösung zu ermitteln, wird die Extinktion der Probe zusätzlich

bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus  $A_{260}:A_{280}$  gibt dabei Aufschluß über den Grad der Proteinkontamination. Er sollte idealerweise bei 1,8 bis 2,0 liegen. Bei niedrigeren Werten liegt eine zu hohe Kontamination vor, so daß die genaue Quantifizierung der Probe unmöglich ist.

Kleinere Mengen DNA und DNA aus YAC-Präparationen wurden fluorimetrisch unter Verwendung des Farbstoffes Hoechst 33258 in einem Minifluorimeter der Firma Hoefer (San Francisco/USA), nach Angaben des Herstellers, gemessen.

### **2.2.3 Restriktionsspaltungen**

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde nach Angaben des Herstellers im mitgelieferten Puffer durchgeführt. Bei Restriktionsspaltungen mit mehr als einer Endonuklease wurde das Sure-Puffersystem der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Zur Ermittlung der benötigten Enzymmenge wurde die Unitdefinition der Restriktionsendonukleasen verwendet. Einige Enzyme konnten nach der Reaktion durch 15 min Erwärmung auf 68 °C inaktiviert werden.

### **2.2.4 Gelelektrophoresen**

#### **2.2.4.1 Horizontalgelelektrophorese in Agarosegelen**

Zur Auftrennung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Gele wurden je nach Fragmentgröße aus 0,5% bis 2,5% Agarose in 0,5-1x TBE oder 1x TAE hergestellt. Zum Färben der DNA wurde der Gellösung 0,025 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, oder das Gel nach dem Lauf in einer Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) gefärbt. Der Laufpuffer war mit dem Puffer im Gel identisch. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Probenpuffer gemischt. Je nach Gel- und Fragmentgröße wurde eine Spannung von 20-180 V an die Gelkammer angelegt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde ein UV-Transilluminator (302 nm) verwendet. Die Dokumentation und Auswertung der Gele erfolgte mit dem E.A.S.Y. System (Herolab, St. Leon Roth) und wurde durch einen Thermodrucker (Mitsubishi, Japan) ausgegeben.

### 2.2.4.2 Denaturierende Polyacrylamidgele für die automatische Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Nukleinsäuren wurde eine denaturierende Gelmatrix verwendet. Sie besteht aus einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid mit Zusatz von 50% Harnstoff. Harnstoff verhindert die Renaturierung der beiden DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrang. Für die automatische Sequenzierung mit dem ABI 373A wurden spezielle Gelplatten verwendet, die eine Abtastung der DNA-Fragmente mit einem Laser ermöglichen. Die Dicke des Geles betrug 0,3 mm, als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Vor dem Gießen des Geles wurden die Glasplatten mit Alconox und deionisiertem Wasser gereinigt und mit Isopropanol nachgewischt. Die Gellösung enthielt 4,5% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 50% Harnstoff, 1x TBE und HPLC-H<sub>2</sub>O. Die Polymerisation des Geles wurde durch Zugabe von 0,6% APS (10% in H<sub>2</sub>O) und 0,25 % TEMED gestartet. Die Polymerisationszeit betrug mindestens 1,5 h. Danach wurde ein Sägezahnkamm (0,3 mm) für 36 Spuren in das Gel eingesetzt. Die Vorlaufzeit betrug 1 h bei 38 W, 40 mA und 2500 V. Anschließend wurden die Proben in einem Volumen von 4 µl aufgetragen. Der eigentliche Lauf erfolgte bei 38 W, 40 mA und 2500 V. Die Laufzeit betrug 18 h.

## 2.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

### 2.2.5.1 Isolierung kleiner Fragmente aus Agarosegelen

Kleinere DNA-Fragmente bis zu einer Größe von ca. 1 500 bp wurden mit dem QIAquick (Qiagen, Hilden) Gel Extraktionskit nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen aufgereinigt. Alternativ zur QIAquick-Methode wurde für kleine Fragmente bis ca. 1000 bp der MICRO-PURE™ 0.22 Partikel-Separator (amicon, Witten) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

### 2.2.5.2 Elektroelution

Große DNA-Fragmente (> 1 500 bp) wurden durch Elektroelution aus Agarosegelen (0,7-1,0%; 1x TBE) aufgereinigt. Auf das Gel wurden 10-25 µg DNA aufgetragen. Um größere Volumina auftragen zu können, wurden 2 bis 3 einzelne Zinken eines 1 mm dicken Agarosegelkammes mit Tesafilm verbunden, wodurch eine größere Geltasche entsteht. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurde der Laufpuffer bis dicht unterhalb der oberen Gelkante abgesaugt und Pufferreste mit einem Papierhandtuch vorsichtig vom Gel entfernt. Direkt vor dem zu eluierenden Fragment wurde ein kleines, rechteckiges Loch, in der Breite der Geltasche, in das Gel geschnitten und mit 2,5x TBE gefüllt. Danach wurde wieder Spannung (max. 50 V) an die

Gelkammer angelegt. Mit einer UV-Handlampe (302 nm) wurde gelegentlich (kurz!) kontrolliert, ob das Fragment in die Puffertasche gewandert war. Wenn sich die überwiegende Menge des Fragmentes in der puffergefüllten Tasche befand, wurde der Puffer mit einer 1 ml Mikropipette entnommen. Zur Aufreinigung wurde der Puffer durch silanisierte Glaswolle filtriert und mit Phenol extrahiert (2.2.2.5). Die DNA wurde durch NaCl und Isopropanol (2.2.2.6) aus dem Puffer gefällt, 2 mal mit 70% EtOH gewaschen und in TE aufgenommen. Da UV-Licht DNA stark schädigt wurde darauf geachtet, daß die Bestrahlungszeiten nur so lang wie unbedingt nötig dauerten.

## **2.2.6 Klonierung**

Zur Konstruktion von neuen Plasmiden oder bei der Subklonierung von BAC-Enden wurden DNA Fragmente aus einem Plasmid, BAC oder genomischer DNA zur Vermehrung in neue Vektoren einligiert und klonal vermehrt (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1987).

### **2.2.6.1 Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase**

Um eine Religation des Plasmidvektors mit sich selbst bei einer Ligation zu vermeiden wurde am 5'-Ende der DNA die Phosphatgruppe abgespalten. Nach dem Restriktionsverdau des Vektors wurde 1/10 Volumen 1M Tris HCl pH 8,0 und 1U Alkalische Phosphatase (CIP) zum Ansatz gegeben. Anschließend wurde 15 min bei 37 °C und 15 min bei 56 °C inkubiert. Danach wurde noch einmal 1U CIP zugegeben und wieder unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Da sich das Enzym nur unzureichend durch Hitze inaktivieren läßt, wurde nach der Dephosphorylierung eine Phenolextraktion durchgeführt und der Vektor mit NaCl und Isopropanol gefällt. Bei Ligation von künstlich hergestellten Oligonukleotidlinkern wurde der Vektor nicht dephosphoryliert, da Oligonukleotiden die 5'-Phosphatgruppe fehlt und sonst keiner der beiden DNA-Einzelstränge ligiert würde.

### **2.2.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten**

Zu 0,2-0,5 µg Vektor-DNA wurde eine äquimolare Menge Insert-DNA, 1,5 µl Ligase-Puffer (10x) und 1 µl T4-Ligase (1 U/µl) gegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 15 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ligationsansatz 16 h bei 17 °C im Wasserbad inkubiert.



### 2.2.6.3 Linkerligation

Oligonukleotidlinker mit überhängenden Enden wurden durch Hybridisierung zweier komplementärer Oligonukleotide (Tabelle 13) hergestellt. Dazu wurden äquimolare Mengen der beiden Oligonukleotide gemischt, auf 100 °C erhitzt und langsam (max. 1-2 °C/min) abgekühlt. In einem Ansatz von 10 µl wurden 5 µg Vektor-DNA, 1,5 µg Oligonukleotidlinker, 1 µl Ligasepuffer (10x) und 1U T4-DNA-Ligase gemischt. Der Ligationsansatz wurde 16 h bei 17 °C inkubiert. Unligierte DNA-Linker wurden anschließend durch ein Microcon-100-Mikrokonzentrat (amicon, Witten), nach Anleitung des Herstellers, aus dem Ligationsansatz entfernt.

Oligonukleotid	Sequenz
LinkerA-upper	aattg cgcca tatgc gccgt a
LinkerA-lower	ggcgc atatg gcgc
LinkerB-upper	aattg cgggc ccata tggcg cgcgt gca
LinkerB-lower	cgcgc gccat atggg cccgc

Tabelle 13: Sequenz der Linker-Oligonukleotide

### 2.2.6.4 Ligation von Multimeren

2 µg des *HindIII* geschnittenen Fragmentes aus dem  $\alpha$ -Satelliten D7Z2 wurden mit 2 µl Ligasepuffer, 1 U T4 DNA-Ligase und H<sub>2</sub>O-MilliQ in einem Volumen von 19,5 µl gemischt und 10 min bei 22 °C inkubiert. Nach dieser Vorinkubation wurden 0,5 µl *HindIII* geschnittene Vektor-DNA [1 µg/µl; pBlueScriptIIKS(+)] zugegeben, gemischt und 16 h bei 17 °C inkubiert. In einem zweiten Ligationsansatz wurden 2 µl des vorinkubierten Ligationsansatzes ohne Vektor mit 1,8 µl Ligasepuffer, 0,5 µl *HindIII* geschnittener Vektor-DNA [1 µg/µl; pBlueScriptIIKS(+)], 1 U T4 DNA-Ligase und 14,5 µl H<sub>2</sub>O-MilliQ gemischt und ebenfalls 16 h bei 17 °C inkubiert.

Bei der Neukonstruktion von Plasmiden wurden bei der Ligation und Transformation immer zwei Kontrollen mitgeführt. Als Kontrollen dienten ein Ansatz mit Vektor-DNA ohne Insert und ein Ansatz nur mit Vektor-DNA, ohne Insert und T4-Ligase. Nur wenn auf den LB-Agarplatten mit der ligierten DNA mehr Bakterienkolonien wuchsen als auf den Platten der Kontrollen wurde von einer erfolgreichen Ligation ausgegangen und DNA präpariert.

### 2.2.6.5 Transformation

Zur Transformation wurden die *E. coli* Stämme DH10-B und Sure (2.1.9.3) verwendet. Elektrokompente Bakterien wurden zuvor wie unter 2.2.1.2 beschrieben hergestellt. Die Elektroporation wurde routinemäßig mit 100 pg bis 50 ng Plasmid-DNA durchgeführt. Zur Elektroporation mußte die eingesetzte DNA frei von Detergens, Phenol, Ethanol und Salzen sein. Daher wurde der Puffer in dem sich die DNA aus einem Ligationsansatz befand zuvor mit einem Microcon-50-Mikrokonzentrador (amicon, Witten), nach Anleitung des Herstellers, gegen MilliQ-H<sub>2</sub>O ausgetauscht. Zur Transformation wurden 80 µl kompetente Bakterien 1 min vor der Elektroporation mit der DNA gemischt, in eine spezielle Elektroporationsküvette (2 mm) eingefüllt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation fand bei 2500 V, 25 µF, 20 Ω und 5 ms in einem EASYJECT Plus Elektroporator statt. Direkt nach dem elektrischen Impuls wurden die Zellen in 1 ml S.O.C.-Medium überführt und 0,5 h bei 37 °C inkubiert. Diese Suspensionskultur wurde auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Auf ampicillinhaltigen Platten können nur solche Bakterien anwachsen, die ein Resistenzgen-enthaltendes Plasmid aufgenommen haben, womit eine Selektion transformierter Bakterien möglich ist. Zur Vermehrung von Plasmiden wurden Einzelkolonien in 5 ml Übernachtskulturen überimpft und kultiviert.

### 2.2.7 Nukleinsäuretransfer auf Nylonmembranen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente müssen als Template für Hybrisierungsexperimente auf einer geeigneten Trägermembran immobilisiert werden (Southern, 1975). Als Träger wurden Nylonmembranen (Biodyn A; 0,2 µm) verwendet, da diese reißfester als die von Southern ursprünglich benutzten Nitrozellulosemembranen sind. Zusätzlich können sie nach dem Quervernetzen (Crosslinking) der Nukleinsäuren mit der Membran mehrfach verwendet werden.

#### 2.2.7.1 DNA-Transfer durch aufwärtsgerichteten, alkalischen Kapillartransfer

(modifiziert nach Southern, 1975; Sambrook et al., 1989)

Beim alkalischen Kapillartransfer wird ein salzhaltiger, alkalischer Puffer aus einem Reservoir durch Kapillarkräfte durch Gel und Membran gezogen. Dabei wird durch den Pufferstrom die DNA aus dem Gel transportiert. Die Membran ist für geladene Makromoleküle undurchlässig, so daß die DNA an ihrer Oberflächen zum Liegen kommt. Durch Erhitzen oder UV-Querver-

netzen wird die DNA anschließend kovalent an die Membran gebunden.

Bei dem verwendeten Versuchsaufbau diente eine flache Kunststoffschale als Reservoir. In die Schale wurde ein großes etwa 3 cm dickes Schaumstoffstück gelegt, und die Schale mit Denaturierungspuffer bis unter die obere Kante des Schaumstoffes aufgefüllt. Auf den Schaumstoffschwamm wurde anschließend ein Whatman-Papier, welches 1 cm breiter und 1 cm länger als das verwendete Agarosegel war, aufgelegt. Nachdem sich das Papier gleichmäßig mit Puffer vollgesaugt hatte, wurde das Agarosegel darauf gelegt. Damit der Puffer nicht am Gel vorbei aufgesaugt werden konnte, wurde zur Abdichtung unter alle vier Kanten des Geles, 2 bis 3 mm tief, ein 6 cm breiter Parafilmstreifen geschoben. Auf das Gel wurde anschließend ein gelgroßes Stück angefeuchteter Nylonmembran luftblasenfrei aufgelegt und mit einem gleich großen Whatman-Papier abgedeckt. Danach wurde eine 10 cm bis 15 cm dicke Schicht Zellstoff aufgetürmt, mit einer Glasplatte abgedeckt und zusätzlich mit einem Gewicht von etwa 500-700 g beschwert. Nach 12-20 h wurden Gewicht, Glasplatte und die durchfeuchteten Papiertücher von der Membran genommen und mit einem Bleistift die Position der Geltaschen markiert. Die Membran wurde abgenommen, 5 min in 2x SSC gespült und getrocknet. Danach wurde die DNA durch UV-Quervernetzung ( $120 \text{ mJ/cm}^2$ , bei 254 nm) in einem UV-Stratalinker an die Membran gebunden.

### 2.2.7.2 Vakuum-Transfer von DNA

Eine schnelle Methode zum Transfer von DNA ist das Vakuum-Blot-Verfahren. Dabei wird der Transferpuffer mit einer Vakuumpumpe durch das Gel gesaugt. Während dieses Vorgangs wird so die DNA mit dem Puffer auf eine Nylonmembran transportiert. Auf die angefeuchtete Fritte der Vakuum-Blot-Apparatur wurde die mit  $\text{H}_2\text{O}$  angefeuchtete Nylonmembran (in Gelgröße) aufgelegt und mit einer Plastikschablone die nichtbedeckten Anteile der Fritte abgedeckt. Dabei war die Aussparung der Plastikfolie etwas kleiner als die Nylonmembran. Anschließend wurde der Rand der Apparatur mit dem Dichtungsring aufgesetzt und verschraubt. Das Gel wurde vorsichtig und blasenfrei auf die Membran aufgelegt, so daß das Gel die Aussparung der Plastikschablone verdeckte. Danach wurde unterhalb der Fritte ein Vakuum (40 bis 50 mm  $\text{H}_2\text{O}$ ) aufgebaut. Das Gel wurde zum Transfer der DNA nacheinander mit vier verschiedenen Lösungen überschichtet. Zuerst wurde 10 min lang 0,25 N HCl durch das Gel gesaugt um das Zucker-Phosphat Rückgrad der DNA an einigen Stellen zu brechen und somit den Transfer zu beschleunigen. Anschließend wurde 15 min mit Denaturierungspuffer und 15 min mit Neutralisierungspuffer überschichtet. Die DNA-Einzelstränge wurden danach durch Überschichten mit 20x SSC

für 45-60 min auf die Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran 5 min in 2x SSC gewaschen und anschließend die DNA durch UV-Quervernetzung (120 mJ/mm<sup>2</sup> bei 254 nm) an die Membran gebunden.

## 2.2.8 DNA-Markierung (radioaktiv)

### 2.2.8.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch “random primed oligonucleotid labeling”

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde der DNA-Labeling Kit 1.1 der Firma Fermentas verwendet. Zu 100 ng DNA wurde 10 µl Reaktionspuffer mit Hexanukleotiden gegeben, auf 43 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend sofort auf Eis inkubiert, um ein Renaturieren der DNA-Einzelstränge zu verhindern. Nach dem Abkühlen wurden 3 µl Mix C (dATP, dGTP, dTTP), 3-5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP und 1U Klenow-Fragment zugegeben und bei 37 °C 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt und die nichteingebauten freien Nukleotide mit einer Nick-Säule abgetrennt (2.2.8.3).

### 2.2.8.2 Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden

Durch das Enzym T4-Polynukleotidkinase wird die randständige, radioaktive Phosphatgruppe von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP zur radioaktiven Markierung auf das 5'-Ende von Oligonukleotiden übertragen.

Zu 100 ng Oligonukleotiden wurden 3 µl *5x forward reaction buffer*, 3-5 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, 5 U T4-Polynukleotidkinase gegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 15 µl aufgefüllt. Die Markierungsreaktion wurde 30 min lang bei 37 °C durchgeführt. Nach der Reaktion wurde auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und die freien Nukleotide mit einer Nick-Säule abgetrennt.

### 2.2.8.3 Entfernung freier Nukleotide

Nichteingebaute Nukleotide wurden durch eine Sephadex G-50-Säule (Nick-Säule) aus dem Reaktionsansatz entfernt. Dazu wurde die Säule zuerst mit 2 ml H<sub>2</sub>O equilibriert. Danach wurde der Markierungsansatz in einem Volumen von 50 µl auf die Säule aufgetragen und mit 400 µl H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Elution der markierten Fragmente wurden nochmals 400 µl H<sub>2</sub>O auf die Säule gegeben und das Eluat in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß aufgefangen.

## 2.2.9 DNA-Hybridisierung

### 2.2.9.1 Hybridisierung

Vor der Hybridisierung von markierten DNA-Fragmenten auf immobilisierte DNA wurde der verwendete Nylonfilter mit 100  $\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung (mit 100  $\mu\text{g/ml}$  hsDNA) pro  $\text{cm}^2$  Membranfläche luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und bei 65 °C 30-60 min im Wasserbad vorhybridisiert. Zum Hybridisieren wurde die Hybridisierungslösung aus dem Beutel abgossen und die markierte DNA-Sonde in 30-40  $\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung pro  $\text{cm}^2$  Membranfläche gegeben. Anschließend wurde die Lösung zurück in den Plastikbeutel gegeben, luftblasenfrei eingeschweißt und bei 65 °C 16 h hybridisiert.

Bei der Hybridisierung von markierten Oligonukleotiden (Tabelle 14) wurde an Stelle der Hybridisierungslösung eine spezielle Primerhybridisierungslösung verwendet. Die Hybridisierungstemperatur ergab sich aus dem Schmelzpunkt  $T_m$  des Oligonukleotides -5 °C (Hames und Higgins, 1985).

Primer	Sequenz	$T_m$
SP6 Promotor	tattt aggtg acact atag	50 °C
T7 Promotor	taata cgact cacta taggg	56 °C

**Tabelle 14: Für Hybridisierungen verwendete Promotorprimer**

### 2.2.9.2 Waschen der Nylonfilter und Autoradiographie

Da sich nach der Inkubation mit der Hybridisierungslösung unspezifisch gebundene DNA an der Membran befindet, muß der Filter unter Bedingungen gewaschen werden, die unspezifisch gebundene DNA entfernen, spezifisch hybridisierte jedoch auf dem Filter lassen. Dazu wurden die Filter wie folgt gewaschen: 1 min bei RT in 200  $\mu\text{l/cm}^2$  mit Waschlösung I, 5 min bei RT mit 400  $\mu\text{l/cm}^2$  Waschlösung I, 5 min bei RT mit 400  $\mu\text{l/cm}^2$  Waschlösung II und 3-20 min bei 65 °C mit 400  $\mu\text{l/cm}^2$  Waschlösung II.

Unspezifisch gebundene Primer wurden unter folgenden Bedingungen vom Filter gewaschen: 1 min bei RT mit 200  $\mu\text{l/cm}^2$  Waschlösung III, 5 min bei RT mit 400  $\mu\text{l/cm}^2$  Waschlösung III und 30 s bis 5 min bei RT mit 400  $\mu\text{l/cm}^2$  Waschlösung II.

Nach jedem Waschschrift wurde die Radioaktivität auf dem Filter und im Waschpuffer mit dem Handmonitor gemessen und so das Abwaschen unspezifischer DNA verfolgt. Die fertig gewaschenen Filter wurden kurz zwischen zwei Papiertüchern getrocknet und in Frischhaltefolie eingepackt. Die Membranen wurden je nach Aktivität für 5-120 min auf eine Platte des Phos-

phorimagers aufgelegt, und anschließend wurde die Platte in einem Fujix BAS 1000 Phosphorimager gelesen und mit der Software Tina ausgewertet. Danach wurden die Filter auf einem Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bis zu 1 Woche exponiert.

### 2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz. Zum Kopieren der DNA wird eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. *Thermophilus aquaticus*; *Taq*-Polymerase) verwendet. Alle bekannten DNA-Polymerasen brauchen zum Duplizieren eines DNA-Einzelstranges eine kurze doppelsträngige Startersequenz (Primer), die der Reaktion als künstlich synthetisierte Oligonukleotide zugegeben werden. Die beiden Oligonukleotidprimer stammen aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz und sind komplementär zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge. Zusätzlich werden zur Verlängerung der Primer eine ausreichende Menge an Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) und ein entsprechendes Milieu benötigt. Ein Amplifikationszyklus besteht aus drei Schritten. Im ersten wird der DNA-Doppelstrang durch Erwärmung auf bis zu 95 °C denaturiert, ohne daß die Polymerase dabei inaktiviert wird. Im zweiten Schritt wird die Temperatur soweit abgesenkt, daß die beiden Primer möglichst spezifisch an ihre komplementäre Zielsequenz binden können (Annealing) und im dritten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf die für die Polymerase optimale Arbeitstemperatur von ca. 70 °C gebracht (Elongation). Nachdem die Polymerase die beiden Primer ausreichend verlängert hat, kann sich ein weiterer Zyklus anschließen. Die beiden neu synthetisierten DNA-Doppelstränge dienen dabei als Matrize. Ab dem dritten Zyklus befinden sich hauptsächlich DNA-Matrizen definierter Länge in dem Reaktionsgemisch. Die Reaktion wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Initialdenaturierung	3 min	94 °C
Denaturierung	1 min	94 °C
Annealing	1 min	52 bis 62 °C
Elongation	1 min	72 °C
Anzahl der Zyklen = 35 (Denaturierung, Annealing, Elongation)		
Abschließende Synthese	5 min	72 °C

Um eine Elongation der Primer unter unspezifischen Bedingungen vor Reaktionsbeginn zu erschweren, wurden die Reaktionsansätze auf Eis pipettiert. Nach Abschluß der Reaktion wurden die Proben auf 4 °C gekühlt.

Das Gesamtvolumen betrug 25  $\mu\text{l}$  bzw. 50  $\mu\text{l}$  und der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Pipettierschema zusammengestellt:

<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>50 <math>\mu\text{l}</math></b>
PCR-Reaktionspuffer 10x <sup>§</sup>	2,5 $\mu\text{l}$	5,0 $\mu\text{l}$
dNTPs 20mM	0,25 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase	0,5 U	1 U
je Primer	50 ng	100 ng
DNA	50-100 ng <sup>*</sup> / 10 ng <sup>#</sup> / 1 $\mu\text{l}$ <sup>‡</sup>	
H <sub>2</sub> O (HPLC oder MilliQ)	ad. 25 $\mu\text{l}$	ad. 50 $\mu\text{l}$

§ CEPH (Dib et al., 1996)

\* genomische DNA aus eukaryontischen Zellen

# YAC- oder BAC-DNA

‡ genomische DNA aus selektionierten Zellklonen (3.3.4 und 2.2.13.3)

### 2.2.10.1 Primer für die Amplifikation genomischer DNA-Fragmente

Alle verwendeten Primerpaare (Tabelle 15, 16 und 17) wurden zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente aus genomischer DNA oder aus Klonmaterial wie YACs und BACs verwendet. Die meisten dieser Primerpaare amplifizieren Sequenzen, die im Genom nur einmalig vorkommen und daher als Ankerpunkte zur Kartierung geeignet sind. Die nichtexprimierten Sequenzen nennt man auch *sequence-tagged sites* (STSs). Die aus der Arbeit von Dib et al. (1996) stammenden Primerpaare umfassen kurze (AC)<sub>n</sub>-Repeats (Mikrosatelliten). Die Länge dieser kurzen Sequenzwiederholungen ist in der Bevölkerung polymorph. Mit Hilfe sogenannter informativer Familien und 5264 dieser hochpolymorphen Mikrosatelliten wurde von den Autoren, eine genetische Karte des menschlichen Genoms erstellt.

Neben diesen nicht exprimierten Sequenzen gibt es auch Marker, die aus c-DNA Bibliotheken stammen. Diese werden dann *expressed sequence tagged sites* (ESTs) genannt. Solche Marker (z.B. STSG-10191) werden ebenfalls zur Erstellung genomischer Karten herangezogen. Sie sind dabei aber nicht nur Ankerpunkte sondern geben gleichzeitig die Position exprimierter Sequenzen im Genom an.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden nach den Mengenangaben der Hersteller in HPLC-H<sub>2</sub>O (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gelöst oder nach dem Lösen mit dem Photometer quantifiziert. Zur Anwendung wurden die Primer zuvor mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt.

Locus	Primer	Sequenz [5'→3']	Produkt -länge [bp]	T [°C]
D7S499 <sup>#</sup>	AFM191xh6 f AFM191xh6 r	gcagg ctcag taagt ggttg cctaa gttgg ggatt atctg tc	236-252	59
D7S494 <sup>#</sup>	AFM165zf4 f AFM165zf4 r	cctgg gtgac agaga ttctt aatcc tgttg ttatt aactt ggttt	173-191	55
D7S473 <sup>‡</sup>	549 550	tgcag tgagt tgtgt tcaact gatct cattt ttttg tttga ta	130-144	59
D7S2429 <sup>#</sup>	AFMa153tf5 f AFMa153tf5 r	cagtg ctgga gttgt tcaag ctggg agtca agtgt tttgg	173-183	59
D7S2793 <sup>§</sup>	WI9137 f WI9137 r	cctgg gtttt gtggg catct cagta gcgac tttca tgcca	166-198	57
¢	GATA P19301 f GATA P19301 r	gggca acaaa gtgaa aact gtatt ctggt ccccc aggac	157	58
D7S520 <sup>#</sup>	AFM240ve9 f AFM249ve9 r	caaca ggtcc aggct atgtc tatcc ataca cacca tgcca	79-97	55
D7S2512 <sup>#</sup>	AFMc002zb1 f AFMc002zb1 r	agcta ttatc ttgct gtggc tggg gaaca tcacc tgggg ggc	218-236	60
D7S2549 <sup>#</sup>	AFMa055xg9 f AFMa055xg9 r	tcagt agggg tcagg ca ctgtg taaca tttgt cacta tcca	238-259	57
D7S482 <sup>#</sup>	AFM070yc1 f AFM070yc1 r	tggct cacgt ctgga a tgtgg ctggc taatt tg	166-198	59
D7S2503 <sup>#</sup>	AFMb346vf9 f AFMb346vf9 r	ccaat tccag gaagg ctc ttggt aatac tacgt gccag g	173-197	60
D7S502 <sup>#</sup>	AFM199vh8 f AFM199vh8 r	ggaag gtatg ttgcg g taagc cacca agaac acc	273-291	57
*	13-1H 13-1I	gtaga atctg caagg gaa gcttt gagtc ctatt tcc		56
*	5-16D 5-16H	tggac atttg gagcc ttg tctca cagag ttgga aat		52
*	16A 16B	tcaaa actgc tctat caa ttctg acacc catca ttg		53
*	L1R	catgg cacat gtata catat gtaa		54

**Tabelle 15: PCR-Primer aus der Region 7cen**

(#) Dib et al., 1996; (‡) GDB 186722; (§) WICGR; (¢) CHLC; (\*) Wevrick et al., 1992. (¢ und \*: Primer haben kein Locuseintrag bei GDB)

Der Primer L1R wurde zusammen mit dem Primer 16B verwendet.



Primer	Sequenz [5'→3']	Produktlänge [bp]	Position	T [°C]
7c23_sp6 f 7c23_sp6 r	ttcct cctcc ttccc cac ggagt gcttg aagcc aagag	338	2048-2386	60
hsp01 f hsp01 r	ggagg agtgg tcgca gtg gttga catcc aggga cacg	190	366-555	56
hsp02 f hsp02 r	cgtgt ccttg gatgt caac tgcta gcctc ctctt ctcc	119	537-655	62
STSG-10191-1 STSG-10191-2	ctttc cttgg cggca gtctc tttcc tcctc cctgt ccc	161	1548-1708	62

**Tabelle 16: Primer für das Gen HSPB1**

Die vorletzte Spalte gibt die Position des PCR-Produktes in der publizierten genomischen Sequenz an. Locus HUMHSP27X, GenBank Acc.Nr.: L39370, X03900.

Locus	Primer	Sequenz [5'→3']	Produkt- länge [bp]	T [°C]
D7S659 <sup>#</sup>	AFM276yg1a AFM276yg1m	ctgca tctct tgaaa tcgg cactg cacct ggcct aa	191-215	59
D7S531 <sup>+</sup>	D7S531neu/af D7S531neu/b	catcc tgggg aagat gagtg g gtggt tagat gagtg cggga c	117	60

**Tabelle 17: andere PCR-Primer**

(#) Dib et al., 1996; (+) Primerpaar für den Locus D7S531.

### 2.2.11 DNA-Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzierung wurde das sogenannte *Cycle Sequencing*, eine Modifikation des von Sanger et al. (1977) entwickelten statistischen Kettenabbruch-Verfahrens verwendet. Bei dieser enzymatischen Methode wird eine DNA-Polymerase verwendet, die einen DNA-Einzelstrang zu einer doppelsträngigen DNA ergänzt. Der Reaktion werden neben dem benötigten Primer und den 2'-Desoxyribonucleosid-Triphosphaten (dNTP) auch eine geringere Menge 2',3'-Dideoxyribonucleosid-Triphosphate (ddNTPs) zugegeben. Baut die DNA-Polymerase ein ddNTP an Stelle eines dNTPs in den neuen Strang ein, bricht die Synthese an dieser Stelle ab, da den ddNTPs eine freie 3'-Hydroxylgruppe, die zur Verlängerung des neu synthetisierten DNA-Stranges benötigt wird, fehlt. Es kommt daher zu einem Gemisch verschieden langer DNA-Stränge, die auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel oder einer anderen hochauflösenden Matrix aufgetrennt werden können. Beim *Cycle Sequencing* wird eine thermostabile *Taq*-Polymerase verwendet, so daß wie bei einer PCR mehrere Syntheszyklen möglich sind. Da nur ein Primer verwendet werden kann, kommt es nur zu einer linearen Anhäufung der neu synthetisierten DNA-Stränge, es kann jedoch mit einer geringeren Menge an DNA-Template als beim klassischen Sanger-Sequenzieren gearbeitet werden.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurde das ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing* Verfahren benutzt. Es verwendet Fluoreszenzmarkierte ddNTPs zur Termination der Strangsynthese. Jedes der vier ddNTPs ist dabei mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert: ddATP mit JOE, ddGTP mit FAM, ddTTP mit TAMRA und dCTP mit ROX.

Auftrennen und Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines ABI373A DNA-Sequenzierers. Dieser Sequenzierer trennt die verschieden langen DNA-Fragmente auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel und tastet sie mit einem 488 nm Argon-Laser ab. Dabei emittiert jeder der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Licht einer unterschiedlichen Wellenlänge, das über eine Photozelle detektiert wird. Um die Emissionsspektren der verschiedenen Farbstoffe besser zu unterscheiden, werden Filter der Wellenlängen 540 nm, 560 nm, 580 nm und 600 nm (Filterrad A) verwendet.

Die Sequenzreaktion wurde mit dem ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* durchgeführt. Es enthält einen Mix, in dem neben den schon erwähnten Terminatoren dITP (statt dGTP), dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl (pH 9.0), MgCl<sub>2</sub>, thermostabile Pyrophosphatase und AmpliTaq DNA-Polymerase FS kombiniert sind. 200 ng Plasmid-DNA wurden mit 1 µl Primer (3,2 pmol in HPLC-H<sub>2</sub>O) und 8 µl des Dye-Terminator-Mixes ver-

mischt, mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und zur Sequenzreaktion in den Thermozykler (GeneAmp PCR System 2400 oder 9600) gegeben. Es wurde das folgende Programm zum Sequenzieren verwendet:

Initialdenaturierung	4 min	96 °C
Denaturierung	10 s	96 °C
Annealing	5 s	55 °C
Elongation	4 min	60 °C
Anzahl der Zyklen = 25 (Denaturierung, Annealing, Elongation)		
Abschließende Synthese	4 min	60 °C

Als Sequenzierprimer wurden die Primer M13 und M13r (Tabelle 18) verwendet.

Primer	Sequenz [5'→3']
M13	gtaaa acgac ggcca gt
M13r	ggaaa cagct atgac catg

Tabelle 18: Sequenzierprimer

### 2.2.11.1 Sequenzierung der BAC-Enden

Da sich die direkte Sequenzierung von BACs aufgrund ihrer Größe und der oftmals nicht unerheblichen Verunreinigung mit genomischer Bakterien-DNA meist schwierig gestaltet, wurden die Endfragmente des BACs 7c23 in das Plasmid pBlueScriptIIKS(+) subkloniert. Dazu wurde DNA des BACs wie unter 2.2.2.3 beschrieben präpariert, mit den Enzymen EcoRI und NotI gespalten und anschließend in pBlueScriptIIKS(+) eingefügt. Bakterienklone, die Endfragmente enthielten, wurden durch Primerhybridisierung mit T7- und Sp6-Primern identifiziert. Als Sequenzierprimer wurde der M13-Primer, der an den M13-Promotor von pBlueScriptII bindet, verwendet.

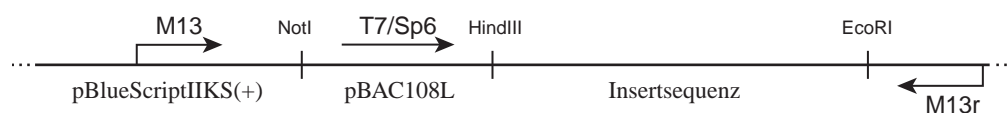


Abbildung 8: Übersicht über die Sequenzabfolge bei der Sequenzierung der BAC-Enden

Die genomische DNA ist über die Schnittstelle *HindIII* in den Vektor pBAC108L kloniert worden. Bei einem *EcoRI* / *NotI*-Doppelverdau fällt ein Fragment aus dem Vektor, welches neben der Insertsequenz auch den Sp6- bzw. T7- Promotor des Vektors enthält.

## 2.2.12 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Maus-Mensch Hybridzelllinien Ru Rag 14-4-7-44-7 und Ru Rag 6-20-12 wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 20% FKS bei 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C und 90% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert.

### 2.2.12.1 Routinekultur

Ständiges Wachstum und ständige Proliferation von in Kultur gehaltenen Zellen machen es notwendig, diese regelmäßig auszudünnen und verbrauchtes Medium gegen neues zu ersetzen. Die in 250 ml Kulturflaschen gehaltenen Zellen wurden bei normalem Wachstum etwa alle 3-5 Tage passagiert. Vor dem Ablösen der Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA wurde das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen. Bei beginnender Ablösung des Zellrasens wurden 5 ml Medium dazugegeben und die Zellen durch Spülen mit der Pipette von dem Kulturgefäß gelöst. Danach wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 900 Upm abzentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt, und die Zellen wurden in neuem Medium vorsichtig durch auf und ab pipettieren resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend auf neue Kulturflaschen ausgesät. Dabei wurden die Zellen etwa 1:3 verdünnt.

### 2.2.12.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Aus je einer 250 ml Kulturflasche wurde die Zellmenge für 1-2 Einfrierampullen gewonnen. Dazu wurden die Zellen abtrypsiniert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 900 Upm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und in 0,5 bis 1 ml Medium resuspendiert, und unter leichtem Schwenken wurde die gleiche Menge Einfriermedium (*Cryoprotective Medium*) tropfenweise zugegeben (Endkonzentration 7,5% DMSO). Die Zellsuspension wurde danach in Einfrierampullen gefüllt und auf Eis gekühlt. Zum langsamen Einfrieren wurden die Zellen in einem Styroporbehälter gegeben und zunächst bei -80 °C eingefroren. Nach mindestens 24 h auf -80 °C wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben. Zellen aus 12-Loch-Schalen wurden direkt nach dem Abtrypsiniere in 200 µl Medium resuspendiert. Zur Suspension wurde anschließend das gleiche Volumen Einfriermedium zugegeben. Danach wurden die Zellen mit dem Medium in Einfrierampullen überführt und bei -80 °C eingefroren.

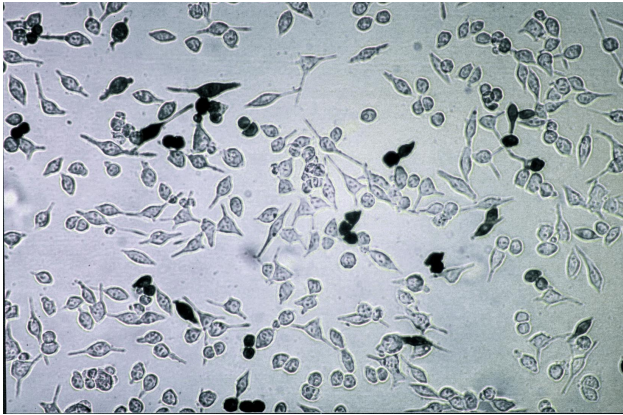
### 2.2.12.3 Auftauen von Zellen

Die Zellsuspension wurde zügig bei 37 °C aufgetaut und unmittelbar danach langsam in 30 ml kaltes Medium getropft. Danach wurden die Zellen bei 900 Upm abzentrifugiert und das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend in frischem Medium aufgenommen und auf neue Kulturgefäße ausgesät.

### 2.2.12.4 Transfektion eukaryontischer Zellen durch Elektroporation

Zur Transfektion von eukaryontischen Zellen wurde die Methode der Elektroporation gewählt. Die Elektroporation wurde mit einem Easyject™ plus in Küvetten mit 4 mm Plattenabstand nach dem Protokoll von Baum et al. (1994) durchgeführt. Bei diesem Protokoll bleiben unabhängig von der Zelllinie die Einstellungen des Elektroporators bis auf die Spannung konstant. Die Kapazität wird dabei auf 1050 µF und der innere Widerstand des Gerätes auf R= unendlich gestellt. Die Spannung wird zur Optimierung der Transformationseffizienz von 220 V bis zu 300 V in 20 V Schritten erhöht.

Zur Elektroporation wurden die Zellen abtrysiniert und in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen in DMEM mit 20% FKS aufgenommen. 400 µl Zellsuspension wurden mit 10 µg Plasmid- und 10 µg *carrier* DNA (pBlueScriptIIS(+)) gemischt und in die Küvette gefüllt. Danach wurde die Küvette in den Elektroporations-Apparat gestellt und anschließend wurde der Stromimpuls appliziert. Die Zellen wurden unmittelbar danach auf 94/16 mm Zellkulturschalen in 10 ml DMEM 20% FKS ausplattiert. Zur Optimierung der Transformationseffizienz wurde der β-Galaktosidaseexpressionsvektor pcDNA3.1/His B/lacZ transfiziert und nach 24 h wurden die transfizierten Zellen angefärbt und ausgezählt (Abbildung 9). Bei einer Spannung von 260 V ergab sich ein Maximum an transfizierten Zellen, ca. 10% der überlebenden Zellen (Abbildung 9). Daraufhin wurden alle weiteren Transfektionen der Zelllinie RR14 bei 260 V, 1050 µF und R= unendlich durchgeführt.



**Abbildung 9:  $\beta$ -Gal-Expression in transfizierten Zellen**

Um die Effizienz der Transfektion durch Elektroporation zu ermitteln wurde der  $\beta$ -Galaktosidaseexpressionsvektor pcDNA3.1/His B/lacZ in Zellen der Linie RR14 eingebracht und anschließend die Zellen *in situ* angefärbt. Bei Verwendung von  $5 \times 10^6$  Zellen und einer DNA-Menge von  $10 \mu\text{g}$  Plasmid- und  $10 \mu\text{g}$  Carrier-DNA (unspezifische Plasmid-DNA) bei den Einstellungen 260 V,  $1050 \mu\text{F}$  und  $R = \infty$  des Elektroporators ergab sich ein Optimum der Transfektionseffizienz. Etwa 10% der Zellen zeigten nach 24h eine nachweisbare  $\beta$ -Galaktosidaseexpression (dunkelblaue Zellen).

### 2.2.12.5 Färbung von $\beta$ -Galaktosidase positiven Zellen

Zum Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden die Zellen 24 h nach der Transformation angefärbt (Abbildung 9). Dazu wurde das Kulturmedium von der 94/16 mm Kulturschale abgesaugt und der Zellrasen 2 mal mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 5 ml 2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd in PBS, pH 7,3, 10 min lang bei RT fixiert. Das Fixativ wurde abgesaugt und die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml X-Gal-Reagenz überschichtet und bei RT 16 h auf der Zellkulturschale inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zur Auswertung im Durchlichtmikroskop betrachtet. Die mit dem Vektor pcDNA3.1/His B/lacZ transfizierten Zellen waren blau angefärbt, da durch das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase der Farbstoff umgesetzt wurde. Der prozentuale Anteil transfizierter Zellen wurde durch Auszählen eines repräsentativen Feldes ermittelt.

### 2.2.13 Die Selektion transfizierter Zellen

#### 2.2.13.1 Selektion mit Geneticin, G418

Die zur vollständigen Selektion notwendige Geneticinkonzentration wurde nach Anleitung des Herstellers bestimmt. 200 bis 500 RR14-Zellen wurden in 2 ml DMEM 20% FKS mit unterschiedlichen Konzentrationen ( $100$ - $1000 \mu\text{g/ml}$ ) G418 ausplattiert. Nach 10-14 Tagen wurde das Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop analysiert. Bei einer Konzentration von  $600 \mu\text{g/ml}$  G418 wurde das Wachstum nicht transfizierter Zellen komplett blockiert.

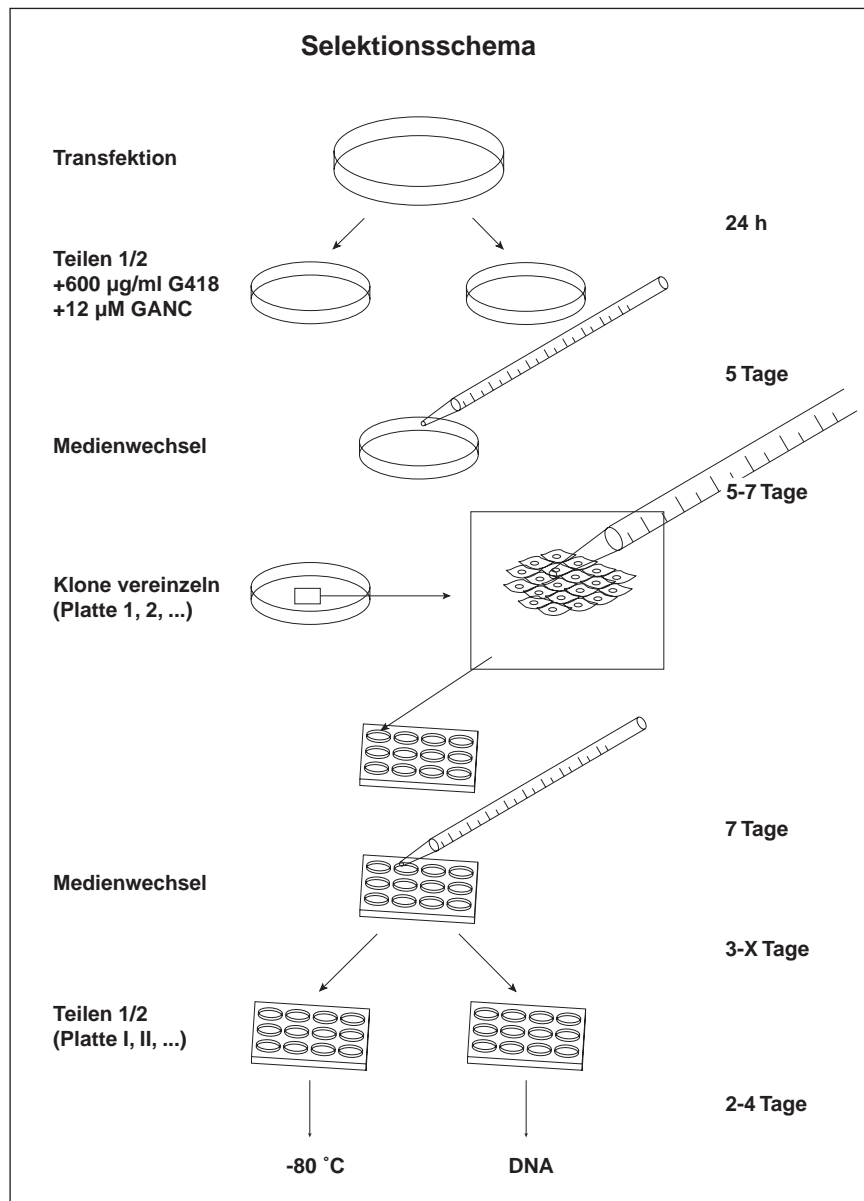
### 2.2.13.2 Selektion mit Gancyclovir, Cymeven (GANC)

Gancyclovir unterdrückt das Wachstum von Zellen, die die HSV-Thymidinkinase exprimieren. Eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  GANC ist dabei ausreichend, um das Wachstum von HSV-*tk* positiven embryonalen Stammzellen der Maus zu unterbinden (Ausubel et al., 1987; Mansour et al., 1988). Um die notwendige GANC-Konzentration bei der Zelllinie RR14 zu ermitteln, wurde die Zelllinie mit dem Vektor pPNTel transfiziert und mit G418-haltigem Medium selektioniert. Nach der Selektion wurden die stabil transfizierten HSV-*tk*<sup>+</sup>-Zellen und untransfizierte Zellen ausplattiert und unterschiedliche Mengen GANC zum Medium zugegeben. Das Wachstum der Zellen wurde täglich unter dem Mikroskop beobachtet. Nach ca. 1 Woche waren auf Platten mit HSV-*tk*<sup>+</sup>-Zellen, wenn das Medium mindestens 5 mM GANC enthielt, keine lebenden Zellen mehr zu beobachten, während bei untransfizierten Zellen keine Wachstumsinhibition stattfand.

### 2.2.13.3 Selektion und Kultivierung einzelner Zellklone

Zur Erzeugung von Chromosomenbrüchen wurde die Zelllinie RR14 mit dem Vektor pPNTelD7Z2(+) transfiziert und in 10 ml DMEM mit 20% FKS auf 94/16 mm Kulturschalen ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst und mit 5 ml Medium ab gespült. Die Zellen wurden bei 900 Upm abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in DMEM mit 20% FKS, 600  $\mu\text{g/ml}$  G418 und 12  $\mu\text{M}$  GANC aufgenommen und auf neue Kulturschalen im Verhältnis 1:2 ausgesät. Nach 5 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde das Medium durch 10 ml frisches Selektionsmedium (DMEM mit 20% FKS, 600  $\mu\text{g/ml}$  G418, 12 mM GANC) ersetzt und weitere 5-7 Tage inkubiert. Nach 10 bis 12 Tagen der Selektion wuchsen die überlebenden Zellen in kleinen Zellhaufen. Daraufhin wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und mit 5 ml vorgewärmten DMEM mit 20% FKS gewaschen. Die Kulturschale wurde anschließend mit 3-4 ml DMEM 20% FKS befüllt, so daß die Zellen gerade mit Medium bedeckt waren. Die einzelnen Zellklone wurden unter sterilen Bedingungen mit einer 20  $\mu\text{l}$  Mikropipette vom Boden der Kulturschale gelöst und in 12-Loch-Zellkulturschalen mit 1 ml frischem Selektivmedium pro Vertiefung überführt. Nach weiteren 7 Tagen Inkubation wurde das Medium gewechselt und die Zellen nochmals 3-10 Tage im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellklone täglich begutachtet und dicht bewachsene Kulturen auf neue 12-Loch-Kulturschalen überführt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen. Die Zellen wurden danach mit 20  $\mu\text{l}$  Trypsin/EDTA vom Boden der Schalen abgelöst, in 2 ml frischem DMEM mit 20% FKS (mit 600  $\mu\text{g/ml}$  G414 und 12  $\mu\text{M}$  GANC) aufgenommen und 1:2 auf zwei neue 12-Loch-Kulturscha-

len ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen waren die Zellen soweit herangewachsen, daß sie den Boden der Kulturschalen fast vollständig bewuchsen. Daraufhin wurden die Zellen der einen 12-Loch-Kulturschale eingefroren und aus den Zellen der anderen Platte mit den identischen Klonen DNA extrahiert.



**Abbildung 10: Selektionsschema**

Nach 24h wurden die transfizierten Zellen 1:2 geteilt und mit Medium, welches  $600\text{ }\mu\text{g/ml}$  G418 und  $12\text{ }\mu\text{M}$  Gancyclovir enthielt, kultiviert. Nach 5 Tagen wurde ein weiterer Medienwechsel durchgeführt. Nach 11-13 Tagen der Selektion wuchsen überlebende Zellen in kleinen Zellhaufen. Solche einzelnen Zellklone wurden mit einer Pipettenspitze vorsichtig vom Boden der Kulturschale gelöst und in vorbereitete 12-Lochplatten überführt. Nach 7 Tagen wurde das Medium in den Platten durch frisches Selektionsmedium ersetzt. Nach weiteren 3 bis 10 Tagen wurden dicht gewachsene Zellklone 1:2 auf zwei unterschiedliche Platten geteilt. Nachdem beide Platten nach 2 bis 4 Tagen konfluent bewachsen waren, wurden die Klone der einen Platte zur Lagerung und späteren Verwendung eingefroren und aus den Zellen der zweiten Platte, mit den identischen Klonen, DNA extrahiert, die zur Analyse der Klone benötigt wurde.



### 2.2.14 Chromosomenpräparate von Hybridzelllinien

Um aus den Maus-Mensch-Hybridzellen Chromosomenpräparate für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung herzustellen, wurden ein bis zwei 250 ml Zellkulturflaschen subkonfluent angezchtet. Da sich die Zellen während der Mitose leicht abrunden und somit nicht so fest am Flaschenboden haften, genügte es durch kräftiges Klopfen gegen die Flasche diese Zellen vom Untergrund zu lösen. Anschließend wurde das Medium mit den abgeschüttelten Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen 6 min bei 1000 Upm pelletiert. Das Zellpellet wurde in einer Mischung aus 5 ml 0,5% NaCitrat und 5 ml 0,56% KCl aufgenommen, in ein 14 ml Zentrifugenröhrchen mit Rundboden überführt und anschließend 15 min bei 37 °C im Wasserbad quellen gelassen.

Nach dem Quellen der Zellen wurden diese nochmals bei 1000 Upm 6 min lang abzentrifugiert und anschließend der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt. Die Zellen wurden im verbliebenen Überstand vorsichtig resuspendiert, und tropfenweise wurde kaltes Fixativ, eine Mischung aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1, zugegeben. Dabei mußte das Röhrchen leicht geschwenkt werden, um kontinuierlich eine gute Durchmischung des Inhaltes zu erreichen. Nach der Zugabe des Fixatives wurden die Zellen mindestens 20 min bei 4 °C stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen nochmals wie oben beschrieben abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Bodensatz resuspendiert.

Die benötigten Objektträger wurden mit einem fusselreien Tuch abgewischt und in demineralisiertes Wasser eingetaucht. Die Zellen wurden aus ausreichender Höhe mit einer Pipette auf die Objektträger aufgetropft. Beim Auftreffen der Zellen platzen die in der Mitose befindlichen Zellen und spreizen dabei ihre Metaphasen auf. Drei bis vier Tropfen waren dabei ausreichend eine genügend große Anzahl Mitosen auf den Objektträger aufzubringen. Nach dem Trocknen in waagerechter Lage wurden die Präparate im Durchlichtmikroskop begutachtet. Die Dichte der Zellen und Mitosen auf dem Objektträger sollte nicht zu hoch sein, und die Chromosomen frei von Zytoplasmaresten. Bei Bedarf wurde das Fixativ wie oben beschrieben noch ein bis zweimal gewechselt und die Zellen in einem größeren Volumen aufgenommen.

## 2.2.15 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

### 2.2.15.1 Nicktranslation mit Biotin

Um DNA als Sonde für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) einzusetzen wurde sie zuvor durch eine Nicktranslation markiert. Diese Methode beruht auf dem Zusammenspiel zweier Enzyme in einem Reaktionsansatz. Die DNase I aus *E. coli* fügt bei niedriger Konzentration Einzelstrangbrüche, *nicks*, in doppelsträngige DNA ein. Diese Endonukleaseaktivität ist nicht sequenzspezifisch, so daß statistisch verteilt Einzelstrangbrüche in der DNA entstehen. Das zweite Enzym, die *E. coli* DNA-Polymerase I hat eine 5'→3'-Polymerase und eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität. Die DNA-Polymerase I benutzt die Einzelstrangbrüche als Ausgangspunkt für die Synthese einer "neuen", dem intakten Strang komplementären DNA. Dabei dient die freie 3'OH Gruppe des gebrochenen Stranges der Polymerase als Primer. Die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase entfernt dabei gleichzeitig die Nukleotide in Syntheserichtung. Dem Reaktionsgemisch zugefügte radioaktiv oder chemisch modifizierte Desoxyribonukleosidtriphosphate werden dabei von der Polymerase mit in die DNA eingebaut. Zum Nachweis der Sonde unter dem Fluoreszenzmikroskop wird der Reaktion neben den unmodifizierten Desoxyribonukleotiden Biotin 7-dATP zugegeben.

Die Markierung der DNA-Sonde wurde mit dem NICK Translation System von BRL Life Technologies No. 18160-010 unter Verwendung von Biotin 7-dATP in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß durchgeführt. Der Nicktranslationsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Komponente	Menge
Proben DNA	1 µg
Lösung A1	5 µl
Biotin 7-dATP (0,4 mM)	2,5 µl
MilliQ H <sub>2</sub> O	ad 45 µl
Lösung C	5 µl

Lösung A1: je 0,2 mM dCTP, dGTP, dTTP

Lösung C: DNA Polymerase I/ DNase I

Der Ansatz wird nach gutem Durchmischen der Komponenten 90 min bei 15 °C inkubiert.

### 2.2.15.2 Fällen der DNA

Um die nicht eingebauten Nukleotide von der Probe abzutrennen, wurde der Nicktranslationsansatz mit NaAc und EtOH gefällt. Dazu wurden zu dem Ansatz 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2 Volumen reines EtOH gegeben, durchmischt und 15 min bei -70 °C oder 2 h -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA 10 min bei 14000 Upm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 70% EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und bei 4 °C über Nacht in 25 µl oder 50 µl MilliQ H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.2.15.3 Vorbereitung der Sonden-DNA (Zugabe von Kompetitor-DNA)

Menschliche genomische DNA besteht zu einem großen Teil aus repetitiven DNA-Sequenzen. Um unspezifische Bindung der DNA-Sonde an die Chromosomen zu vermeiden, wurde daher die Sonden-DNA mit einem Überschuß an Kompetitor-DNA gemischt, denaturiert und vor der eigentlichen Hybridisierung mit dem Chromosomenpräparat unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Dabei hybridisieren die DNA-Einzelstränge mit repetitivem Sequenzanteil der Sonde mit den komplementären Einzelsträngen der Kompetitor-DNA zu einem DNA-Doppelstrang und können somit nicht mehr an die Chromosomen des Präparates binden. Als Kompetitor wurde eine Mischung aus humaner Cot1-DNA (repetitive menschliche DNA) und Lachssperma-DNA (ssDNA) verwendet. Der Überschuß an ssDNA im Hybridisierungsansatz sollte die unspezifische Bindung von Proteinen des Chromosomenpräparates an die Sonden-DNA verhindern. DNA-Sonden, die keine repetitiven Sequenzanteile enthalten, müssen nicht mit Cot1-DNA vorhybridisiert werden.

Zu der gelösten Sonden-DNA wurden folgende Mengen Kompetitor-DNA gegeben:

Gesamtvolumen	50 µl	75 µl
Sonde	25 µl	50 µl
ssDNA	5 µl	5 µl
Cot1-DNA	20 µl	20 µl

ssDNA = 10 mg/ml; Cot1-DNA = 1mg/ml

Anschließend wurde die DNA mit NaCl und EtOH gefällt:

	bei 50 µl	bei 75 µl
5M NaCl	2,5 µl	4 µl
Ethanol abs. (4 °C)	125 µl	188 µl

Nach der Zugabe von Natriumchlorid und Ethanol wurde der Ansatz gemischt und 30 min auf Eis stehen gelassen. Danach wurde die DNA 10 min bei max. Drehzahl in der Eppendorftischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 500 µl 70% EtOH gewaschen und getrocknet. Das Sediment wurde in 12,5 µl deionisiertem Formamid aufgenommen und mindestens 30 min bei RT gelöst. Danach erst wurde Wasser, 20x SSC und Dextransulfat zugegeben.

Gesamtvolumen	25 µl
Formamid deionisiert	12,5 µl
H <sub>2</sub> O MilliQ	5 µl
20x SSC	2,5 µl
Dextransulfat 50%	5 µl

Alle Komponenten wurden gut gemischt und kurz zentrifugiert, um alle Flüssigkeit zusammenzuführen. Das Gemisch wurde anschließend zum vollständigen Lösen der DNA 30 min auf 50 °C temperiert. Unmittelbar vor der Hybridisierung wurde die Probe 15 min bei 75 °C denaturiert und zum Abblocken der repetitiven Sequenzen 30 min bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.15.4 Vorbereitung der Chromosomenpräparate

Das Chromosomenpräparat muß für die FISH speziell vorbereitet werden. Die wichtigsten Schritte dieser Behandlung sind das Entfernen von RNA und Proteinen, das Nachfixieren des Präparates und die Denaturierung der DNA-Doppelstränge der Chromosomen.

Dazu wurden geeignete Präparate ausgewählt und 5 min in 2x SSC bei RT equilibriert. Zum Entfernen der RNA wurde 100 µl einer RNase-Lösung (100 µg/ml RNaseA in 2x SSC) auf den Objektträger gegeben und mit einem 24x60 mm großem Deckgläschen abgedeckt. Zur Inkubation wurde das Präparat in einen Metallkasten, in dem sich ein angefeuchtetes Papiertuch befand (feuchte Kammer) gelegt und 1 h in bei 37 °C in den Wärmeschrank gestellt. Nach der RNase-Behandlung wurde das Deckgläschen vorsichtig vom Objektträger abgeschüttelt und dieser 3 mal 5 min bei RT in 2x SSC gewaschen. Zum Entfernen der Proteine wurden die Chromosomenpräparate genau 3 min in 50 ml einer frischen Lösung Pepsin/HCl (50 ng/ml in 0,01 N HCl) bei 37 °C inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend bei 37 °C zweimal 5 min lang in 1x PBS und einmal 5 min in 1x PBS mit 50 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen. Zum Fixieren des Präparates wurden die Objektträger bei 37 °C 10 min in 1% Formaldehyd in 1x PBS mit 50 mM MgCl<sub>2</sub>

gestellt und anschließend 5 min in 1x PBS gewaschen. Danach wurde zum Dehydrieren des Präparates der Objektträger jeweils 3min in eine eiskalte aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 99%) gegeben und an der Luft getrocknet. Zum Denaturieren der DNA wurde das Präparat 75 s bei 70 °C mit 70% Formamid in 2x SSC gestellt, anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 99%) wie oben beschrieben dehydriert und an der Luft getrocknet.

#### **2.2.15.5 Hybridisierung**

Die markierte Sonde wurde vorsichtig auf den Objektträger pipettiert und ein 24x32 mm großes Deckgläschen blasenfrei aufgelegt, daß mit Fixogum am Rand abgedichtet wurde. Der so vorbereitete Objektträger wurde in einen Edelstahlkasten (trockene Kammer) gelegt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zum Waschen wurde das Fixogum mit einer Pipette entfernt, und die Objektträger wurden 15 min mit 2x SSC bei RT unter ständiger Bewegung gewaschen. Das Deckgläschen wurde dabei durch das SSC abgeschwemmt und anschließend aus der Küvette genommen. Um ungebundene DNA-Sonde zu entfernen, wurde das Präparat 3 mal 5 min bei 45 °C mit 50% Formamid in 1x SSC und 3 mal 5 min bei 60 °C mit 0,1x SSC unter gelegentlichem Schütteln gespült.

#### **2.2.15.6 Nachweis der biotinylierten DNA-Sonde**

Nach dem Abspülen der ungebundenen DNA-Sonde wurde der Objektträger bei 45 °C kurz in 4x SSC/0,1% Tween 20 eingetaucht. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde auf den Objektträger 100 µl einer 3%igen BSA-Lösung in 4x SSC/0,1% Tween 20 gegeben und mit einem 24x60 mm großem Deckgläschen abgedeckt. Danach wurde der Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt und bei 37 °C im Wärmeschrank 30 min inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde das Deckgläschen vom Objektträger geschüttelt und dieser 5 min bei 45 °C in 4x SSC/0,1% Tween 20 gewaschen.

Als nächstes wurde der an Avidin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (Avidin DCS) auf den Objektträger gegeben. Da dieser Farbstoff unter Lichteinwirkung relativ rasch zerfällt, wurden die folgenden Schritte der *in-situ*-Hybridisierung in einem abgedunkeltem Raum durchgeführt. Die Farbstoffstammlösung wurde vor Benutzung 2 min bei 14000 Upm in einer Eppendorftischzentrifuge abzentrifugiert, um mögliche ausgefallene Anteile des Farbstoffs von den gelösten Anteilen abzutrennen. Anschließend wurde in 200 µl 4x SSC/0,1% Tween 20/1% BSA 1 µl Fluorescein Avidin DCS (2 mg/ml)-Stammlösung pipettiert (=10 µg/

ml) und kurz gemischt. Von dieser Lösung wurden 25 µl vorsichtig auf den Objektträger pipetiert und mit einem 24x32 mm großen Deckgläschen blasenfrei abgedeckt. Danach wurden die Objektträger in die feuchte Kammer gelegt und zur Inkubation 30 min in den 37 °C Wärmeschrank gegeben. Nach der Inkubation wurde das Deckgläschen abgeschüttelt und das Präparat 3 mal 5 min unter gelegentlichem Schütteln bei 45 °C in 4x SSC/0,1% Tween 20 gewaschen. Um die Fluoreszenz des Präparates zu verstärken wurde ein biotinmarkierter Antikörper gegen Avidin (2-Avidin; 2,5 µg/ml), der mit dem gleichen avidingekoppelten Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen werden kann, eingesetzt. 1 µl des Antikörpers wurden in 200 µl 4x SSC/0,1% Tween 20/1% BSA gelöst. Anschließend wurden 25 µl dieses verdünnten Antikörpers auf den Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen versehen und 30 min bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernen des Deckgläschens wurde 3 mal 5 min bei 45 °C mit 4x SSC/0,1% Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden wieder 25 µl des Fluoreszenz-Farbstoffes Avidin DCS (10 µg/ml) in 4x SSC/0,1% Tween 20/1% BSA auf den Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen abgedeckt und in der feuchten Kammer 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abschütteln des Deckgläschens wurden die Objektträger 3 mal 5 min bei 45 °C in 4x SSC/ 0,1% Tween 20 gewaschen.

### **2.2.15.7 Gegenfärbung**

Zum Gegenfärben der Chromosomen wurde der Fluoreszenz-Farbstoff DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindol; 200 µg/ml), der präferentiell an AT-reiche DNA-Sequenzen bindet, verwendet. Es wurden 15 µl des DAPI-Reagenz mit 50 ml 4x SSC/0,1% Tween 20 gemischt und der Objektträger wurde für 3 min bei RT in das Gemisch eingetaucht. Danach wurde der Objektträger gut mit H<sub>2</sub>O gespült und im abgedunkeltem Raum getrocknet. Zum Eindecken des Präparats wurden 3 Tropfen des Eindeckmittels DABCO aufgetropft und ein 24x60 mm großes Deckglas aufgelegt. Nach einer Trockenzeit von mindestens 1 h bei 4 °C konnte das Präparat im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

### **2.2.15.8 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung**

Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss) ausgewertet. Das Mikroskop ist mit einer Epifluoreszenzeinrichtung und einer gekühlten CCD-Kamera ausgestattet. Zur Auswertung der Präparate wurden die Filter für FITC (Fluorescein-isothiocyanat) [Anregung 490 nm; Emission 525 nm] und DAPI [Anregung 360 nm; Emission 490-500 nm] verwen-

det. Bei beiden Wellenlängen wurde von der Kamera ein Bild an einen Computer (MacIntosh Power PC) übertragen und direkt nach der Aufnahme automatisch durch das Programm *Smart Capture* elektronisch übereinander gelegt. Dabei wird die FITC-Färbung in den Bildern grün und die DAPI-Gegenfärbung blau dargestellt. Die Aufnahmeparameter sowie das Filterrad des Mikroskops wurden durch die Software gesteuert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 STS-Gehalt-Kartierung der Zentromerregion von Chromosom 7

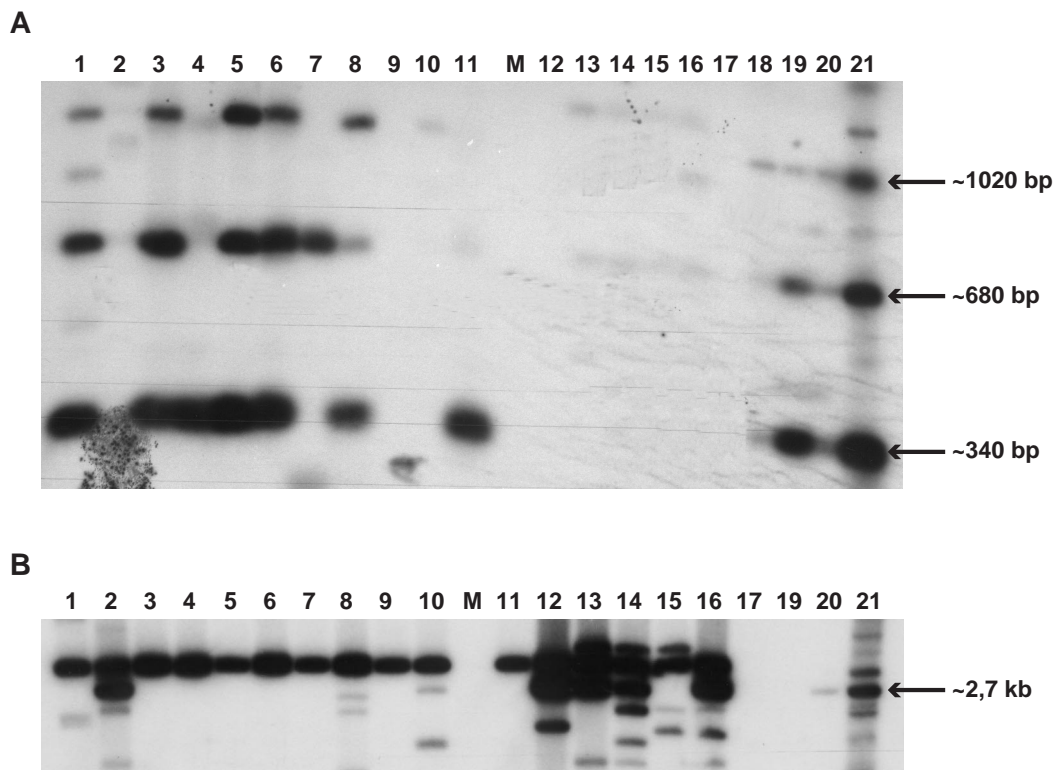
Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die physikalische Kartierung der Zentromerregion von Chromosom 7, der Region also, an der bei der Zellteilung die Spindelfasern ansetzen. Zu diesem Zweck wurden genomische Klone aus verschiedenen Genbanken herangezogen, die zuvor auf 7cen, oder die nähere Umgebung lokalisiert worden waren (Kunz et al., 1994; Chumakov et al., 1995; Hudson et al., 1995; Korenberg, pers. Mitteilungen). Die Klone sollten mit Hilfe der STS-Gehalt-Kartierung (Abschnitt 1.7.1) in Gruppen überlappender Klone (*contigs*) eingeteilt und wenn möglich so aneinander gereiht werden, daß sie eine möglichst große genomische Region repräsentieren.

Als Mittelpunkt der Karte dienten 13 YAC-Klone aus der Chromosom 7 spezifischen Bibliothek, die Anteile der beiden  $\alpha$ -Satelliten D7Z1 und D7Z2 enthielten (Kunz et al., 1994). Zur Identifizierung der  $\alpha$ -Satellitenanteile in den Klonen standen die beiden DNA-Sonden p $\alpha$ 7d1 und pMGB7 (Waye et al. 1987) zur Verfügung. Genomische DNA (3  $\mu$ g) der YAC-Klone (Tabelle 19) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (A) und *HindIII* (B) gespalten. Die DNA-Fragmente wurden danach auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Zur Detektion von D7Z1-Anteilen in den YAC-Klonen wurde die Sonde p $\alpha$ 7d1 auf den Filter mit der *EcoRI* gespaltenen DNA hybridisiert (Abbildung 11A). Dabei hybridisierte die Sonde in 8 Spuren mit gespaltener YAC-DNA und in allen 4 Kontrollspuren mit Fragmenten der Größe 340 bp, 680 bp, oder 1020 bp. Bei den 3 Fragmenten handelt es sich um Vielfache einer für  $\alpha$ -Satelliten typischen 171 bp großen DNA-Sequenz (Waye et al. 1987). Die Sonde pMGB7, die ein 2,7 kb großes, *HindIII* kloniertes DNA-Fragment aus dem Bereich D7Z2 enthält, hybridisiert in 5 Spuren mit YAC-DNA und in den Kontrollen RR14 und GM3104 mit einem ebenfalls 2,7 kb großen DNA-Fragment (Abbildung 11B). In Tabelle 19 ist das Ergebnis der Hybridisierungen zusammengefaßt.

Zusätzlich zu diesen Hybridisierungsexperimenten wurden alle im Material und Methoden-Teil aufgeführten YAC- und BAC-Klone mit zentromernahen STS-Markern durchmustert. Die durch PCR analysierbaren STS-Marker wurden zuvor durch die Verwendung von Mensch-Nager Zellhybriden, die Brüche im Zentromer, oder auf dem kurzen Arm in der Nähe des Zentromers aufweisen, auf subchromosomale Abschnitte des menschlichen Chromosom 7



vorlokalisiert. Nachdem nur wenige YAC-Klone aus der Chromosom 7 spezifischen YAC-Bibliothek den verwendeten STS-Markern zugeordnet werden konnten, wurden weitere YAC-Klone aus der CEPH-YAC-Bibliothek und einige BAC-Klone (Prof. Dr. J. R. Korenberg, pers. Mitteilung) mit den gleichen STS-Markern analysiert. Zur Durchführung der PCR-Analysen wurden einzelne DNAs der YAC-Klone gemischt. Positive Ergebnisse wurden durch Einzelanalysen der Klone bestätigt. In Tabelle 20 sind die Resultate aller PCR-Analysen, bei denen ein STS nachgewiesen werden konnte, aufgeführt.



**Abbildung 11: Southernblotanalyse artifizierlicher Hefechromosomen (YACs) auf  $\alpha$ -Satelliten**

Es wurde DNA von 17 YACs aus der Chromosom 7 spezifischen Bibliothek (Scherer et al., 1992) mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* (A) und *HindIII* (B) geschnitten. In den Spuren 19-21 ist geschnittene genomische DNA der Zelllinien Ru Rag 6-20-12 (19), Ru Rag 14-4-7-44 (20) und GM 3104 (21; +Kontrolle) aufgetragen.

Nr.	DNA	Locus	Nr.	DNA	Locus	Nr.	DNA	Locus	
1	HSCE 73	D7Z1	8	HSCE 1075	D7Z1	15	HSCE 1091		
2	HSCE 187	D7Z2	9	HSCE 1077		16	HSCE 1092		D7Z2
3	HSCE 1065	D7Z1	10	HSCE 1078		17	HSCE 527		n.d.
4	HSCE 1066	D7Z1	11	HSCE 1080	D7Z1	18	5387 3cl 10	D7Z1	n.d.
5	HSCE 1067	D7Z1	12	HSCE 1083	D7Z2	19	RR 6-20-12	D7Z1	
6	HSCE 1070	D7Z1	13	HSCE 1088	D7Z2	20	RR 14-4-7-44	D7Z1	D7Z2
7	HSCE 1073	D7Z1	14	HSCE 1090	D7Z2	21	GM 3104	D7Z1	D7Z2
I	BAC7D5	D7Z2	II	BAC7C1404	D7Z1				

**Tabelle 19: Klone mit D7Z1- und D7Z2-Anteilen**

Die in der Abbildung 11 angegebenen Nummern entsprechen den in der Tabelle aufgeführten Klonen.

n.d.= nicht durchgeführt (auf dem Nylonfilter befand sich keine gespaltene DNA dieses Klones). Spuren Nr. 18-21 enthalten Kontroll-DNA verschiedener Zelllinien. I und II repräsentieren das Hybridisierungsergebnis zweier BAC-Klone, die nicht auf dem Filter in Abbildung 11 enthalten sind.

Locus	D7S499	D7S494	D7S473	D7S2429	D7S2549	D7S2793	D7S520	D7S2512
<b>pos. Klone:</b>	654-C-3	644-E-4	665-C-12	771-E-12	726-D-7	721-B-4	752-B-1	752-B-1
	725-F-5	665-C-12	694-H-10	946-H-8	859-C-2	857-G-1	763-G-2	763-G-2
	807-D-2	690-B-3	698-D-5	853-B-2	883-F-3	884-E-3	715-E-2	742-A-8
	812-E-7	694-H-10	714-A-12	944-E-3	885-F10	919-A-8	726-D-7	747-E-7
		698-D-5	816-D-7	982-E-10	930-H-6	930-H-6	734-A-6	767-E-11
		714-A-12	928-B-4		935-G-3	965-H-9	846-E-10	846-E-10
		807-B-9	946-H-8		971-A-9	HSCE110	884-E-3	930-H-6
		816-D-7			HSCE110	HSCE601	930-H-6	935-G-3
		928-B-4			HSCE601		971-A-9	971-A-9
		946-H-8					HSCE527	HSCE527
	895-H-3							

Locus	D7S482	D7S2503	D7S502	Primerpaar			
				13-11/13-1H	5-16D/5-16H	16A/16B	L1R/16B
<b>pos. Klone:</b>	754-F-11	754-F-11	738-F-7		HSCE188		
	754-G-2	754-G-3	777-H-2		HSCE1090		
	809-E-2	764-F-3	809-E-2		HSCE1092		
	846-A-11	870-A-6	846-A-11		BAC7D5		
	870-A-6		870-A-6				
	907-F-5		890-B-1				
	850-F-8						

**Tabelle 20: PCR-Ergebnisse mit locuspezifischen Primerpaaren**

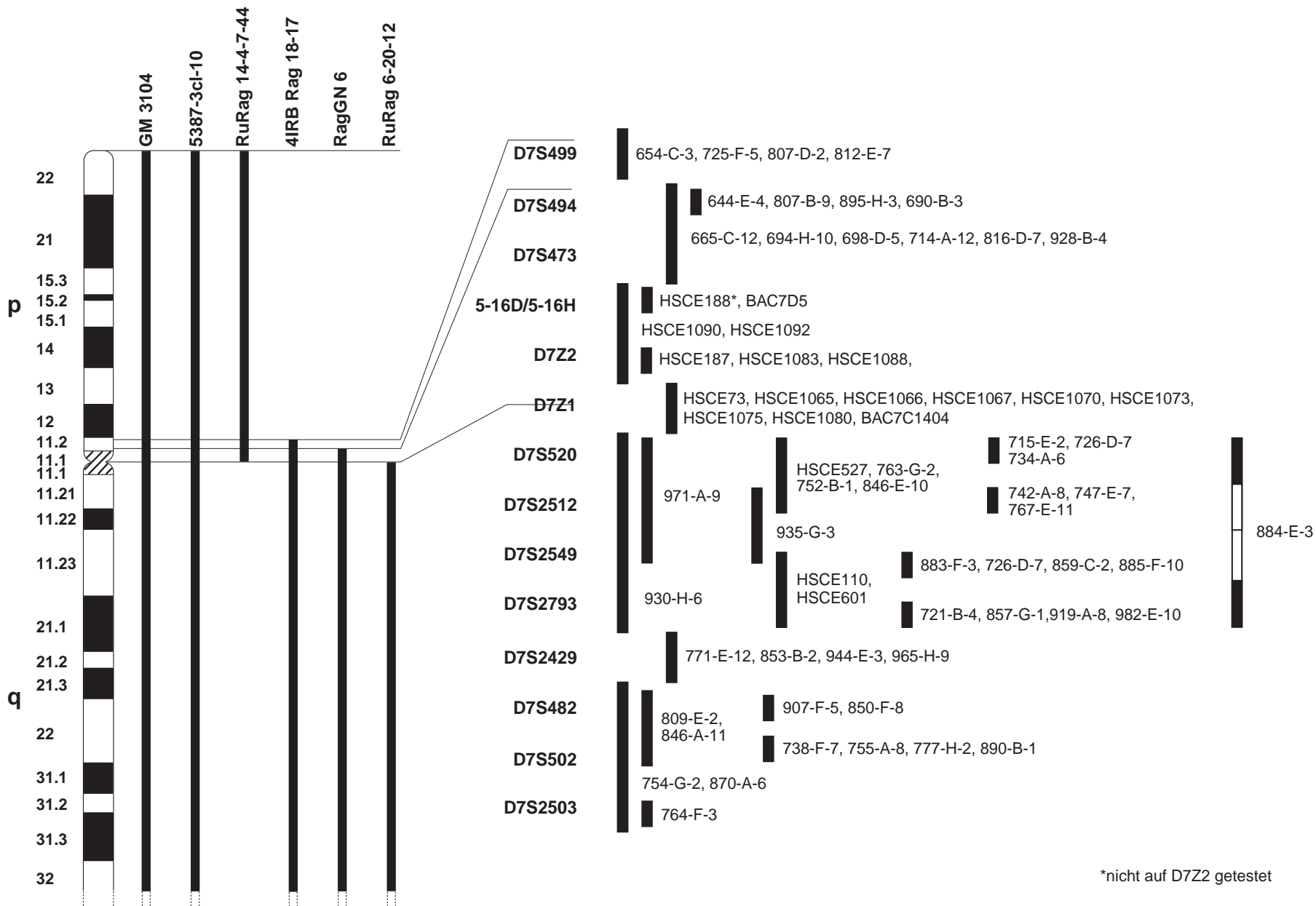
Klone auf denen keine der verwendeten STS-Marker nachgewiesen werden konnten, sind nicht aufgeführt.

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen graphisch dargestellt. Unter Verwendung somatischer Zellhybriden mit unterschiedlichen Fragmenten des humanen Chromosom 7 wurden die in der Mitte der Abbildung aufgeführten STS-Marker in drei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe liegt der Marker D7S499. Er konnte auf dem Chromosomenfragment des Hybriden 4IRB Rag 18-17 noch nachgewiesen werden, nicht aber auf den Fragmenten der Zelllinien Rag GN6 und RR6. Unter den verwendeten Markern liegt er daher am weitesten Richtung 7pter.

Die zweite Gruppe enthält die Marker D7S494, D7S473, 5-16D/5-16H, sowie den  $\alpha$ -Satelliten D7Z2. Sie wird durch die Bruchpunkte der Chromosomenfragmente der Hybriden RagGN6 und RR6 bzw. RR14 eingegrenzt.

In die letzte Gruppe fielen die Marker D7S520 bis D7S2503, die auf dem Fragment der Zelllinie RR6, nicht aber auf dem des Hybriden RR14 nachgewiesen werden konnten. Somit liegen diese Marker auf dem langen Arm des Chromosoms 7. Anteile des  $\alpha$ -Satelliten D7Z1, aber keiner der verwendeten STS-Marker, konnten auf den Chromosomenfragmenten der beiden somatischen Zellhybriden RR14 und RR6 nachgewiesen werden. Da beide Fragmente aus den Zellen des gleichen, phänotypisch unauffälligen Mannes stammen, scheint eines der beiden Chromosomen 7 dieses Mannes in D7Z1 gebrochen zu sein (Abschnitt 2.1.8.2).

Bei der STS-Gehalt-Kartierung, konnten die verwendeten Klone in 7 *contigs* eingeteilt werden (rechte Seite). Die größte Gruppe enthält 4 und die beiden kleinsten nur einen STS-Marker. Der Klon 884-E-9 konnte bei der vorgenommenen Gruppeneinteilung nicht eindeutig zugewiesen werden, da auf ihm die beiden STS-Marker D7S2512 und D7S2549 nicht nachgewiesen werden konnten, jedoch die beiden flankierenden Marker D7S520 und D7S2793. Der YAC-Klon 946-H-8, der die Marker D7S494, D7S473 und D7S2429 trägt, wurde nicht mit in die Abbildung aufgenommen, da die zwischen diesen Markern liegenden Sequenzabschnitte nicht nachgewiesen werden konnten. Ein Anschluß der beiden  $\alpha$ -Satelliten D7Z1 und D7Z2 an bekannte STS-Marker konnte durch die STS-Gehalt-Kartierung leider nicht erreicht werden. Ebenso wurde kein YAC identifiziert, der den Bereich zwischen den beiden  $\alpha$ -Satellitenregionen von Chromosom 7 überspannt.



\*nicht auf D7Z2 getestet

**Abbildung 12: STS-Kartierung der Zentromerregion von Chromosom 7**

Auf der linken Seite der Abbildung ist die cytogenetische Charakterisierung der Chromosomenfragmente in den Maus-Mensch-Hybridzellen dargestellt. Die dünnen Linien stellen einen Zusammenhang der Chromosomenfragmente mit den in der Mitte der Abbildung aufgeführten STS-Markern (Loci) her (z.B.: D7S499 ist auf den ersten vier, nicht aber auf den letzten beiden Chromosomenfragmenten gelegen). Die schwarzen Balken auf der rechten Seite der Abbildung stellen in Gruppen zusammengefaßte STS dar. Hinter den Balken sind die Klone aufgeführt, auf denen diese STS-Marker nachgewiesen werden konnten.

## 3. 2 Lokalisation des *hsp27*-Gens auf Chromosom 7q11

Bei der Erstellung des Klon-*contigs* (Kap. 3. 1) wurde auch DNA des BAC-Klons 7c23 verwendet, der zuvor auf die Zentromerregion von Chromosom 7 lokalisiert worden war (Prof. Dr. Dr. Korenberg, pers. Mitteilung). Da durch die Verwendung dieses Klons und der beschriebenen PCR-Primer keine bestehenden Lücken in dem STS-*contig* geschlossen werden konnten, wurden die Enden des BACs ansequenziert, um neue STSs zu generieren. Bei einer Datenbankrecherche mit dem Programm FASTA konnte für das eine BAC-Ende (sp6) eine 97.1% Übereinstimmung über 481 bp mit dem humanen Hitzeschock-Protein 27 (HSP27, HSPB1) gefunden werden (Anhang 8. 1.)

### 3.2.1 Lokalisation durch PCR-Analyse auf Chromosom 7q

Zur genaueren Lokalisation des HSP27-Gens wurden mehrere PCR-Primerpaare in die genomische Sequenz des Gens (Hickey et al., 1986a; GenBank Accession No.: L39370, X03900) gelegt und unter Verwendung genomischer DNA verschiedener somatischer Zellhybriden PCRs durchgeführt.

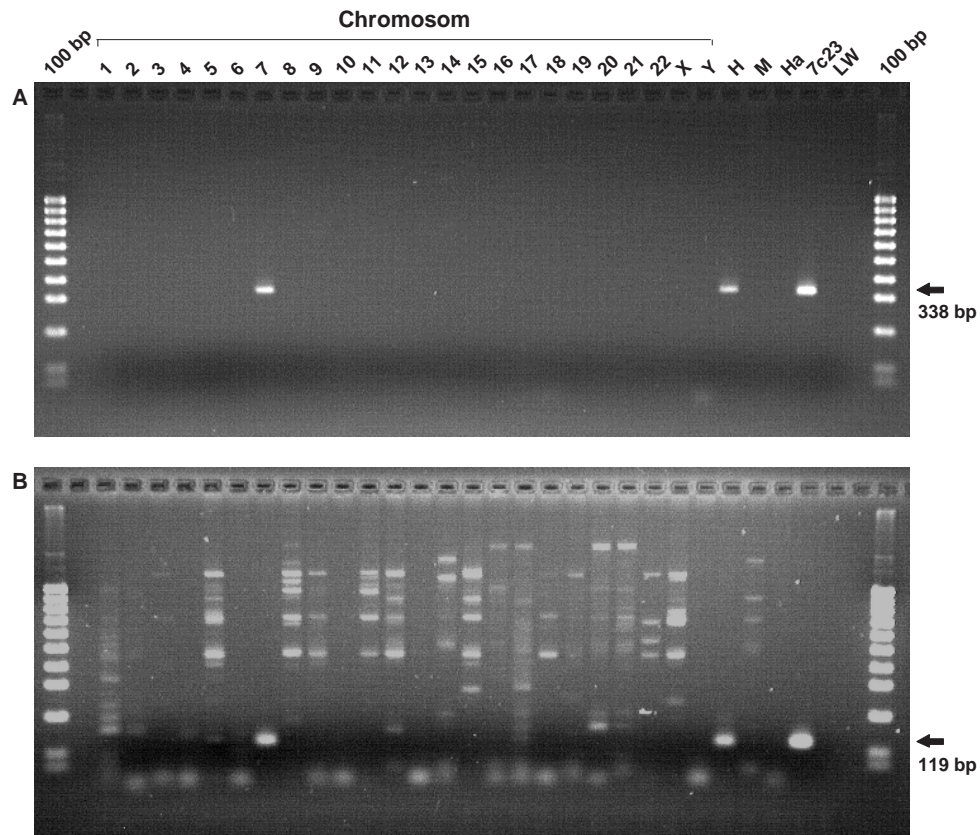
Zur Lokalisation des Gens wurde DNA monochromosomaler Zellhybriden (*NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panel #2* [Drawinga et al., 1993]) verwendet (Abschnitt 2.1.8.3). Das Primerpaar 7c23-sp6 liegt 3' der kodierenden Sequenz von HSP27 und amplifiziert ein 338 bp großes Produkt. Hingegen amplifiziert das Primerpaar hsp02 eine 119 bp große Sequenz des Übergangs Exon1-Intron1. Beide Primerpaare ergaben nur mit DNA der Zelllinie NA10791 (Chr. 7), der Menschkontrolle und mit DNA des BACs 7c23 ein spezifisches PCR-Produkt der Größen 338 bp bzw. 119 bp (Abbildung 13). Da beide Primerpaare in der genomischen Sequenz des Gens liegen, muß die publizierte Sequenz des Gens sich auf Chromosom 7 befinden.

Um die Lokalisation des Gens noch enger eingrenzen zu können, wurden mit den gleichen Primerpaaren und DNA verschiedener Zellhybriden mit Anteilen von Chromosom 7 PCR-Analysen durchgeführt (Abbildung 14). Beide Primerpaare ergaben zusammen mit DNA der Zelllinien GM3104, 5387 3c1 10, 4IRB18-17 Rag GN6 und Ru Rag 6-20-12 spezifische PCR-Produkte der Größe 338 bp bzw. 119 bp. Mit DNA der Zelllinie Ru Rag 14-4-7-44 und der Mauskontrolle ergab sich hingegen kein Produkt. In der Zelllinie Ru Rag 14-4-7-44 ist der kurze und in Ru Rag 6-20-12 der lange Arm des humanen Chromosom 7 als Chromosomenfragment enthalten. Daher müssen beide Primerpaare auf dem langen Arm von Chromosom 7 liegen.

Mit zwei weiteren Primerpaaren hsp01 und STSG-10191, die in der cDNA Sequenz von HSP27 liegen, konnte mit DNA des BAC-Klons 7c23 ein PCR-Amplifikat erzeugt werden (Abbildung 15). Das Primerpaar STSG-10191 konnte ebenfalls durch die Zellhybriden auf 7q lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Lokalisation des Genes auf 7q noch genauer zu bestimmen, wurde der GeneBridge4 Bestrahlungs-Hybriden Mapping Panel verwendet (Abschnitt 2.1.8.4). Bestrahlungs-Hybriden enthalten Fragmente von menschlichen Chromosomen die durch eine letale Bestrahlung der humanen Donorzelllinie mit Röntgenstrahlen erzeugt werden. Durch die Bestrahlung sollten die Chromosomen an zufälliger Stelle brechen. Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei Sequenzen, durch solch ein Chromosomenbruch voneinander getrennt werden, ist also abhängig von ihrem physikalischem Abstand auf den Chromosomen. Je enger zwei DNA-Sequenzen auf einem Chromosom benachbart sind, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß sie durch eine zufällige Bruchstelle getrennt werden. Die Entfernungsangabe zweier Marker ist also wie bei der genetischen Kartierung eine statistische Größe. Die Bruchhäufigkeit wird durch den Wert  $\theta$  definiert. Er reicht von 0 (beide Marker werden nie getrennt) bis 1,0 beide Marker werden immer getrennt. Die Kartierungsfunktion  $D = -\ln(1-\theta)$  wird in *centiRays* (cR) gemessen und ist abhängig von der Strahlendosis. So bedeutet beispielsweise die Entfernung 1 cR<sub>3000</sub> zwischen zwei Markern, daß es bei einer Röntgenstrahlendosis von 3000 rad mit einer Häufigkeit von einem Prozent zu einem Bruch zwischen diesen Markern kommt (Cox et al., 1990; Stachan und Read, 1996).

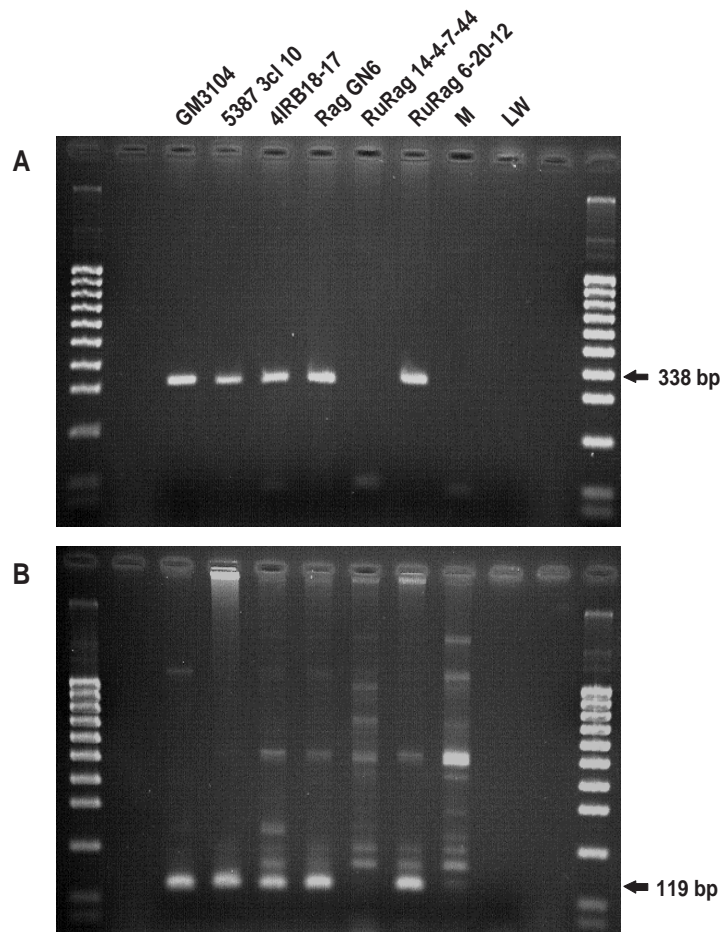
Als Marker wurde das Primerpaar 7c23-sp6 verwendet und mit DNA des Hybridpanels eine PCR-Analyse durchgeführt. Bei der Auswertung der Ergebnisse (Gel nicht gezeigt) mit dem Programm "rhmapper" (Abschnitt 2.1.8.4) ergab sich für den verwendeten Marker ein Abstand von 11,77 cR<sub>3000</sub> zu dem bekannten Locus D7S489. Der Locus D7S669 liegt bei etwa gleichem Abstand telomerwärts des verwendeten PCR-Markers.



**Abbildung 13: PCR mit DNA monochromosomaler Zellhybriden**

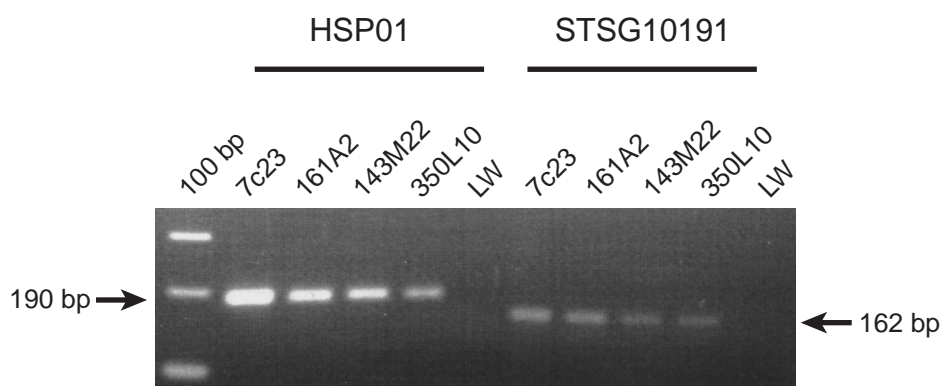
PCR mit den Primerpaaren 7c23-sp6 (A) und hsp02 (B) und DNA monochromosomaler Zellhybriden. Als Kontrollen wurde DNA von Mensch (H), Maus (M), Hamster (Ha) und DNA des BAC-Klones 7c23 eingesetzt.





**Abbildung 14: PCR mit DNA aus Zellhybriden**

PCR mit den Primerpaaren 7c23-sp6 (A) und hsp02 (B) und DNA von Zellhybriden mit Chromosom 7 Anteilen.



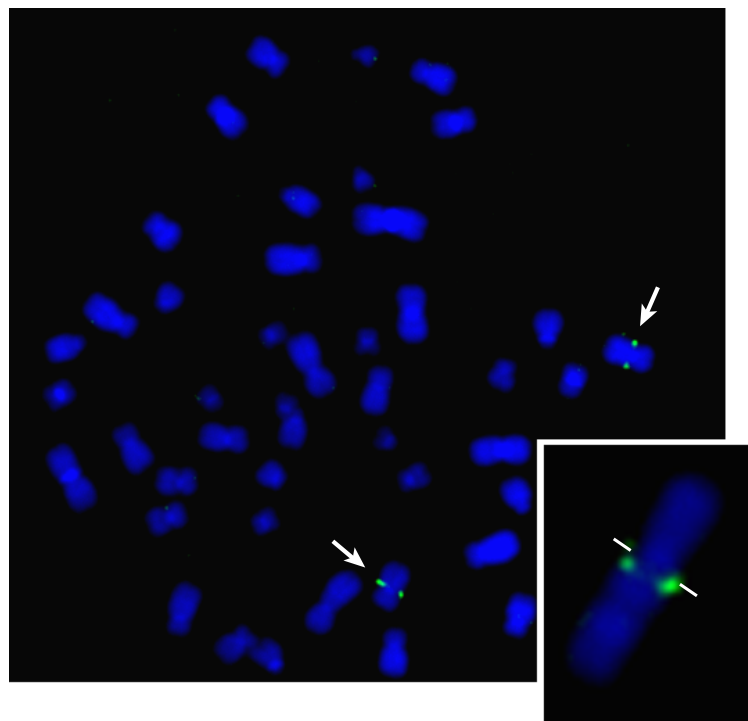
**Abbildung 15: PCR mit DNA verschiedener BACs**

PCR mit den Primerpaaren hsp01 und STSG-10191 und DNA unterschiedliche BACs. Beide Primerpaare liegen in der genomischen Sequenz von HSP27. Die beiden Primerpaare ergeben zusammen mit den DNAs der BACs ein PCR-Produkt der Größe 190 bp bzw. 162 bp. Dieses Ergebnis zeigt, daß auch diese weiteren Primerpaare auf dem BAC 7c23 liegen.

### 3.2.2 Lokalisation durch FISH

Für die Lokalisation des HSP27-Genes wurde der BAC-Klon 7c23 als Sonde verwendet. Es stand ein Chromosomenpräparat mit einem normalen Chromosomensatz einer Frau (46, XX) für die FISH-Analyse zur Verfügung.

Abbildung 16 zeigt die Hybridisierung des BACs 7c23. Es ist eindeutig ein Signal auf dem langen Arm von Chromosom 7 unterhalb des Zentromers in der Region 7q11.1-11.2 zu erkennen.



**Abbildung 16: Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung mit dem BAC 7c23**

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem BAC 7c23 als biotinylierte Sonde auf Metaphasechromosomen einer Frau (46, XX). Zur Detektion wurde der Fluoreszenzfarbstoff FITC (grün) verwendet. Die Chromosomen wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

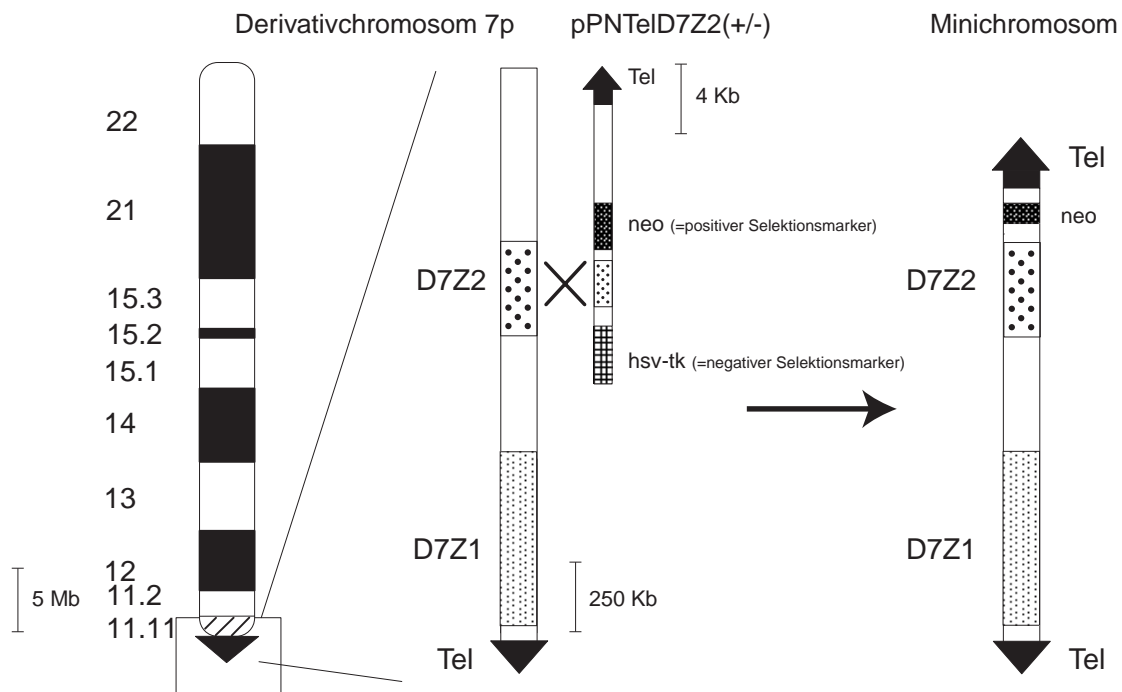
Die Pfeile weisen auf das Chromosom 7 und die Ausschnittvergrößerung zeigt ein Chromosom 7 einer anderen Metaphase der gleichen Frau (Das Zentromer ist durch die beiden weißen Striche angedeutet). Beide Abbildungen zeigen ein Fluoreszenz-Signal in der Region 7q11.1-11.2.

### **3.3 Verkürzung eines humanen Chromosoms 7 durch Telomer-verursachte Chromosomenfragmentierung in der Maus-Mensch Hybridzelllinie Ru Rag 14-4-7-44-7**

Klonierte menschliche Telomer-DNA kann in unterschiedlichen Zelllinien, wie etwa in embryonalen Stammzellen (ES) der Maus, den humanen Zelllinien HeLa und HT1080 oder auch der Mensch-Hamster Hybridzelllinie 2D (Wg3H als Ausgangszelllinie), Säugetierchromosomen effizient brechen. Dabei wird durch die klonierte DNA ein neues Telomer in das Chromosom eingebracht und durch einen zelleigenen Enzymkomplex (Telomerase) repariert (Farr et al., 1991; Barnett et al., 1993; Hanish et al., 1994). Mit einer Telomer-verursachten Chromosomenfragmentierung gelang es, die beiden menschlichen geschlechtsdeterminierenden Chromosomen X und Y im Zentromer zu brechen und somit Chromosomen zu erzeugen, die nur aus einem der beiden Chromosomenarme bestehen (Bayne et al., 1994; Brown et al., 1994). Ausgehend von diesen Experimenten wurde ein Versuch entworfen, bei dem in der Mensch-Maus Hybridzelllinie Ru Rag 14-4-7-44-7 das enthaltene menschliche Chromosom 7 durch ein Telomerrepeat verkürzt werden sollte, um ein menschliches Minichromosom zu erzeugen, welches neben den Telomeren überwiegend nur Sequenzen des Zentromers von Chromosom 7 enthalten sollte. Dazu wurde ein Vektor konstruiert, mit dem es möglich sein sollte, den Telomerrepeat durch homologe Rekombination in das Zentromer von Chromosom 7 zu integrieren, um dadurch das Chromosom zu brechen.

#### **3.3.1 Strategie zur Verkürzung des menschlichen Chromosoms 7**

In Abbildung 17 ist schematisch dargestellt, wie durch Einbringen eines Telomerrepeats der kurze Arm des Chromosoms 7 in der Zelllinie RR14 verkürzt werden sollte. Ziel war es, das Chromosom im  $\alpha$ -Satelliten D7Z2 zu brechen, um ein Minichromosom zu erhalten, das hauptsächlich aus Sequenzen des Zentromers von Chromosom 7 besteht.



**Abbildung 17: Strategie zur Verkürzung des Derivatvchromosoms 7p**

Zur Verkürzung des Derivatvchromosoms 7 der Zelllinie RR14 wurde ein Vektor transfiziert, der einen Teil eines menschlichen Telomerrepeats trägt. Um ein möglichst kleines Chromosom zu erhalten, wurde in den Vektor eine Sequenz aus dem Zentromer von Chromosom 7 (Region D7Z2) inkloniert.

Durch den Einbau des Plasmids in das Zentromer und anschließende Fragmentierung des Chromosoms kann ein Minichromosom entstehen, das hauptsächlich aus Sequenzen des Zentromers von Chromosom 7 besteht.

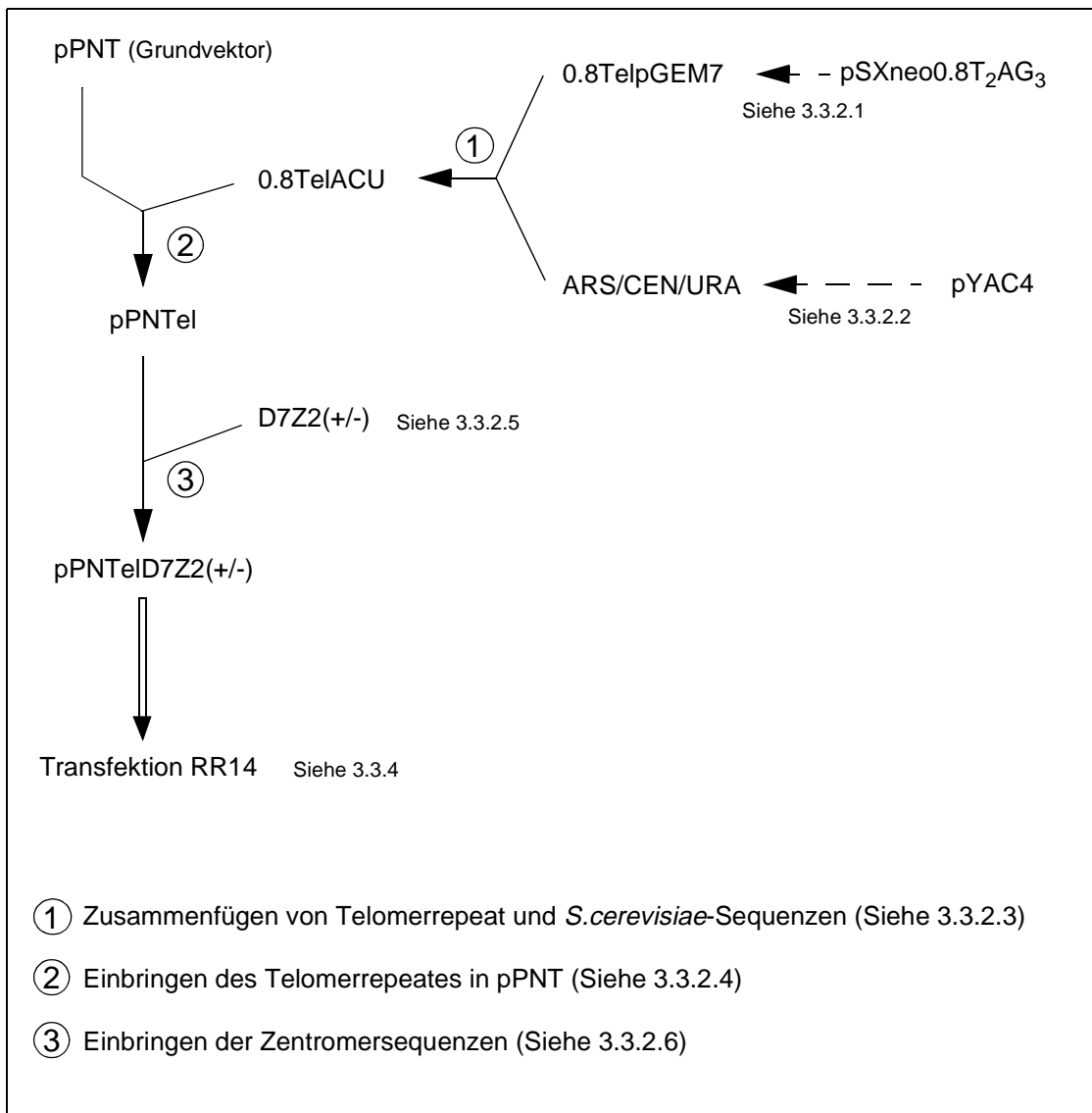
Es wurden dazu ein Vektor konstruiert, mit dem der Telomerrepeat durch homologe Rekombination ins Zentromer von Chromosom 7 eingefügt werden sollte. Zur Herstellung dieses Vektors wurde das Plasmid pPNT (Tybulewicz et al., 1991) verwendet. Es ist zur Erzeugung von “knock out”-Mutanten bei Mäusen konstruiert worden und enthält das *neo-Gen* als positiven und das *hsvtk-Gen* als negativen Selektionsmarker (Abbildung 23). Beide Gene besitzen den Promotor und die Polyadenylierungssequenz des Phosphoglyceratkinase-1-Genes (*pgk-1*) der Maus. Zwischen den beiden Genen stehen vier Restriktionsschnittstellen (*XbaI*, *BamHI*, *KpnI* und *EcoRI*) zum Einfügen von genomischen Sequenzen zur Verfügung. Die beiden Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *NotI* schneiden den Vektor 3' von *neo*. Da *NotI*-Schnittstellen in den meisten DNA-Sequenzen relativ selten vorkommen, eignet sich das Enzym in der Regel gut zum Linearisieren des fertigen “knock out”-Konstruktes.

Zur Konstruktion der Chromosomen-Fragmentierungsvektoren wurden in zwei Schritten Sequenzen in den Vektor pPNT eingeführt (Abbildung 18). Zuerst wurden 3' vom *neo-Gen* der Telomerrepeat zusammen mit Sequenzen aus *S. cerevisiae* eingefügt, die es ermöglichen sollen, ein entstandenes Minichromosom auch in Hefe zu vermehren.

In einem zweiten Schritt wurde der Bereich des Vektors, der zur genomischen Sequenz homolog ist, zwischen *neo*- und *hsvtk*-Gen eingebracht. Da bei dem durchgeführten Versuch ein Telomerrepeats in das Zentromer von Chromosom 7 integriert und kein Gen ausgeschaltet werden sollte, mußten im Gegensatz zur Herstellung von “knock out”-Mutanten, keine kodierenden Abschnitte verwendet werden. Für die Anlagerung des Vektors an die genomische DNA wurde ein Fragment aus dem  $\alpha$ -Satellit D7Z2 ausgewählt, da dieser sich direkt im Zentromer von Chromosom 7 befindet und weniger als 1 Mb von D7Z1 entfernt liegt, in dem das Chromosom schon einmal gebrochen war (Wevrick und Willard, 1991). Bei Integration des Telomerrepeats und Bruch des Chromosoms an dieser Stelle würde ein möglichst kleines Chromosom entstehen (Abbildung 17).

### **3.3.2 Konstruktion des Chromosomen-Fragmentierungsvektors**

Da zum Einfügen der Fragmente in den Vektor pPNT nur eine begrenzte Zahl von Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stand, war es notwendig, die beiden Inserts zuvor in anderen Vektoren zusammenzustellen und für die Insertion vorzubereiten. Im folgenden Abschnitten (Kap. 3.3.2.1-3.3.2.6) ist jeder Konstruktionsschritt separat dargestellt (Abbildung 18).

**Abbildung 18: Klonierungsstrategie**

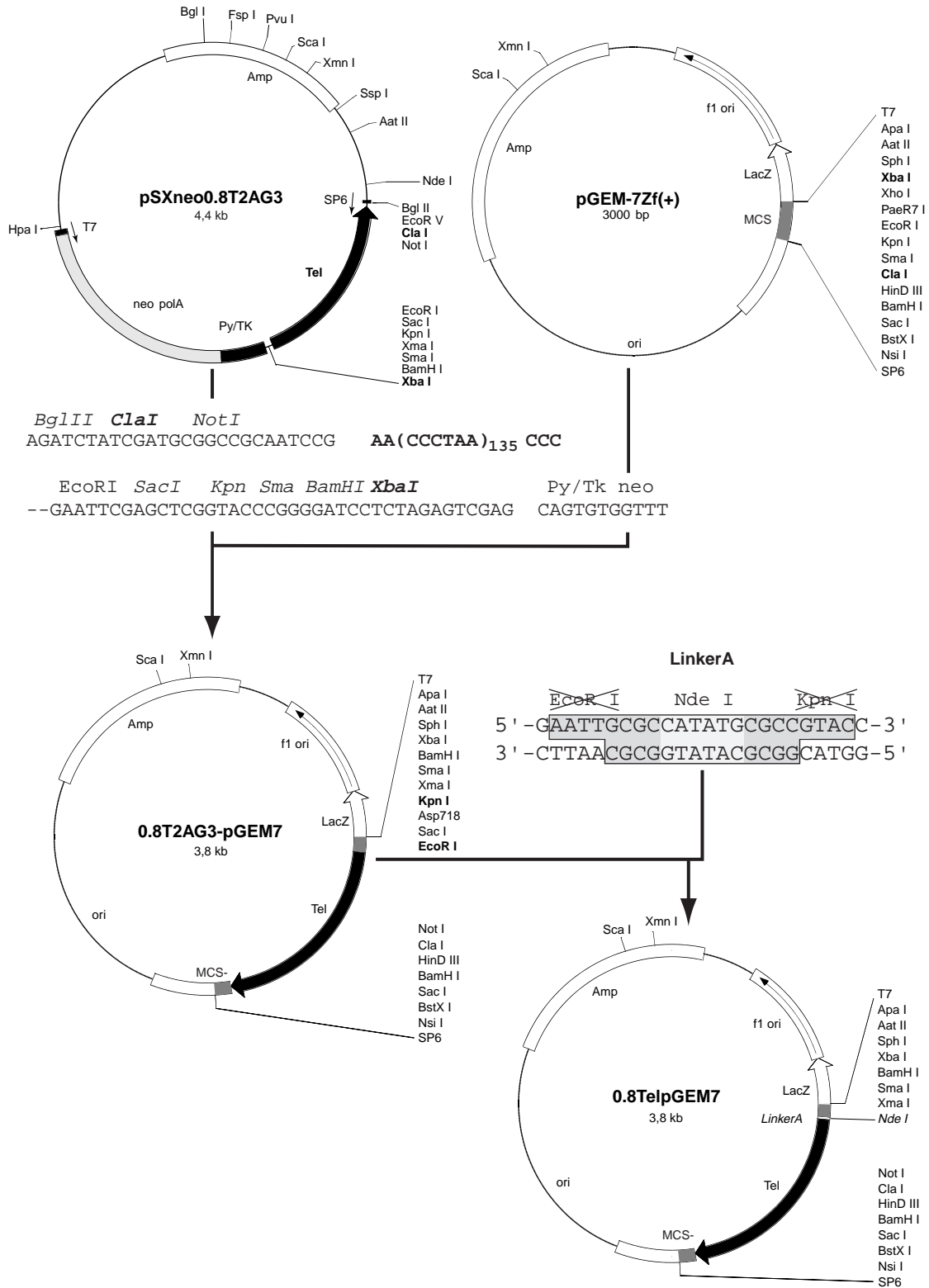
Übersicht über die einzelnen Konstruktionsschritte mit Querverweisen auf die jeweiligen Kapitel

**3.3.2.1 Umklonieren des Telomerrepeats (0.8TelpGEM7)**

Das Plasmid pSXneo0.8T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>, welches den benötigten 800 bp langen Telomerrepeat enthält (Hanish et al., 1994), weist in der multiplen Klonierungsstelle (MCS) Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *KpnI* auf. Für einen späteren Konstruktionsschritt ist es notwendig, daß *EcoRI* und *KpnI* als nur einmal vorkommende Schnittstellen an anderer Stelle zur Verfügung stehen. Deshalb wurden die Schnittstellen in der MCS von pSXneo0.8T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub> eliminiert. Nach persönlicher Mitteilung von Prof. Dr. Titia de Lange (New York) enthält das Plasmid mehrere *EcoRI*-Schnittstellen. Um zu verhindern, daß beim Aufschneiden des Plasmids mit *EcoRI* ein Teil des Vektors verloren geht, wurde der Telomerrepeat mit den Enzymen *ClaI* und

*XbaI* ausgeschnitten und in den Vektor pGEM-7, der keine weitere *EcoRI*-Schnittstelle enthält, umkloniert.

Im nächsten Schritt wurde der neu entstandene Vektor 0.8T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>-pGEM7 mit *EcoRI* und *KpnI* geschnitten und anschließend ein Linker (LinkerA) einligiert. Die Sequenz des Linkers ist so gewählt, daß seine überhängenden Enden mit den Schnittstellen von *EcoRI* bzw. *KpnI* kompatibel sind, aber die Palindrome der Erkennungssequenz im resultierenden Vektor 0.8TelpGEM7 zerstört werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Umklonierung des Telomerrepeats aus pSXneo0.8T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>**

Ziel der hier dargestellten Klonierungsschritte war es, die beiden Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *KpnI*, die sich neben der Repeatsequenz befinden, zu eliminieren. Die Sequenz unter den oberen beiden Plasmiden entspricht der Multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pSXneo0.8T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>. Über der Sequenz sind die Schnittstellen für Restriktionsenzyme angegeben. Enzyme, die nur einmal im Plasmid schneiden, sind kursiv dargestellt. Die Enzyme, die für die einzelnen Konstruktionsschritte verwendet wurden, sind fett gedruckt.

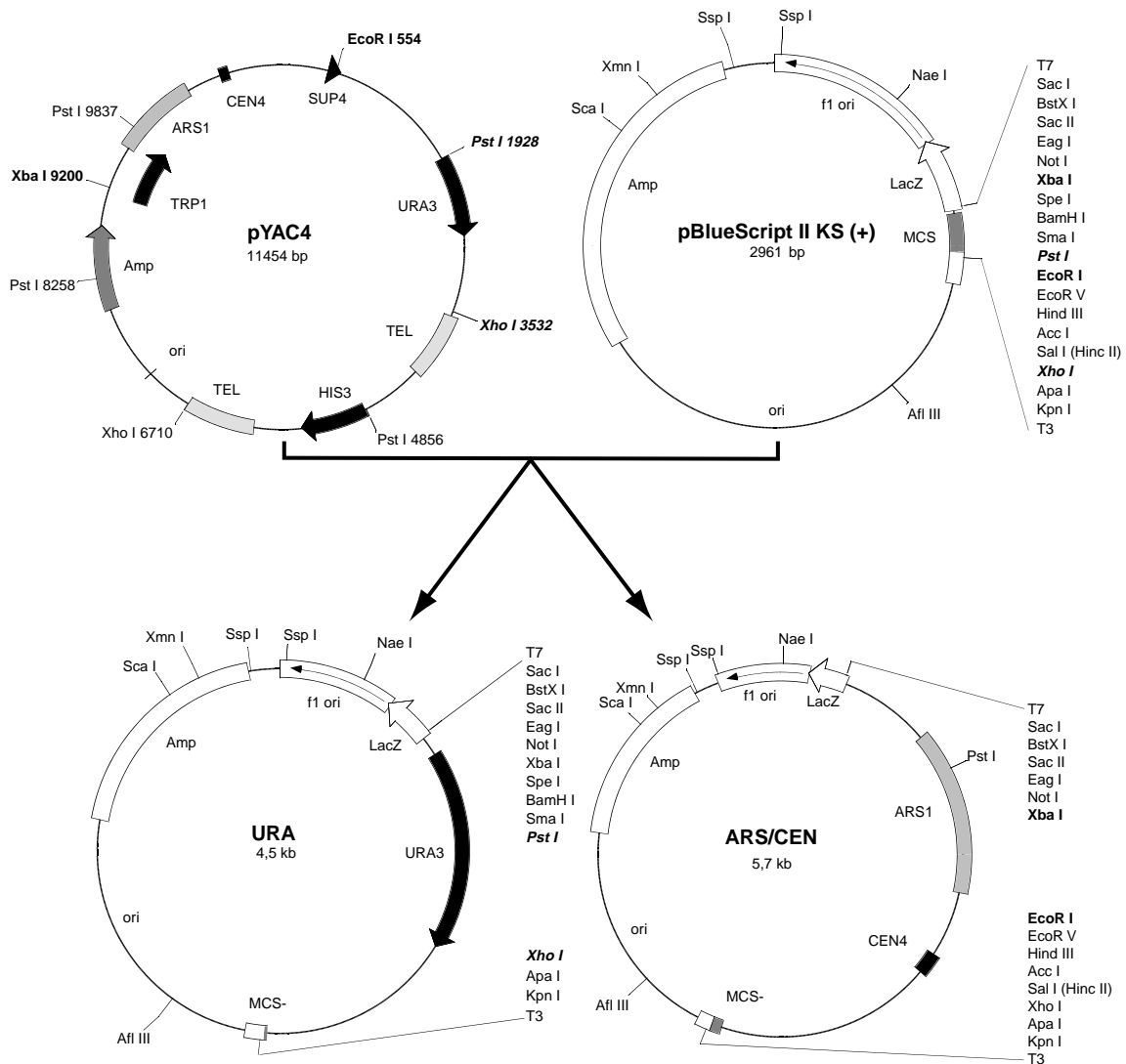


### 3.3.2.2 Klonierung zweier Fragmente aus pYAC4 (ARS/CEN/URA)

Aus dem Vektor pYAC4 (Burke et al., 1987) wurden zwei Fragmente, die die unten näher beschriebenen Sequenzelemente enthalten, ausgeschnitten (Abbildung 20) und in einem zweiten Konstruktionsschritt zusammengefügt (Abbildung 21). Das Hefeentromer *CEN4* und die autonome Replikationssequenz *ARS1* lagen zusammen auf einem 2,8 kb großem *EcoRI-XbaI*-Fragment. Beide Elemente sind zur Replikation eines großen linearen DNA-Moleküls in Hefe notwendig. Das Fragment wurde mit den beiden Restriktionsenzymen aus dem Vektor pYAC4 ausgeschnitten und in den Vektor pBlueScriptIIKS(+) eingefügt (ARS/CEN).

Zusätzlich wurde aus dem Vektor pYAC4 ein 1,6 kb *PstI-XhoI*-Fragment, auf dem das *Ura*-Gen liegt, in den Vektor pBlueScriptIIKS(+) umkloniert. Das *URA3*-Gen kodiert für die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, das für die Uracilbiosynthese notwendig ist. Hefezellen, die eine *URA3*-Mutation haben, wachsen nur in uracilhaltigem Medium. Transfiziert man ein *URA3*-Plasmid in einen solchen Hefestamm, wachsen die Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, auch in Medium ohne Uracil. Zusätzlich zu dieser positiven Selektion ist auch eine negative Selektion mit dem *URA3*-Gen möglich. Die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase wandelt 5-Fluoro-Orotinsäure (5-FOA) in das giftige 5-Fluorouracil um. *URA3*-Zellen werden dadurch am Wachstum gehindert. Zellen, die eine *URA3*-Mutation aufweisen, sind hingegen 5-FOA resistent.

Beim Herausschneiden des *PstI-XhoI*-Fragmentes entstehen mehrere Restriktionsfragmente ähnlicher Größe. Zur Identifizierung von Klonen, die das richtige Restriktionsfragment enthalten, wurden analytische Restriktionsspaltungen mit den Enzymen *HindIII* und *ScaI* durchgeführt. Bei Klonierung des gewünschten Fragmentes sollten sich bei der *HindIII*-Spaltung des Vektors zwei, 136 bp bzw. 4390 bp große Fragmente ergeben. Eine Spaltung des Plasmids mit *ScaI* führt zu einem 3056 bp und einem 1470 bp großen Fragment.



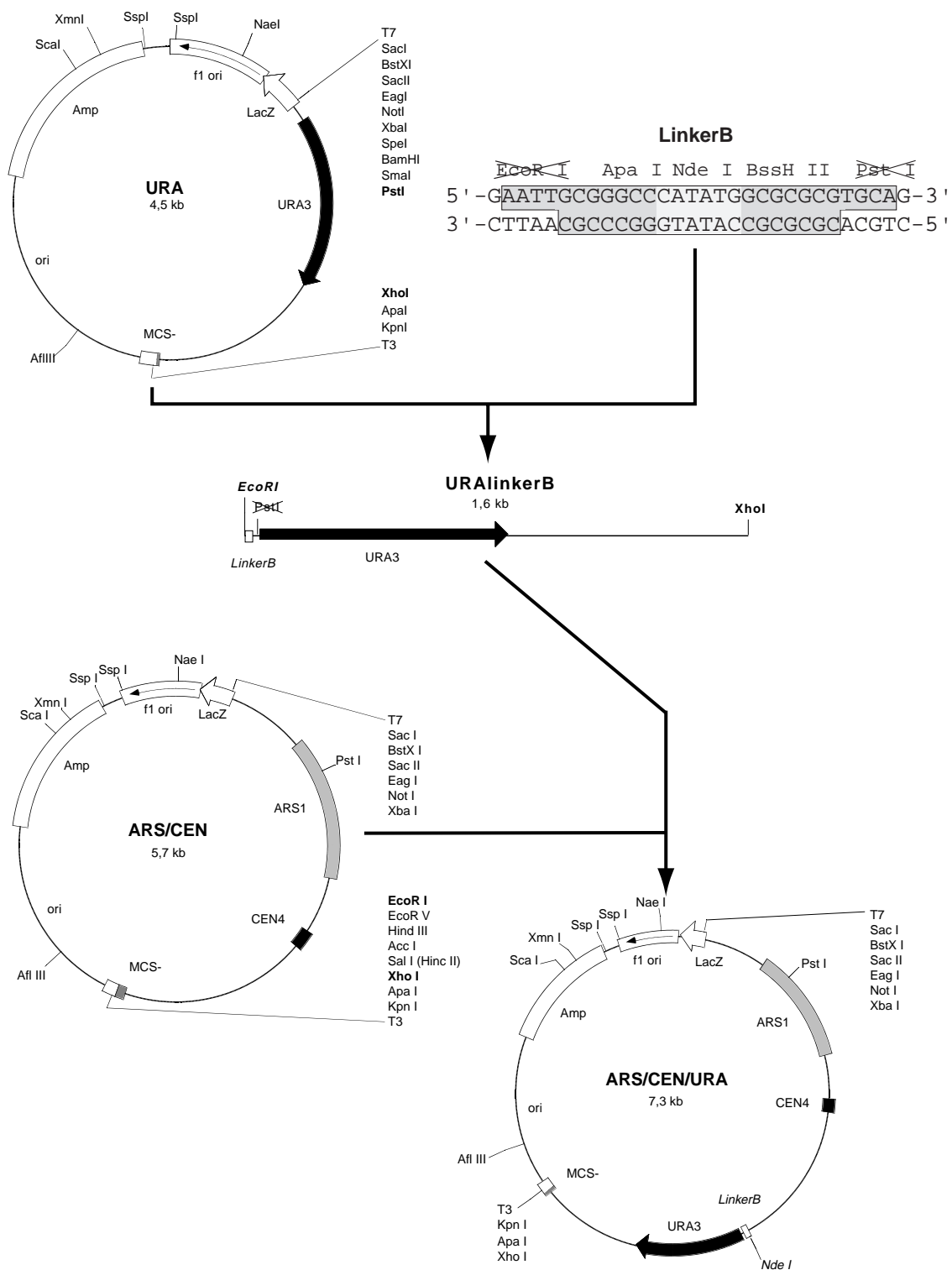
**Abbildung 20: Subklonierung von ARS1, CEN4 und URA3 aus pYAC4**

Aus dem Vektor pYAC4 wurden zwei unterschiedliche Restriktionsfragmente ausgeschnitten und in den Plasmidvektor pBlueScriptII subkloniert. Auf dem 1,6 kb großen *PstI*, *XhoI* geschnittenen Fragment liegt das *URA3*-Gen und auf dem 2,8 kb großen *XbaI*, *EcoRI* geschnittenen Restriktionsfragment *ARS1* und *CEN4*. Die verwendeten Schnittstellen sind in der Abbildung fett gedruckt.

Um die beiden Fragmente aus pYAC4 zusammenzufügen, wurde ein Linker entworfen, der die beiden Fragmente aus den Plasmiden URA und ARS/CEN aneinander setzt (Abbildung 21). Er zerstört dabei die *EcoRI*-, bzw. die *PstI*-Schnittstelle der Fragmente und fügt eine diagnostische *NdeI*-Schnittstelle ein (LinkerB).

Zuerst wurde der Vektor URA mit dem Restriktionsenzym *PstI* geschnitten. Danach wurde an den linearisierten Vektor der LinkerB ligiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend mit *XhoI* geschnitten und die Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Aufreinigung und Ankonzentrierung des 1,6 kb großen Fragmentes wurde es in den zuvor mit *XhoI* und *EcoRI* geschnittenen Vektor ARS/CEN einligiert. Zur Kontrolle wurde der neu klonierte Vektor mit *NdeI*, *EcoRI* und *PstI* geschnitten. Bei erfolgreicher Klonierung wird der Vektor mit *NdeI*, nicht

aber mit *EcoRI* bzw. *PstI* geschnitten. Der neu entstandene Vektor trug die Bezeichnung ARS/CEN/URA.



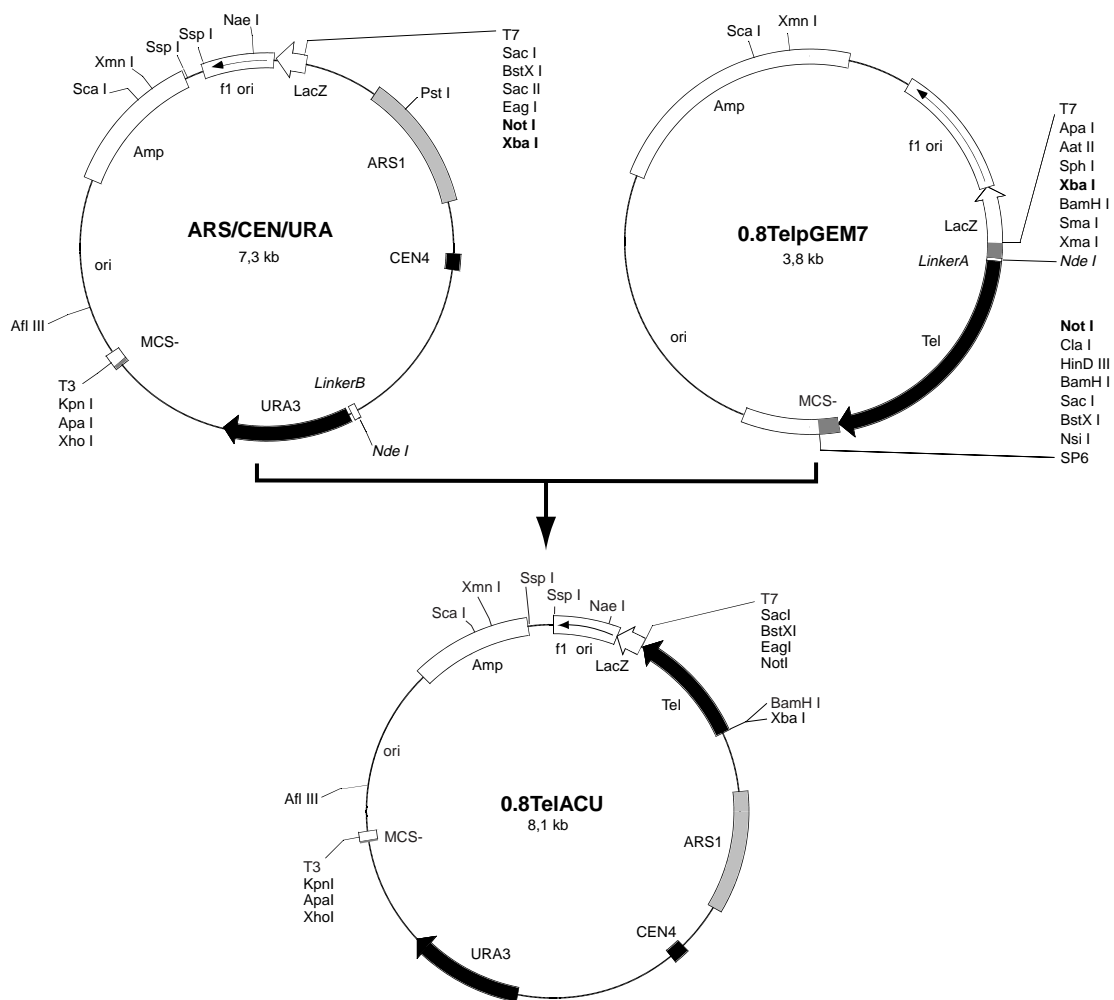
**Abbildung 21: Zusammenfügen der zwei Restriktionsfragmente aus pYAC4 (ARS/CEN/URA)**

Um die beiden Restriktionsfragmente aus pYAC4 zusammenzufügen, wurde das Insert aus dem Plasmid URA mit den Enzymen *XhoI* und *PstI* herausgeschnitten und zusammen mit einem Linker (LinkerB) zwischen die *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstelle des Plasmids ARS/CEN eingefügt. Der LinkerB fügt an der *PstI*-Seite des Fragmentes ein zur *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors ARS/CEN kompatiblen 5'-Überhang an. Die verwendeten Schnittstellen sind in der Abbildung fett gedruckt.

### 3.3.2.3 Konstruktion des Vektors 0.8TelACU

Der 800 bp Telomerrepeat und die Elemente aus pYAC4 sollten als ein Fragment in den Grundvektor pPNT eingefügt werden. Daher wurden sie zuvor in einem Zwischenschritt zusammengesetzt (Abbildung 22).

Der Telomerrepeat wurde dazu mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XbaI* aus dem Vektor 0.8TelpGEM7 herausgeschnitten. Der Vektor mit den Hefeelementen ARS/CEN/URA wurde mit denselben Enzymen geschnitten, um den Telomerrepeat in der anschließenden Ligation aufnehmen zu können. Das neu entstandene Konstrukt 0.8TelACU ermöglicht es, beide Elemente, zusammen in einem Fragment aus dem Vektor auszuschneiden.



**Abbildung 22: Der Vektor 0.8TelACU**

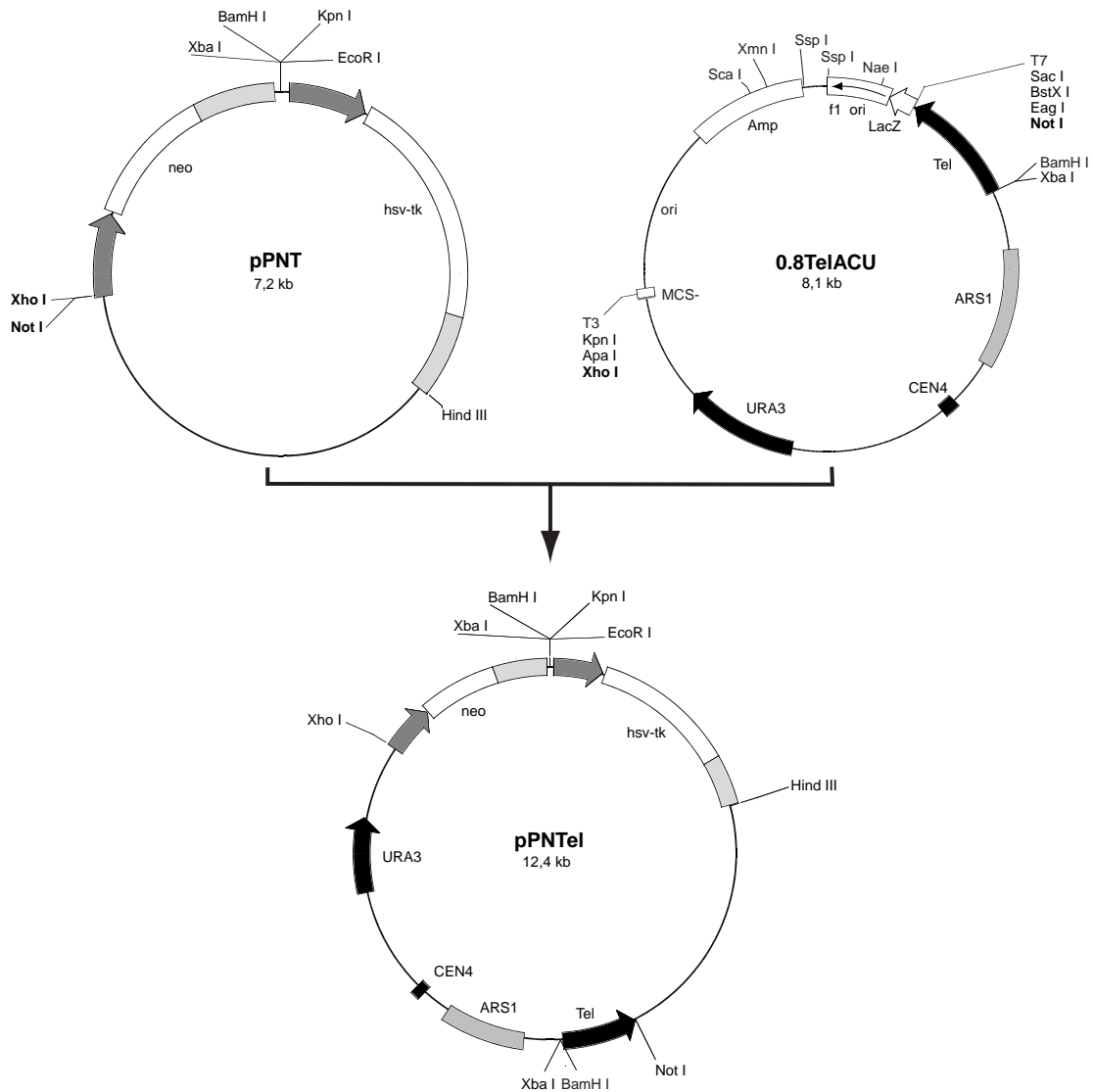
Der Vektor ARS/CEN/URA wurde mit den beiden Enzymen *NotI* und *XbaI* geschnitten. Der Telomerrepeat aus 0.8TelpGEM7 wurde mit den gleichen Enzymen herausgeschnitten und in ARS/CEN/URA einligiert. Der neu entstandene Vektor enthält die Sequenzen aus *S. cerevisiae* und einen Telomerrepeat aus Säugerzellen.

#### 3.3.2.4 Der Vektor pPNTel

Als Grundkonstrukt zur Klonierung der Fragmentierungsvektoren diente der in Kapitel 3.3.1 schon erwähnte Vektor pPNT (Tybulewicz et al., 1991). Um den Telomerrepeat und die Elemente aus Hefe in den Grundvektor pPNT einzufügen, wurde das Teilstück, das die gewünschten Sequenzen enthält, mit den beiden Restriktionsenzymen *XhoI* und *NotI* aus dem Vektor 0.8TelACU ausgeschnitten. Das Insert hat eine Größe von 5,2 kb. Das Plasmid pPNT wurde mit den gleichen Enzymen gespalten. Anschließend wurde das 5,2 kb große Fragment in den Vektor ligiert (Abbildung 23).

Zur Kontrolle dieses Konstruktionsschrittes wurde zuerst eine *XhoI/XbaI*-Spaltung durchgeführt. Bei erfolgreicher Klonierung ergeben sich 3 Fragmente der Größen 6,3 kb, 4,3 kb und 1,9 kb. Addiert man alle drei Fragmentgrößen, ergibt sich die zuvor errechnete Größe des Konstruktes von etwa 12,4 kb. Dabei ist das 4,3 kb große Fragment mit dem *XbaI/XhoI*-Insert des Vektors ARS/CEN/URA identisch. Zur weiteren Überprüfung wurden zwei weitere Restriktionsspaltungen mit den Enzymkombinationen *XhoI/NotI* und *XbaI/NotI* durchgeführt. Mit der *XhoI/NotI*-Spaltung wurde die Größe des Inserts und des Ausgangsvektors pPNT überprüft und mit der *XbaI/NotI*-Spaltung die Größe des Fragmentes, in dem sich der Telomerrepeat befindet.

Bei der Präparation der Plasmid-DNA im größeren Maßstab (Maxiprep) ließ sich beobachten, daß in dem verwendeten Bakterienstamm DH10B der Telomerrepeat des Konstruktes verloren gehen kann. Daher war es notwendig, bei jeder neuen Präparation des Plasmids, die oben beschriebenen Restriktionsspaltungen mit der neuen DNA als Kontrolle durchzuführen.



**Abbildung 23: Der Vektor pPNTel**

Als Ausgangsbasis zur Klonierung dieses Vektors diente der Vektor pPNT (Tybulewicz et al., 1991). Zur Konstruktion von pPNTel wurde zwischen die *Xho*I- und *Not*I-Schnittstellen von pPNT das mit den gleichen Enzymen geschnittene Fragment aus 0.8TelACU einkloniert. Die verwendeten Schnittstellen sind in der Abbildung fett gedruckt.

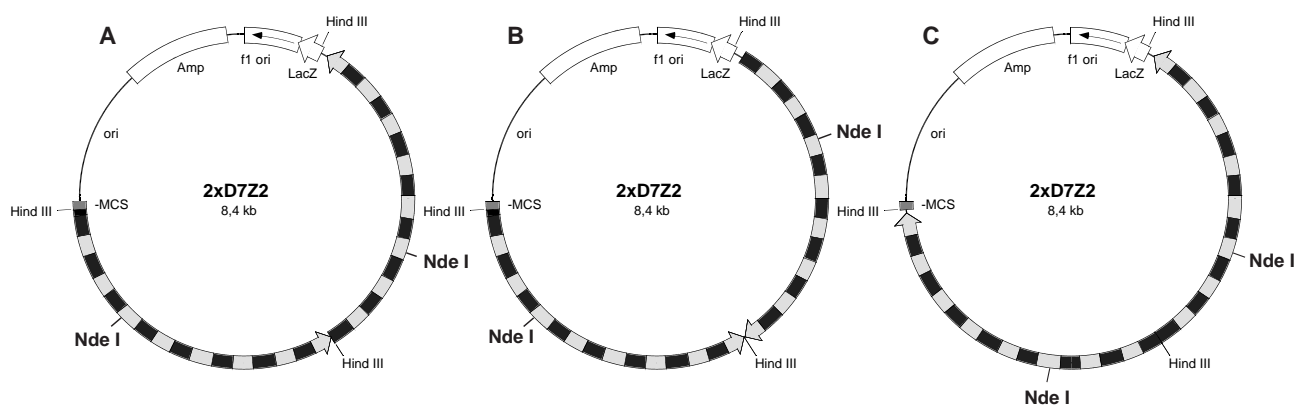
### 3.3.2.5 Klonierung eines 2,7 kb großen $\alpha$ -Satelliten aus D7Z2

Der Bereich D7Z2 des menschlichen Chromosoms 7 besteht aus sich wiederholenden Sequenzen ( $\alpha$ -Satellitenrepeat), die zu einem Repeat höherer Ordnung organisiert sind. Dieser wiederum wiederholt sich vielfach und bildet ein etwa 100-550 kb großes Gebiet (D7Z2) (Wevrick et al., 1991; Abschnitt 1.5.2).

Durch die Wiederholungen ergibt sich in regelmäßigen Abständen (2,7 kb) eine Schnittstelle für das Enzym *Hind*III. In dem Plasmid pMGB7 ist ein solches 2,7 kb großes Fragment aus einem Phagen subkloniert worden (Waye et al., 1987).

Um eine homologe Rekombination zwischen der transfizierten DNA und der genomischen Sequenz zu ermöglichen, sollte es zwischen den homologen Bereichen nahezu keine Sequenzabweichungen geben (Deng und Capecchi, 1992). Da eine vollkommene Sequenzhomologie des Repeats aus pMGB7 mit den Sequenzen des Derivatvchromosoms 7 in der Zelllinie RR14 nicht gewährleistet ist, wurde aus genomischer DNA der Zelllinie ein 2,7 kb großes *HindIII*-Fragment aus D7Z2 kloniert.

Dazu wurde DNA der Zelllinie mit *HindIII* gespalten und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Fragmente, die eine Größe von ca. 2,7 kb hatten, wurden aus dem Gel eluiert und in pBlueScriptIIS(+), eingefügt. Durch Koloniehybridisierung wurde ein Bakterienklon identifiziert, der einen Repeat aus D7Z2 enthält. Als Sonde diente das Plasmid pMGB7. Zur Analyse des Klonen wurden Restriktionsanalysen mit den Enzymen *SacI*, *HindIII*, *ScaI* und *NdeI* durchgeführt. Es ergaben sich die durch das Plasmid pMGB7 bekannten Fragmentgrößen (2958 bp, 1707 bp, 1024 bp für *SacI*; 2961 bp und 2728 bp für *HindIII*; 3140 bp und 2549 bp für *ScaI*; 5689 bp für *NdeI*). Daher kann davon ausgegangen werden, daß das klonierte Fragment ein Stück des  $\alpha$ -Satellitenrepeats D7Z2 ist. Damit stand ein kloniertes Fragment aus D7Z2 zur Verfügung, das mit Sequenzen aus dem Zentromer des menschlichen Chromosoms aus RR14 zu 100% identisch ist (Abbildung 25, oben).

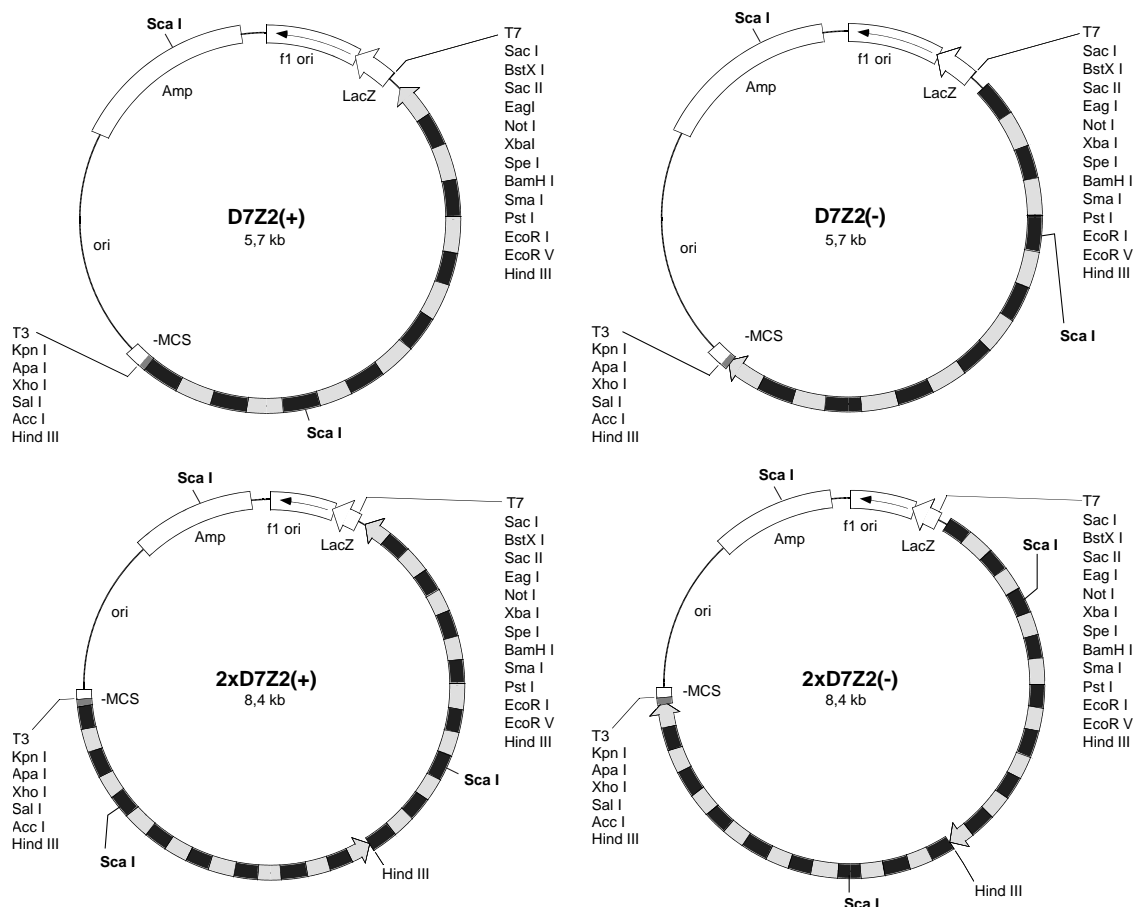


**Abbildung 24: Orientierung möglicher Dimere**

Die Abbildung zeigt Vektoren mit möglichen Dimeren des klonierten Fragmentes aus D7Z2. In Abbildung A haben sich die Fragmente parallel und in B und C antiparallel zueinander angeordnet. Bei A und einer umgekehrten Orientierung des parallelen Fragmentes zum Vektor (nicht gezeigt) ergaben sich bei einer *NdeI*-Spaltung zwei Fragmente der Größe 5689 bp und 2728 bp. Die Orientierungsmöglichkeiten B, 4777 bp und 3640 bp, und C, 6601 bp und 1816 bp, wurden in 8 analysierten Klonen mit Dimeren nicht gefunden.

Zur Herstellung eines Fragmentes, das größer als 2,7 kb ist, wurde das Insert aus dem Vektor D7Z2 mit *HindIII* herausgeschnitten und unter solchen Bedingungen in den Vektor wieder einligiert, daß nicht nur Monomere des Fragmentes, sondern auch Polymere eingebaut wurden

(Abbildung 25, unten). Von 60 untersuchten Bakterienklonen konnten 10 mit klonierten Multimeren identifiziert werden, davon waren 8 Dimere. Die Orientierung der Fragmente im Dimere (parallel oder antiparallel), wurde durch eine *NdeI*-Spaltung ermittelt (Abbildung 24). Es ergaben sich nur Fragmente der Größen 5689 bp und 2728 bp, was den erwarteten Fragmentgrößen bei paralleler Anordnung der  $\alpha$ -Satelliten entspricht (A). Hätten sich die  $\alpha$ -Satellitenfragmente antiparallel zusammengefunden, wären Restriktionsfragmente der Größen 4777 bp und 3640 bp (B), bzw. 6601 bp und 1816 bp (C) entstanden. Auch die beiden Multimere, die mehr als zwei mal den Repeat aufgenommen hatten, zeigten bei der Restriktionsspaltung nur Fragmente der Größen 5689 bp und 2728 bp. Dabei war deutlich zu erkennen, daß die 2728 bp-Bande mehr DNA enthielt als die größere. Das läßt den Schluß zu, daß sich auch in diesen beiden Klonen die Repeats parallel angeordnet hatten.



**Abbildung 25: Klonierung der  $\alpha$ -Satellitensequenz aus D7Z2**

Es wurde ein 2,7 kb großes *HindIII*-Fragment aus dem  $\alpha$ -Satelliten D7Z2 in den Vektor pBlueScriptIIKS(+) kloniert. Die oberen beiden Plasmide zeigen den klonierten Bereich aus D7Z2 in unterschiedlicher Orientierung zum Vektor: (+) oder (-). Die unteren beiden Plasmide (2xD7Z2) zeigen jeweils Dimere des klonierten Repeats, in beiden möglichen Orientierungen zum Vektor. *ScaI*-Schnittstellen sind in der Abbildung fett gedruckt.



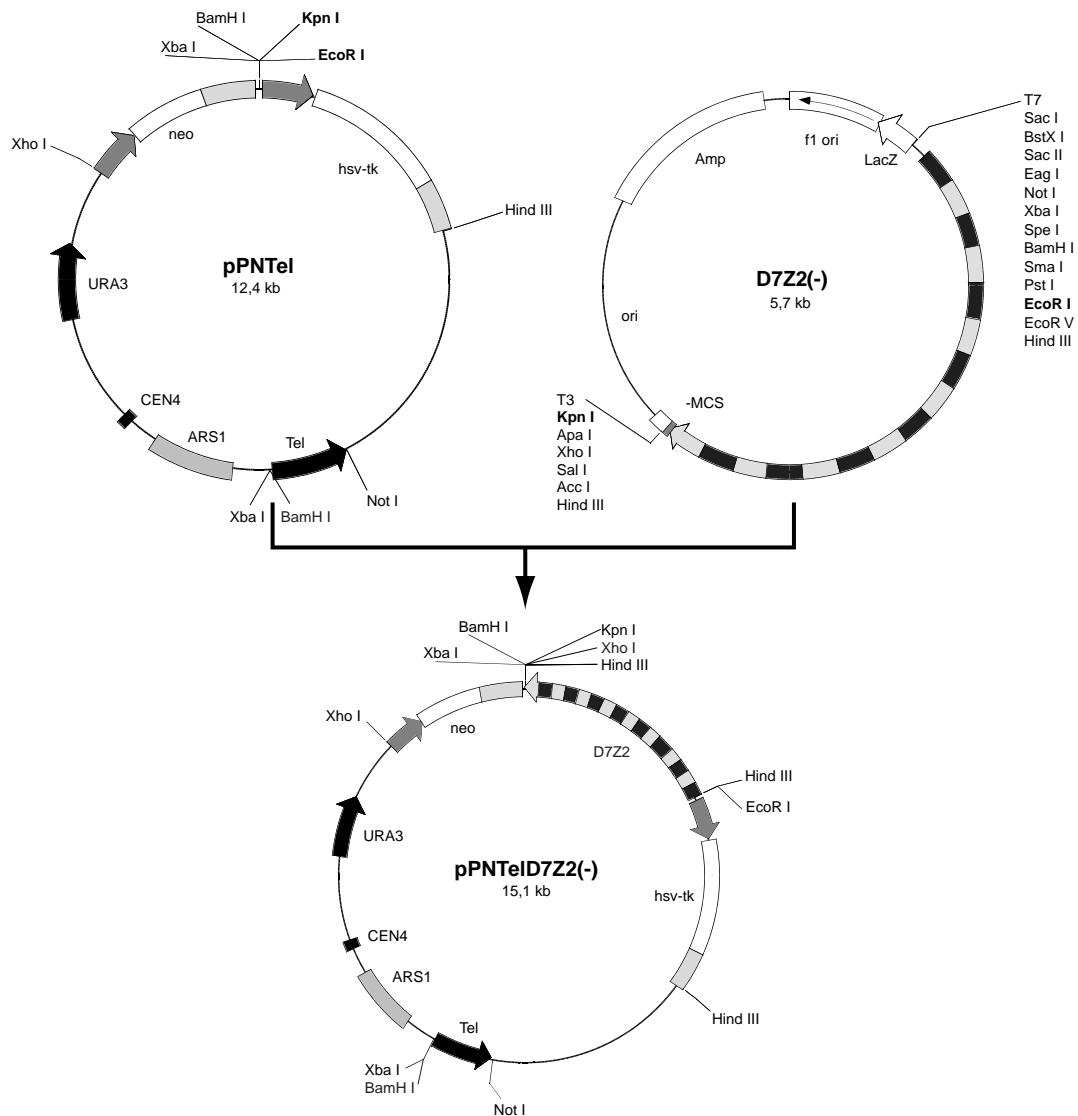
In Abbildung 25 sind zwei Mono- und zwei Dimere des  $\alpha$ -Satellitenfragmentes dargestellt. Die Orientierung des Repeats im Vektor ist mit plus (+) und minus (-) angegeben. Spaltet man die DNA eines Monomeres mit *ScaI*, so ergeben sich bei der (+)-Orientierung zwei Fragmente der Größen 3140 bp und 2549 bp. Ist der  $\alpha$ -Satellitenrepeat in umgekehrter Richtung in den Vektor pBlueScriptIIKS(+) kloniert worden (-), erhält man zwei Fragmente der Größen 3789 bp und 1900 bp.

Da gezeigt wurde, daß alle Dimere 2xD7Z2 parallel angeordnet waren, ergaben sich bei einer *ScaI*-Spaltung der DNA nur zwei mögliche Fragmentgrößenkombinationen: 3140 bp, 2728 bp und 2549 bp für die (+)-Orientierung sowie 3789 bp, 2728 und 1900 für die umgekehrte (-)-Orientierung des Repeats. Alle vier zur weiteren Konstruktion des Fragmentierungsvektors verwendeten Klone wurden aus dem Vektor heraus ansequenziert. Damit konnten die zuvor beschriebenen Ergebnisse verifiziert werden.

### 3.3.2.6 Konstruktion der Vektoren pPNTelD7Z2

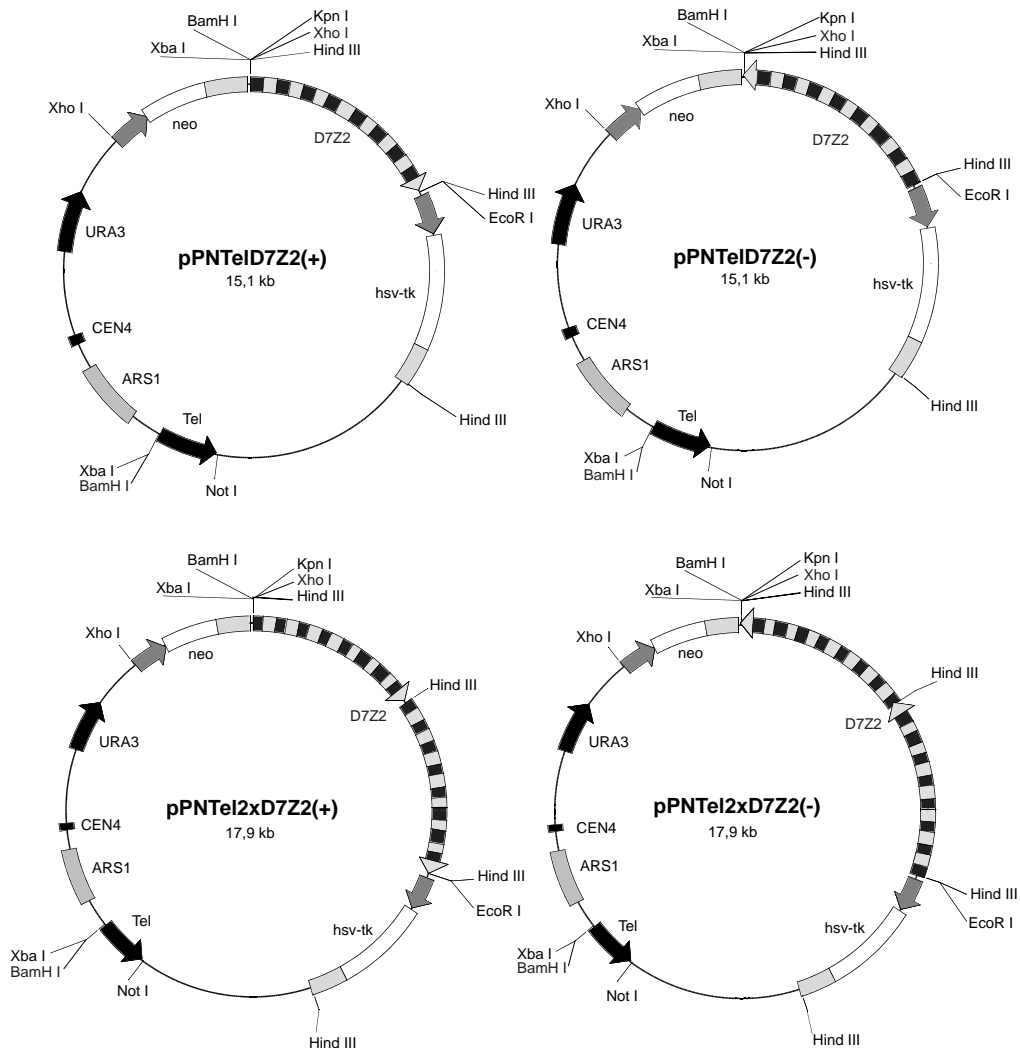
In diesem letzten Klonierungsschritt wurden die  $\alpha$ -Satellitensequenzen aus dem Bereich D7Z2 in den Chromosomenfragmentierungsvektor pPNTel einligiert (Abbildung 26). Dieser zu den genomischen Sequenzen von Chromosom 7 homologe Bereich wurde zwischen den beiden Selektionsmarkern des Plasmids pPNTel eingefügt (Kapitel 3.3.1). Dazu wurden die  $\alpha$ -Satelliten mit *EcoRI* und *KpnI* aus dem Vektor herausgeschnitten und jeweils die 2,7 kb bzw. 5,4 kb großen Fragmente isoliert. Da bei den beiden Konstrukten, die die monomeren Repeats enthielten, Insert (2,7 kb) und Vektor (3,0 kb) etwa gleich groß waren, wurde der Vektor zuvor noch durch eine *BglII*-Spaltung in drei kleinere Teile (252 bp, 1267 bp und 1442 bp) zerschnitten. Das Insert enthielt keine Schnittstelle für *BglII* und blieb daher unversehrt.

Das Plasmid pPNTel wurde ebenfalls mit den Enzymen *EcoRI* und *KpnI* geschnitten. Anschließend wurden die Fragmente mit den  $\alpha$ -Satelliten in den Vektor ligiert. In Abbildung 27 sind alle Konstrukte, die in diesem letzten Klonierungsschritt hergestellt wurden, dargestellt.



### Abbildung 26: Das Plasmid pPNTelD7Z2

In den Vektor pPNTel wurde die homologe Sequenz aus D7Z2 eingesetzt. Dazu wurde die *EcoRI*- und die *KpnI*-Schnittstelle verwendet (fett gedruckt). Plus (+) und minus (-) gibt wie zuvor die Orientierung der  $\alpha$ -Satelliten zum umgebenden Vektor an. Da die *KpnI*-Schnittstelle im Uhrzeigersinn vor der *EcoRI*-Schnittstelle in der Klonierungsseite des Vektors pPNT liegt, ändert sich im Vergleich zu den Ausgangsvektoren [z.B.: D7Z2(+)] die Orientierung des  $\alpha$ -Satellitenrepeats.



**Abbildung 27: Plasmide mit unterschiedlichen homologen Regionen**

Diese Abbildung zeigt alle Plasmide pPNTelD7Z2, die durch Einklonieren der homologen Sequenzen aus Abbildung 25 in den Vektor pPNTel entstanden sind. Es existieren Vektoren mit Mono-[pPNTelD7Z2(+)] und (-)] und Dimeren [pPNTel2xD7Z2(+)] und (-)] des Repeats in unterschiedlicher Orientierung zur Vektorsequenz.

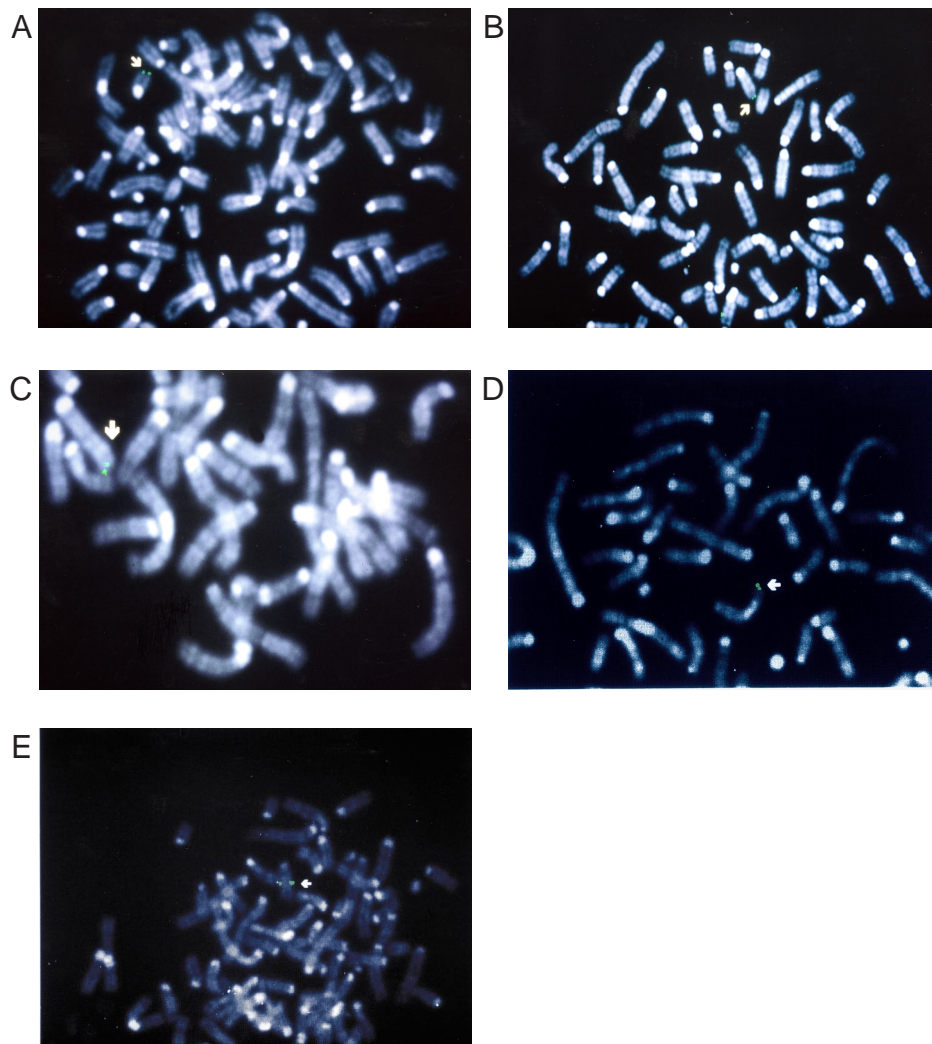
### 3.3.3 Chromosomenfragmentierung in der Zelllinie Ru Rag 14-4-7-44

Die Integration klonierter Telomer-DNA in Säugerchromosomen und Formation neuer Telomere ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Unter anderem ist die Sequenz des klonierten Repeats ausschlaggebend. Nur Telomerrepeats der Sequenz  $(TTAGGG)_n$  sind in Säugerzellen effektiv in der Lage, neue Telomere zu erzeugen. Die Lage des Telomerrepeats im transfizierten Konstrukt hat dabei ebenfalls einen Einfluß. Liegt der Telomerrepeat am Ende eines linearen DNA-Fragmentes, werden mehr Telomere neu gebildet als in zirkulären Konstrukten oder bei einer Lage des Repeats in der Mitte. Die Länge des Repeats spielt dabei eine untergeordnete Rolle (Hanish et al., 1994).

Ein weiterer Faktor ist neben dem transfizierten Konstrukt die verwendete Zelllinie, in der neue Telomere erzeugt werden sollen. Es wurde beobachtet, daß in embryonalen Stammzellen (ES) der Maus besonders viele Telomere neu gebildet werden. In HeLa-, HT1080-, EC27C4-Zellen und Wg3H (Hamsterzellen) ist es ebenfalls möglich, Telomere neu zu formieren. Dagegen konnten in nicht transformierten somatischen Zellen (10T1/2) nur sehr schlecht und in primären menschlichen Fibroblasten keine neuen Telomere erzeugt werden (Barnett et al., 1993; Farr et al., 1991).

Da über eine Telomer-verursachte Chromosomenfragmentierung in der hier verwendeten Zelllinie RR14 zuvor keine Erkenntnisse vorlagen, war es notwendig zu zeigen, daß der Vektor pPNTel, der den zur homologen Rekombination benötigten Bereich aus D7Z2 noch nicht enthält, in der Lage ist, an beliebiger Stelle im Genom der Zelllinie RR14 ein Chromosom zu brechen.

Dazu wurde in die Zellen der Vektor pPNTel transfiziert (2.2.12.4), und die Zellen anschließend mit Geneticin selektioniert. An Metaphasechromosomen dieser Zellen wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) durchgeführt (Abbildung 28). Durch die FISH konnte die Position des transfizierten Konstruktes im Genom der Akzeptorzellen lokalisiert werden. Dabei war in den meisten Fällen das Fluoreszenzsignal randständig an den Chromosomenenden zu beobachten. So wie man es erwartet, wenn der Vektor nach der Integration die Chromosomen gebrochen hat. Dies ist eine Grundvoraussetzung, um das menschliche Chromosom der Zelllinie gezielt im Zentromer zu verkürzen.



**Abbildung 28: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) von mit pPNTel transfizierten RR14 Zellen**

Diese Abbildung zeigt mit dem Plasmid pPNTel transfizierte Hybridzellen der Linie RR 14. Die Zellen wurden mit DNA des Plasmids pPNTel transfiziert. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel mit geneticinhaltigem Medium (600 µg/ml) durchgeführt und die Zellen 1:2 geteilt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte ausschließlich mit geneticinhaltigem Medium.

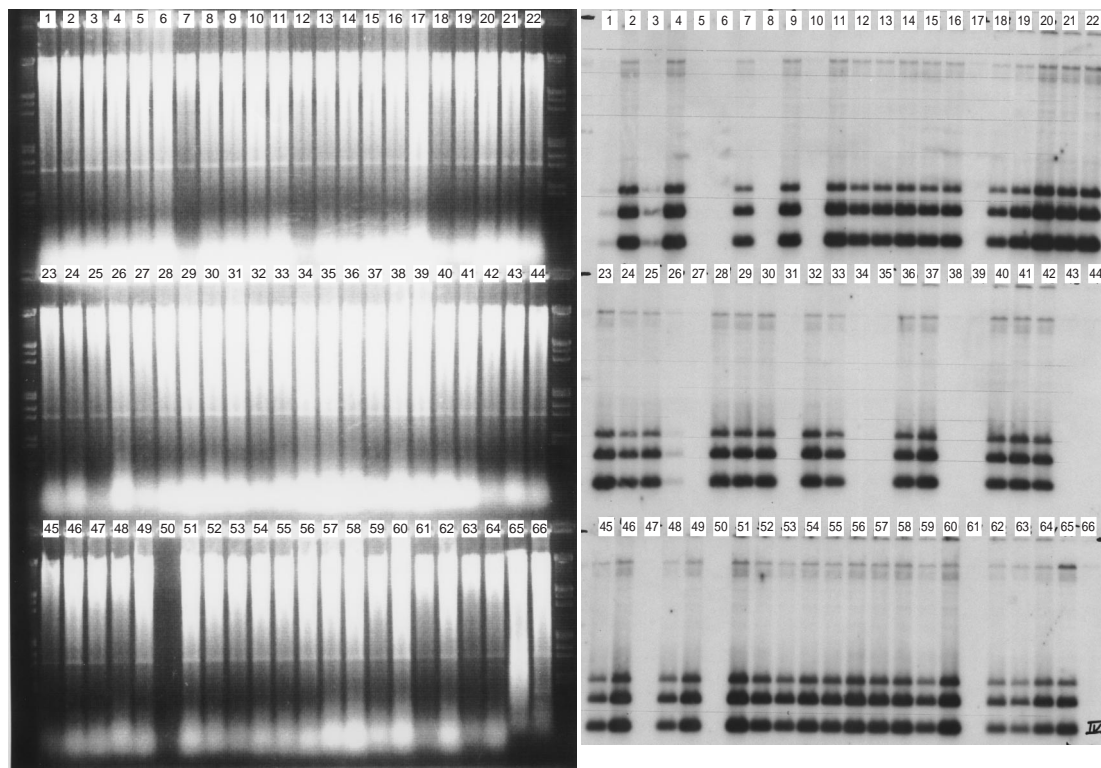
Nach Präparation von Chromosomen selektionierter Zellen wurde eine FISH mit dem Plasmidvektor ARS/CEN/URA als Sonde durchgeführt. In den Abbildungen A-D ist ein Hybridisierungssignal (Pfeil) telomernah zu erkennen. In Bild E hybridisiert die Sonde nicht am Telomer.

### 3.3.4 Transfektion der Zelllinie Ru Rag 14-4-7-44-7 mit dem Vektor pPNTelD7Z2(+) und Subklonierung von Zellklonen

Nachdem gezeigt wurde, daß die klonierte Telomer-DNA in der Zelllinie RR14 endständig an Chromosomen zu finden ist (3.3.3), sollte das schon verkürzte Chromosom 7 aus RR14 gezielt im Zentromer gebrochen werden (3.3.1).

Dazu wurden die Zellen mit dem durch *NotI* linearisierten Vektor pPNTelD7Z2(+) transfiziert. Nach Selektion der Zellen mit Geneticin und Gancyclovir ließen sich 345 vereinzelte Zellklone kultivieren (Kapitel 2.2.13). Zur Analyse wurde aus den einzelnen Zellklonen genomische DNA extrahiert.

Da das menschliche Chromosom der Menschmaushybridzellen nicht stabil auf die Tochterzellen weitergegeben wird, wurden die Zellklone durch eine Southernblotanalyse auf das Vorhandensein von  $\alpha$ -Satellitensequenzen aus D7Z1 und damit auf das Vorhandensein des menschlichen Chromosom 7 getestet (Abbildung 29).



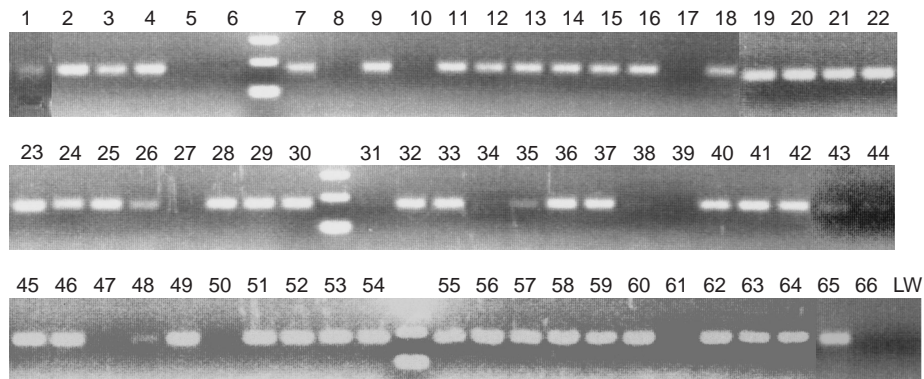
**Abbildung 29: Analyse der selektierten Zellklone auf das Vorhandensein von D7Z1**

Das linke Bild zeigt *EcoRI* geschnittene genomische DNA, die anschließend auf einem 1-%igen Agarosegel aufgetrennt wurde. Das rechte Bild zeigt den Southernblot des gleichen Gels. Als Sonde wurde die zuvor mit  $P^{32}$  radioaktiv markierte, aus D7Z1 klonierte DNA p $\alpha$ 7d1 verwendet. Die Numerierung der Proben entspricht der in Abbildung 30. In den Spuren, in denen sich DNA aus Zellklonen befindet, die das menschliche Chromosom 7 noch enthalten, sind die drei für D7Z1 typischen Banden der Größen 340 bp, 680 bp und 1020 bp zu erkennen (siehe auch Abbildung 11A).

Da sich der  $\alpha$ -Satellit D7Z2 zwischen D7Z1 und dem codierenden Bereich des kurzen Armes 7p befindet, besteht bei einem Bruch des Chromosoms in D7Z2 das resultierende Chromosom nur aus Sequenzen des Zentromers inklusive D7Z1. Das entstandene Minichromosom hätte also alle genomischen Sequenzen telomerwärts von D7Z2 verloren. Der abgebrochene Rest des kurzen Armes 7p sollte Anteile von D7Z2, nicht aber von D7Z1 enthalten. Da nicht bekannt ist, ob

die alleinige Existenz von D7Z2 eine Zentromerfunktion und damit die Möglichkeit einer Weitergabe auf die Tochterzellen garantiert, kann dieses Chromosomenfragment verloren gehen.

Daher wurden alle Zellklone durch PCR auf den Marker D7S494 (Abbildung 12, Seite 87), der telomerwärts von D7Z2 auf dem kurzen Arm liegt, untersucht (Abbildung 30 und 32).



**Abbildung 30: PCR mit für D7S494 spezifischen Primern**

Die Abbildung zeigt die Zusammenstellung der PCR-Ergebnisse für den Marker D7S494. In den Spuren 1-64 befindet sich DNA der Zellklone, in Spur 65 DNA der Zellenlinie RR14 und in Spur 66 als Negativkontrolle DNA der Mauszellenlinie Rag.

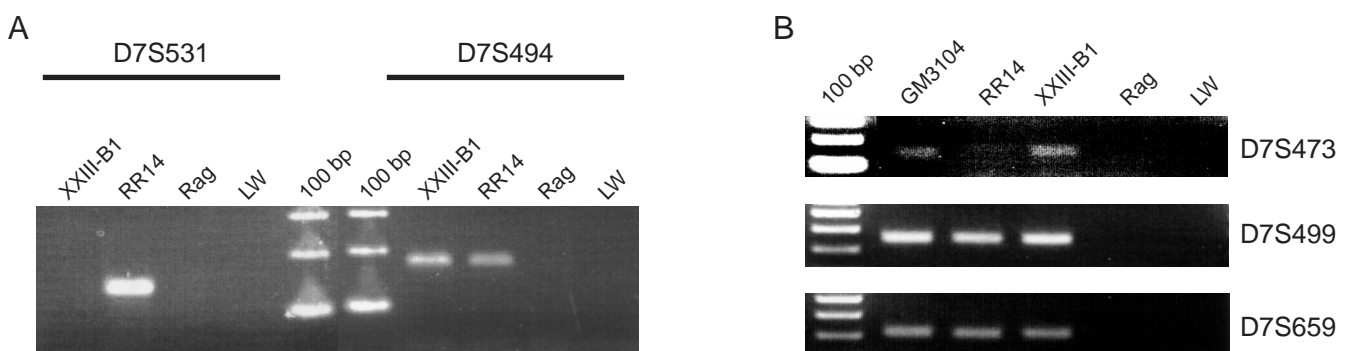
Vergleicht man die Gele der Abbildungen 29 und 30 stellt man fest, daß für D7Z1 positive Klone auch für den Marker D7S494 positiv sind. Es hat also sehr wahrscheinlich in keinem der Zellklone eine homologe Rekombination und Bruch des Chromosoms an beabsichtigter Stelle stattgefunden. Für die Zellklone, deren Analyse hier nicht abgebildet ist, ergab sich das gleiche Ergebnis.

Um festzustellen, ob das Konstrukt in einem der Zellklone durch ein nichthomologes Rekombinationsereignis in das menschliche Chromosom integriert ist und an dieser Stelle zufällig das Chromosom gebrochen hat, wurde eine PCR mit einem telomernahen Marker, D7S531 (Dib et al., 1996), durchgeführt. Bei der PCR mit DNA aller Zellklone, wurde ein Zell-Klon (XXIII-B1) identifiziert, der diesen Marker nicht enthält, jedoch für den Marker D7S494 positiv ist (Abbildung 29 und 30 Spur 25; Abbildung 31 und 32). Die PCR-Ergebnisse zeigen, daß dem Derivatvchromosom 7 des Klons XXIII-B1 ein weiterer Teil des kurzen Armes fehlt. Es hat ein Rekombinationsereignis des Vektors pPNTelD7Z2(+) in das menschliche Chromosom dieses Zellklons stattgefunden, welches zum Verlust des telomernahen Markers D7S531 führte (Abbildung 32).

Um das Ergebnis, daß das Derivatvchromosom des Zellklons XXIII-B1 noch zentromernaher Genabschnitte des kurzen Armes von Chromosom 7 enthält zu bestätigen, wurden drei weitere PCR-Reaktionen mit Primern für die STS D7S473, D7S499 und D7S659 (Abbildung 31B)

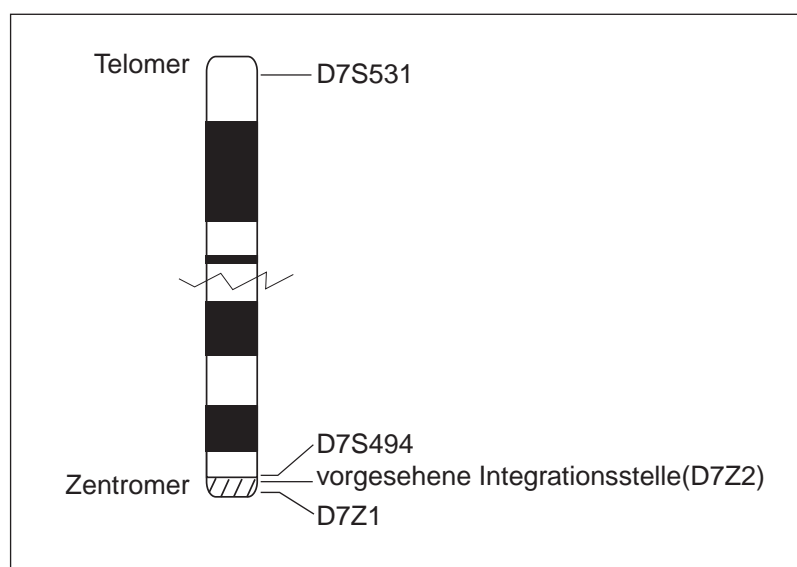
durchgeführt. Der Zellklon war für alle drei Marker positiv, so daß das Derivatvchromosom distal des Markers D7S659 gebrochen sein muß.

Von insgesamt 345 Zell-Klonen waren 217 positiv für D7Z1 und D7S494, daher scheint in keiner der Zelllinien der Vektor durch homologe Rekombination in das Zentromer integriert worden zu sein. In einer der 217 Zelllinien, die das menschliche Chromosom 7 noch enthielten, führte die Integration des Vektors in den kurzen Arm zu einer Verkürzung des Derivatvchromosoms 7p der Zelllinie RR14. Zusammen mit dem Telomerrepeat wurde ein Selektionsmarker in dieses Chromosom eingefügt, der es ermöglicht auf Zellen zu selektionieren, die das verkürzte Chromosom enthalten.



**Abbildung 31: Der Zellklon XXIII-B1**

A: In der Abbildung sind die PCR-Ergebnisse für die beiden Marker D7S494 (zentromernah) und D7S531 (telomernah) gezeigt. Mit DNA des Zellklons XXIII-B1 ergab sich kein spezifisches Produkt mit den Primern für D7S531. B: Das Derivatvchromosom des Zellklons XXII-B1 ist für drei weitere zentromernahe STS-Marker (D7S473, D7S499 und D7S659) positiv. (GM3104= human Kontrollzelllinie, RR14 =Ausgangszelllinie, Rag =Mauskontrolle, LW=Leerwert ohne DNA)



**Abbildung 32: Schematische Zusammenfassung der Analyse**

In der Abbildung ist die Lage der verwendeten Marker D7S531, D7S494, D7Z1 und die angestrebte Integrationsstelle in D7Z2 schematisch dargestellt.



## 4 Diskussion

Die Entwicklung eines Vektors, der geeignet ist, große DNA-Abschnitte in Säugerzellen zu übertragen, die stabil von einer Generation auf die nächste weitergegeben werden und auf Elementen natürlicher Säugerchromosomen beruht, kann auf unterschiedlichen Wegen verfolgt werden.

Eine mögliche Strategie zur Konstruktion eines solchen Vektors ist die Identifizierung und komplette Sequenzaufklärung funktioneller DNA-Elemente und eine anschließende Neukonstruktion eines linearen Säugerchromosoms, welches aus den minimal notwendigen Strukturen besteht. Da bis zum heutigen Zeitpunkt die elementaren Strukturen menschlicher Chromosomen, wie Zentromer und Replikationsursprünge, nicht hinreichend bekannt sind, kann dieser Ansatz momentan nicht in seiner ursprünglichen Intention verfolgt, sondern nur unter Zuhilfenahme putativer Bauelemente verwirklicht werden. Experimente, bei denen eine solche Strategie verfolgt wurde (Harrington et al., 1997b, Ikeno et al., 1998, Henning et al., 1999) (Abschnitt 1.6.1) bedienten sich dabei chromosomaler Abschnitte in der Größe ganzer YACs, bzw. neu konstruierter Stücke, deren Funktionalität trotz einiger wichtiger Indizien nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte.

Die Verkürzung eines natürlichen Säugerchromosoms bis zu einer minimalen Größe ist ein alternativer Ansatz. Dabei wird ein bereits bestehendes Chromosom mit Hilfe von integrierenden Vektoren, die Telomersequenzen enthalten und damit neue Chromosomenenden induzieren, gebrochen (Farr et al., 1991, 1992, 1995; Itzhaki et al., 1992; Barnett et al., 1993; Brown et al., 1994; Heller et al., 1996; Shen et al., 1997; Mills et al., 1999)(Abschnitt 1.6.2). Ein Vorteil dieses Ansatzes ist, daß es nicht erforderlich ist, die Sequenzen aller funktionell wichtigen Chromosomenbestandteile zu kennen, da nur Chromosomen mitotisch stabil sind, die alle elementaren Bausteine enthalten. Der Nachteil dieser Methode ist, daß auch nicht zwingend notwendige DNA-Sequenzen in solchen Minichromosomen vorhanden sein können. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser zweite Weg vorbereitet werden.

Während die Identifizierung und Sequenzierung der wichtigen Bauelemente des Zentromers unabdingbar ist, um Chromosomen *de novo* konstruieren zu können, ist die Kenntnis der physikalischen Abstände bekannter Marker und ihrer Lage zueinander im und um das Zentromer notwendig, um ein künstlich verkürztes Chromosom charakterisieren zu können. Daher wurde die Zentromerregion von Chromosom 7 kartiert. Die Kartierung der Zentromerregion dient zusätzlich dem Auffinden möglichst zentromernaher Sequenzen, die dazu benutzt werden können, ein Chromosom möglichst gezielt auf seine minimalen Bestandteile zu reduzieren.

## 4. 1 STS-Gehalt-Kartierung der Zentromerregion von Chromosom 7 des Menschen

Aufgrund der gewählten Vorgehensweise dieser Arbeit durch gezielte Verkürzung eines 7p-Chromosoms ein Minichromosom zu generieren, ist vor allem die Lage von Markern in der Nähe und zwischen den beiden bekannten  $\alpha$ -Satelliten D7Z1 und D7Z2 im Zentromer von Chromosom 7 von Interesse, da diese zur Analyse von Zellklonen, die ein potentielles Minichromosom enthalten, hilfreich sind.

Die STS-Gehalt-Kartierung wurde unter Zuhilfenahme von zuvor auf die Zentromerregion lokalisierten YACs, BACs und bereits bekannten STS-Markern aus dieser Region vorgenommen. Dabei ergab sich die in Abschnitt 3. 1, Abbildung 12 dargestellte Reihenfolge der genomischen Klone und STS-Marker. Der überwiegende Teil der hier verwendeten STS-Marker sind polymorphe Mikrosatellitenmarker. Die eingesetzten Oligonukleotidprimerpaare umspannen dabei eine kurze, tandemartige (AC)<sub>n</sub>-Sequenzwiederholung (Dib et al., 1996).

Vergleicht man die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten STS-Kartierung mit den Ergebnissen der publizierten genetischen Kartierung, so ergeben sich teilweise Gemeinsamkeiten in der Abfolge der STS-Marker. Dabei wurden nicht alle Primerpaare in beiden Arbeiten verwendet. Die Loci D7S499 und D7S494 sind bei beiden Karten in der gleichen Reihenfolge angeordnet (Tabelle 21).

Locus-symbol	genetischer Abstand (cM)			Markername
	unab.	weibl.	männl.	
D7S499	0,8	1,6	0,0	AFM191xh6
D7S494	0,0	0,0	0,0	AFM165zf4
D7S2429	1,2	1,9	0,0	AFMa153tf5
D7S2530	0,0	0,0	0,0	AFM329zb5
D7S520	0,0	0,0	0,0	AFM240ve9
D7S2512	0,0	0,0	0,0	AFMc002zb1
D7S2549	0,7	1,6	0,0	AFMa055xg9
D7S482	0,0	0,0	0,0	AFM070yc1
D7S2503	0,0	0,0	0,0	AFMb346vf9
D7S502	0,0	0,0	0,0	AFM199vh8

**Tabelle 21: Genetischer Abstand von STS-Markern in der Zentromerregion von Chromosom 7**  
Der genetische Abstand ist geschlechtsunabhängig und nach Geschlechtern getrennt in centiMorgan zum in der Tabelle folgenden Marker angegeben (Dib et al., 1996).

Der Locus D7S494 liegt zusammen mit dem Locus D7S473 auf einer Reihe von Mega-YACs, somit sind diese beiden Loci physikalisch eng benachbart. Die drei Loci D7S520, D7S2512 und D7S2549, die einen genetischen Abstand von 0,0 cM haben, bilden zusammen mit D7S2793, dem Locus für das Gen  $\beta$ -Glucuronidase, ein zusammenhängendes YAC-*contig*. Ein YAC-*contig* bilden auch die drei Loci D7S482, D7S502 und D7S2503, die ebenfalls keinen genetischen Abstand zueinander haben. Die beiden *contigs*, mit einem genetischen Abstand von 0,7 cM konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht miteinander verbunden werden.

Die Abfolge der STS-Marker ist nicht in allen Fällen zwischen der publizierten genetischen Karte und der hier durchgeführten STS-Gehalt-Kartierung in Übereinstimmung zu bringen. So ergab sich für den Locus D7S2429 bei der STS-Kartierung keine physikalische Kopplung zu einem anderen Locus. In der genetischen Karte (Dib et al., 1996) hat er einen Abstand von 0,0 cM zu dem Marker D7S494. Nach Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe (Kersting, 1997) ergeben die Primer für den Locus D7S494 mit DNA des Zellhybriden RR14, der den kurzen Arm des humanen Chromosom 7 als Derivatvchromosom enthält, ein PCR-Produkt. Die Primer für den Locus D7S2429 hingegen amplifizieren zusammen mit DNA des Zellhybriden RR6 (7q) ein DNA-Fragment. Diese beiden Loci liegen somit wahrscheinlich auf unterschiedlichen Chromosomenarmen. Das würde bedeuten, daß beide Loci durch die beiden  $\alpha$ -Satelliten D7Z1 und D7Z2 voneinander getrennt liegen. Nach den Arbeiten von Wevrick und Willard (1989, 1991), die eine physikalische Kartierung der Region um die beiden  $\alpha$ -Satelliten durchgeführt haben, ergäbe dies einen physikalischen Abstand von mindestens 2-3 Mb. Dies würde auf das gesamte Genom gesehen einer durchschnittlichen genetischen Distanz von etwa 2-3 cM entsprechen.

Die Lage des Markers D7S494 ist für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung. Denn durch die Lokalisation auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 in der Nähe des Zentromers und telomerwärts von D7Z2 eignet er sich zur Analyse eines eventuell entstandenen Minichromosoms, welches in D7Z2 gebrochen ist. In einem solchen Fragment sollte er nicht mehr vorhanden sein.

Auch die Betrachtung und Miteinbeziehung anderer Arbeiten bringt keine Klärung der Lageverhältnisse der zentromerischen Marker zueinander. So überspannt das YAC-*contig* F (sWSS3) (Bouffard et al., 1997) nach Angaben der Autoren das Zentromer von Chromosom 7. In diesem *contig* liegen die drei Loci D7S2549, D7S520 und D7S2512 relativ dicht beieinander. Darauf folgend liegen die Loci D7S494, D7S2429 und mit einem etwas größeren Abstand (mind. 2-3 YAC-Längen) D7S2530 in Richtung 7pter. Dieser Locus hat bei der genetischen

Kartierung allerdings einen Abstand von 0,0 cM zu D7S520 und zwischen D7S2429 und D7S520 liegt ein Abstand von 1,2 cM (Dib et al., 1996), so daß sich auch in der Arbeit von Bouffard et al. (1997) durch STS-Kartierung die Lage der Marker zueinander und ihre Abstände nicht widerspruchsfrei zu vorangegangenen Arbeiten festlegen lassen.

Neben der Reihenfolge der STS-Marker hat die Lage der beiden großen  $\alpha$ -Satelliten im Zentromer von Chromosom 7 zueinander und zu benachbarten STS-Markern für diese Arbeit eine besondere Bedeutung. Eine Verbindung der beiden  $\alpha$ -Satelliten D7Z1 und D7Z2 zu den umliegenden Sequenzen konnte durch die hier durchgeführte STS-Kartierung jedoch nicht hergestellt werden. Daher konnte die Region zwischen diesen beiden Markern nicht näher untersucht werden und war somit unbekannt. Für die Analyse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit selektierten Zellklone, die ein Minichromosom enthalten sollten, mußte daher der  $\alpha$ -Satellit D7Z1 durch Southernblot hybridisierung nachgewiesen werden (Abbildung 29).

Auf den beiden YACs HSCE1090 und HSCE1092, die zur Kartierung in dieser Arbeit verwendet wurden, ließ sich zusätzlich zu D7Z2 eine weitere  $\alpha$ -Satellitensequenz identifizieren. Diese Sequenz, die eine unregelmäßige, gegenläufige Anordnung in ihren Monomeren hat (Wesvrick et al., 1992), war bereits bekannt, jedoch nur grob in die Nähe einer der beiden großen  $\alpha$ -Satelliten vorlokalisiert. Der Befund, daß eine weitere  $\alpha$ -Satellitensequenz bei D7Z2 lokalisiert ist, ist in Übereinstimmung mit den Arbeiten von de la Puente et al. (1998), die ebenfalls beide alphanoiden Sequenzen auf diesen YACs identifizieren konnten. Auch die Orientierung in Richtung 7pter von D7Z2 wird in der Arbeit von de la Puente et al. (1998) bestätigt.

Der D7Z2 und die weitere  $\alpha$ -Satellitensequenz enthaltende YAC HSCE1090 überlappt mit den beiden YACs HSCE303 und 311-H-5, auf denen sich zwei weitere relativ kurze  $\alpha$ -Satellitenblöcke befinden (de la Puente et al., 1998). Die beiden Blöcke, die Z5 und Z6 genannt werden, gehören zur suprachromosomalen Familie 4 (M-Typ). Zusätzlich befindet sich in Richtung 7pter auf beiden YACs der Locus D7S1480 (Velasco et al., 1994). In Richtung 7qter haben die Autoren über den YAC HSCE1073 und zwei weitere YACs (714-A-12 und 944-E-3) einen Anschluß von D7Z1 an den Locus D7S494 postuliert. Nach PCR-Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegt dieser Marker allerdings auf dem Zellhybriden RR14, also sehr wahrscheinlich auf dem kurzen Arm von Chromosom 7. Dies ist die Position, die schon 1994 für diesen Locus ermittelt wurde (Green et al., 1994).

### 4.1.1 Probleme bei der Kartierung im und in der Nähe des Zentromers

Generelle Probleme bei der Kartierung von genomischen Sequenzabschnitten, insbesondere von Sequenzabschnitten im Zentromer, führen häufig zu widersprüchlichen Angaben über die Lage und den Abstand unterschiedlicher Marker. So sind auch die Ergebnisse der Kartierung der Zentromerregion von Chromosom 7 verschiedener Arbeitsgruppen und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in einigen Bereichen divergent.

Ein Problem ist dabei die unterschiedliche Abstandsangabe. Während bei physikalischen Kartierungen der Abstand zwischen zwei Markern durch eine feste Größe (Basenpaare) angegeben werden kann, ist die Abstandsangabe bei der genetischen Kartierung eine statistische Größe, die die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, daß zwei Marker bei der Meiose durch ein *crossing over*-Ereignis voneinander getrennt werden. Dabei wird davon ausgegangen, daß die Wahrscheinlichkeit, daß zwei Marker gekoppelt vererbt werden, mit ihrem physikalischen Abstand zueinander abnimmt. Da aber die Wahrscheinlichkeit eines *crossing overs* nicht an jeder beliebigen Stelle im Genom gleich ist, entspricht der genetische Abstand, angegeben in centi-Morgan (cM), nicht überall der gleichen physikalischen Strecke.

Die erheblich geringere Rekombinationsfrequenz in der Zentromerregion verglichen mit anderen Regionen ist beispielsweise ein großes Problem bei der genetischen Kartierung. Ein cM entspricht in der Zentromerregion des X-Chromosoms etwa einer physikalischen Distanz von 3600 kb (Mahtani und Willard, 1998). Über das ganze X-Chromosom betrachtet entspricht hingegen 1cM nur etwa 800 kb (Dib et al., 1996; Nagaraja et al., 1997). Das bedeutet, daß in der Zentromerregion des X-Chromosoms die Rekombinationshäufigkeit statistisch 4,5 mal geringer ist als über das gesamte Chromosom verteilt gesehen. Der physikalische Abstand zwischen zwei STS-Markern, bei denen eine genetische Distanz festgestellt werden konnte, ist dabei im Zentromerbereich ca. 4,5 mal so groß wie der durchschnittliche Abstand anderer Marker mit dem gleichen genetischen Abstand auf dem X-Chromosom. Die zur physikalischen Kartierung verwendeten STS-Marker, hauptsächlich Mikrosatellitenmarker, die zuvor schon zur genetischen Kartierung verwendet wurden, liegen daher erheblich weiter auseinander als die Distanzen auf der genetischen Karte vermuten lassen. So konnten für STS-Marker, die einen genetischen Abstand von 0,0 cM hatten, meist auch YACs gefunden werden, die mehrere dieser Marker trugen. Wurde jedoch eine meßbare genetische Distanz zwischen zwei Markern beschrieben (Dib et al., 1996), ließ sich kein YAC finden, der diese beiden Marker trägt. In diesen Lücken im YAC-*contig* war die Dichte der STS-Marker zu gering, um einen YAC, der mehrere

Marker enthält, zu finden. Es ist auch möglich, daß bei den vermutlich sehr großen Abständen zwischen den STS-Markern ein YAC nicht groß genug ist, mehrere Marker zu tragen.

YAC-Vektoren sind die Vektoren, die zur Zeit die größte Menge an "fremd"-DNA aufnehmen können. Bei der Verwendung von YACs zur physikalischen Kartierung ergeben sich aber auch eine ganze Reihe von Problemen. Zwischen 40-60% der YACs aus gesamtgenomischen Bibliotheken chimäre, bzw. rearrangierte Klone (Green et al., 1991) sind. YAC-Bibliotheken aus Chromosomen-spezifischen Zellhybriden enthalten immerhin noch etwa 10-20% chimäre, bzw. rearrangierte Klone (Wada et al., 1990). Das hat zur Folge, daß solche YACs nicht zwingend notwendig genomische Sequenzen in der im Genom vorliegenden Abfolge enthalten. Die Erstellung von Klon-*contigs* ist hierdurch deutlich erschwert, da, wenn die Rearrangements in überlappenden Sequenzen zu anderen YACs auftreten, falsche *contigs* zusammengefaßt werden können. Der Beweis, daß ein *contig* die genomische Sequenz eines Chromosomenabschnittes vollständig und ohne Sequenzen anderer chromosomaler Teilstücke wiedergibt, kann nur durch mehrere unabhängig klonierte, überlappende YACs erbracht werden.

Als mögliche Ursache für die Entstehung von Chimären wird sowohl die Coligation zweier Insertfragmente sowie die homologe Rekombination zwischen repetitiven Sequenzanteilen verschiedener YACs in der Hefe angenommen (Larionov et al., 1994). Die homologe Rekombination zwischen repetitiven Sequenzanteilen könnte auch dafür verantwortlich sein, daß in dem *RAD52* positiven Hefestamm AB1380, der für fast alle YAC-Banken verwendet wurde, YACs mit  $\alpha$ -Satellitenanteilen sehr häufig rearrangiert sind (Neil et al., 1990). Würde bei der Herstellung dieser YAC-Banken ein *RAD52* negativer Hefestamm verwendet, wären die YACs mit  $\alpha$ -Satellitenanteilen erheblich stabiler (Ikeno et al., 1998).

Diese Eigenschaften von YACs erschweren die physikalische Kartierung, besonders von Regionen mit hohem Repeatanteil. Als Beispiel dafür kann der YAC 884-E-9 in der Abbildung 12 genommen werden. Innerhalb des kleinen YAC-*contigs*, das diesen YAC enthält, war es nicht möglich, die STS-Marker und die YACs widerspruchsfrei in einer fortlaufenden Abfolge anzuordnen. Das heißt, daß ein oder mehrere Marker nicht auf diesem YAC nachgewiesen werden konnten, obwohl flankierende Marker Hinweise auf das Vorhandensein dieser Fragmente gaben. Die Annahme, daß dem YAC 884-E-9 ein Teil der genomischen Sequenz aufgrund eines Rekombinationsereignisses verloren gegangen ist, führt zu der in Abbildung 12 angegebenen Reihenfolge der STS-Marker. Diese Anordnung ergibt sich aus PCR-Ergebnissen mit den STS-Markern D7S520 bis D7S2793, die die geringsten Unstimmigkeiten aufwiesen. Oft findet man in der Region in und um das Zentromer viel mehr unstimme als stimmige Versuchsergebnisse

(Hudson et al., 1995; Bouffard et al., 1997), weshalb die Interpretation solcher Daten nur unter Vorbehalt geschehen darf.

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten, der relativ aufwendigen Präparation reiner YAC-DNA und der Notwendigkeit der Subklonierung der YACs zur Sequenzierung ist man bei der Erstellung der Gesamtsequenz von Genomen im Laufe der Jahre dazu übergegangen, andere Vektorsysteme wie BACs und PACs zur Vermehrung und Analyse der genomischen Sequenzabschnitte zu verwenden (Dunham et al., 1999; Hattori et al., 2000; Hoskins et al., 2000; Myers et al., 2000), da Rekombinationsereignisse in solchen Vektoren deutlich seltener vorkommen.

#### 4.1.2 Das *HSP27*-Gen

Bei der Erstellung der STS-Zentromerregion-Karte wurden nicht nur YACs benutzt, sondern auch mit Hilfe von BACs versucht, Sequenzabschnitte einander zuzuordnen. Einer der dabei verwendeten ist der BAC 7c23, der zytogenetisch in die Nähe des Zentromers von Chromosom 7 lokalisiert worden war (Prof. Dr. J.R. Korenberg, pers. Mitteilung).

Durch Sequenzierung der Endfragmente dieses BACs konnte die genomische Sequenz des humanen Hitzeschockproteins *HSP27* nachgewiesen werden. Der Sequenzvergleich des SP6-Endes des Klonen ergab eine 97,1%ige Übereinstimmung mit der genomischen Sequenz des Genes (Anhang 8. 1). Die Sequenzierung wurde nur einmal durchgeführt, wobei nicht alle Basen eindeutig identifiziert werden konnten. Dies erklärt die nicht 100%ige Übereinstimmung mit der Sequenz des *HSP27*-Gens. Weitergehende Untersuchungen zeigten, daß die publizierte genomische Sequenz (Hickey et al., 1986a) in der Region 7q11.1-11.2 zwischen den Loci *D7S489* und *D7S669* (Abschnitt 3. 2) liegt.

*Hsp27* gehört zur Familie der kleinen Hitzeschock-Proteine (*heat shock protein: hsp*). Ihre Synthese wird durch subletale Hitzeschocks und andere Umwelteinflüsse, wie Schwermetalle oder oxydierende Agenzien, angeregt. *Hsp27* (Molekulargewicht: 27 kD) wird sowohl in normalen als auch in Tumorzellen exprimiert. Es spielt eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen wie Thermotoleranz, Actinpolymerisation, Wachstum, Resistenz gegen Chemotherapeutika und Apoptoseschutz. Das Protein konnte in verschiedenen Geweben wie Mamma, Uterus, Cervix, Plazenta, Haut und Thrombozyten nachgewiesen werden (Ciocca et al., 1993).

#### 4.1.2.1 Die chromosomale Lokalisation von *HSP27*

Zwei genomische Sequenzen von *HSP27* (EMBL: L39370; X03900) konnten von Hickey et al. (1986a) aufgeklärt werden. Die Sequenzen wurden in zwei Klonen des Phagen  $\lambda$  nachgewiesen (Hickey et al., 1986a), die durch Hybridisierung mit dem c-DNA Klon pH208 (Hickey et al., 1986b) in einer Genbank gefunden wurden. Der Klon 2711 enthält die genomische Sequenz des Gens, während in Klon 2708 ein Pseudogen von *HSP27* enthalten ist.

Durch den Sequenzvergleich und die PCR-Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielt wurden, konnte die Lokalisation der Sequenz, die dem Phagenklon 2711 entspricht, auf Chromosom 7 eindeutig geklärt werden. Im Rahmen des Humanen Genom Projektes wurde zwischenzeitlich ein weiterer BAC-Klon sequenziert (363M4; GenBank: 4753219), der die gesamte genomische Sequenz des Gens enthält, die zuerst in dem Phagenklon 2711 gefunden wurde (Koslowicz et al., 1999). Dieser Klon liegt in der chromosomalen Region 7q11.2-q22. Die Lokalisation des BAC-Klons 363M4 stimmt mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten chromosomalen Lage des *HSP27*-Gens überein.



## 4. 2 Verkürzung von Chromosomen in der Zelllinie Ru Rag 14-4-7-44-7 (RR14)

Die Idee, ein humanes Minichromosom zu erzeugen, kann auf unterschiedlichen Wegen verfolgt werden. Es war bereits bekannt, daß sich Chromosomen durch Transfektion von Telomerrepeats brechen lassen (Farr et al, 1991), was als Grundlage einer Verkürzungsstrategie genutzt werden kann.

Die Existenz natürlich vorkommender humaner Derivatvchromosomen, die bereits einen Chromosomenarm verloren haben, reduziert den Aufwand zur Etablierung eines Minichromosoms deutlich, da nur noch ein Chromosomenarm gebrochen werden muß. Ein solches Derivatvchromosom liegt in der Mensch-Maus Hybridzelllinie RR14 vor. Es handelt sich um das auf den kurzen Arm 7p reduzierte humane Chromosom 7.

Die gezielte, weitere Verkürzung des bereits existierenden Chromosoms 7p erfordert die Konstruktion von Vektoren, die Elemente enthalten, die künstliche Chromosomenbrüche induzieren können. Als notwendige Elemente werden ein Telomer zur Verkürzung, ein der genomischen Sequenz homologer Bereich zur Rekombination sowie Selektionsmarker benötigt.

### 4.2.1 Einfügen neuer Telomere in Chromosomen der Zelllinie RR14

Da Telomere in der Lage sind, Chromosomen zu brechen, sollte in der Zelllinie RR14 (Vorkamp et al., 1991) das vorhandene menschliche Derivatvchromosom 7p durch Telomer-verursachte Chromosomenfragmentierung (Farr et al., 1991) verkürzt werden. Dazu wurden Vektoren konstruiert, die u.a. einen 800 bp langen humanen Telomerrepeat enthalten (Abschnitt 3.3.2). Die Effizienz, mit der neue Telomere gebildet werden, ist weitgehend unabhängig von der Länge des eingefügten Telomerrepeats. So konnte gezeigt werden, daß bereits ein 800 bp langer humaner Repeat Chromosomen genauso wirksam bricht wie 1,6 kb und 3,2 kb lange (Hanish et al., 1994). Telomerrepeats mit anderen Sequenzen als die der Säugetiere sind allerdings nicht in der Lage, neue Telomere zu induzieren (Hanish et al., 1994) und daher für Chromosomenfragmentierungen in Säugerzellen nicht geeignet. Der Mechanismus, der zur Fragmentierung der Chromosomen führt, ist noch nicht geklärt. Möglicherweise konkurrieren telomerbindende Faktoren wie TRF1, TRF2 (Zhong et al., 1992; Chong et al., 1995; Bilaud et al., 1997, Griffith et al., 1999) oder der Telomerasekomplex selbst mit Reparaturenzymen der Zelle, die bei einer Rekombination beteiligt sind, um die DNA-Bindung an den Repeatsequenzen und verhindern so das Zusammenfügen der beiden DNA-Enden. Das entstandene terminale

Chromosomenfragment enthält nur ein Telomer und kein aktives Zentromer. Es kann somit bei der Zellteilung nicht mehr stabil auf die Tochterzellen weitergegeben werden.

In der in dieser Arbeit verwendeten Hybridzelllinie RR14 (Vortkamp et al., 1991) sowie der murinen Ausgangszelllinie Rag wurden zuvor noch keine Experimente zur Verkürzung von Chromosomen durch transfizierte Telomer-DNA durchgeführt. Die erste Zelllinie, in denen neue Telomere in endogene Chromosomen durch Transfektion von Telomer-DNA eingeführt wurden (Farr et al., 1991), war der Mensch/Hamster Hybride 2D (Goss und Harris, 1977). Als parentale Ausgangszelllinie diente Wg3H des chinesischen Hamsters. Auch in anderen immortalisierten Zelllinien wie HeLa, EC27C4, EFC, HT1080 und DT40 konnten Chromosomen durch Telomere gebrochen werden (Itzhaki et al., 1992; Barnett et al., 1993; Hanish et al., 1994; Heller et al., 1996; Mills et al., 1999). In primären menschlichen Fibroblasten und der Mauszelllinie 10T1/2 scheint es hingegen nicht möglich oder zumindest wesentlich ineffektiver zu sein, mit Hilfe von Telomersequenzen Chromosomen zu fragmentieren (Barnett et al., 1993). Eine mögliche Ursache dafür könnte das Fehlen des Enzyms Telomerase in der primären Fibroblastenzelllinie sein (Counter et al., 1992). Nicht-transformierte, differenzierte Zelllinien eignen sich daher nicht für Experimente, bei denen Chromosomen durch transfizierte Telomere gebrochen werden sollen (Barnett et al., 1993).

Die verwendete Mensch/Maus Zelllinie RuRag 14-4-7-44-7 ist aus der Verschmelzung der immortalisierten Tumorzelllinie Rag der Maus (Klebe et al., 1970) mit menschlichen Fibroblastenzellen entstanden. Sie ist daher der von Farr et al. (1991) verwendeten Zelllinie sehr ähnlich. Zunächst war es jedoch notwendig zu zeigen, daß es in der Hybridzelllinie RR14 prinzipiell möglich ist, mittels Telomer-verursachter Chromosomenfragmentierung Chromosomen zu manipulieren (Abschnitt 3.3.3). Dies wurde anhand der Transfektion mit dem Vektor pPNTel getestet. In der anschließenden Analyse der transfizierten Zellen mittels FISH (Abbildung 28) konnte gezeigt werden, daß das transfizierte Telomerkonstrukt sich terminal an endogenen Mauschromosomen der Zelllinie befand. Diese Beobachtung deutet auf eine Integration des transfizierten Vektors hin. Die bevorzugte Lage der Vektoren am Ende der Chromosomen (Abbildung 28) läßt vermuten, daß diese an der Integrationsstelle gebrochen sind. Dies ist eine Grundvoraussetzung für die gezielte Verkürzung des Derivatvchromosoms in der verwendeten Zelllinie.

## 4.2.2 Die gerichtete Verkürzung des menschlichen Derivatichromosoms 7p

Ein ideales Minichromosom, welches als Vektor verwendet werden könnte, müßte nur aus strukturell wichtigen Sequenzanteilen eines Chromosoms bestehen und sollte keine Gene des Ursprungschromosoms enthalten. Je kleiner ein solches Minichromosom ist, desto wahrscheinlicher ist es, daß es nur wenige oder gar keine zusätzlichen Gene enthält. Durch eine gezielte Verkürzung des Chromosoms 7p im Zentromer könnte versucht werden, ein Minichromosom zu erzeugen, welches nur noch aus Bereichen des Zentromers und den beiden Telomeren, dem schon vorhandenen und dem neu eingefügten bestehen würde. Durch eine gezielte homologe Rekombination des im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektors in das Zentromer des menschlichen Derivatichromosoms der Zelllinie RR14 sollte es ermöglicht werden, dieses im Zentromer ein zweites mal zu brechen.

Bei der Analyse der selektierten Zellklone, wurde jedoch kein derartiges Minichromosom gefunden. Das kann zwei Gründe haben. Erstens, es hat keine homologe Rekombination des Vektors im Zentromer des Ausgangschromosoms stattgefunden. Zweitens, es ist ein Chromosomenfragment entstanden, welches nicht mitotisch stabil war und daher verloren ging. Im folgenden sollen die möglichen Gründe für dieses Ergebnis unter Berücksichtigung der Konstruktionsstrategie des verwendeten Vektors pPNTelD7Z2 diskutiert werden.

### 4.2.2.1 Verwendung von Zentromerabschnitten für die homologe Rekombination

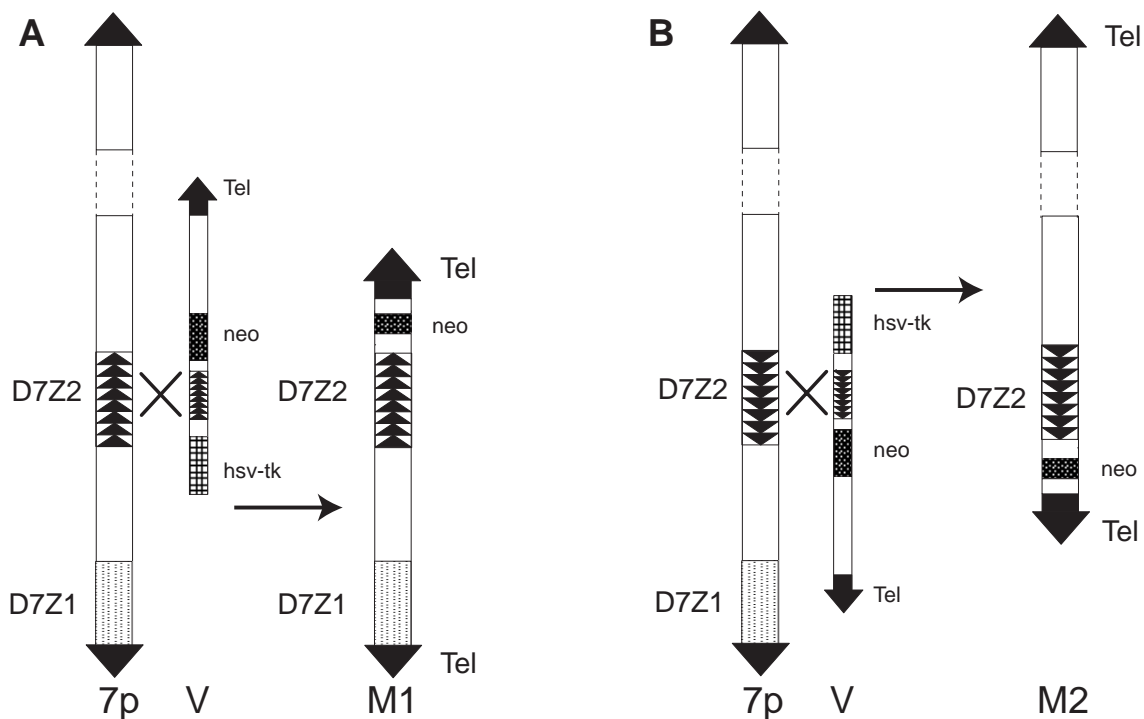
Das Prinzip der homologen Rekombination wird meist dazu verwendet, Gene eines Organismus gezielt in embryonalen Stammzellen auszuschalten und sogenannte “*knock out*”-Mutanten herzustellen. Dabei wird ein linearisierter Vektor, der zur genomischen Sequenz des Gens homologe Bereiche enthält, in die Zelle eingeführt. Die im Vektor enthaltene Sequenz sollte sich an den homologen genomischen DNA-Abschnitt anlagern, so daß ein Austausch des chromosomalen Abschnittes stattfinden kann. Der Vektor sollte mehrere Kilobasen an homologen Bereichen enthalten, die rekombinieren können.

Damit ein Gen durch homologe Rekombination ausgeschaltet werden kann, muß die in die Zelle eingeführte DNA einen Abschnitt des Gens in veränderter Form beinhalten. Durch den transfizierten Vektor werden in das Gen entweder zusätzliche Sequenzen eingefügt, ein oder mehrere Stopcodons generiert oder ein Stück des kodierenden Bereichs des Gens entfernt (Ausubel et al., 1987).

Für die gezielte, homologe Rekombination zur Erzeugung des Minichromosoms, welches im wesentlichen aus Zentromersequenzen von Chromosom 7 bestehen soll, wurde ein kurzer Teil des  $\alpha$ -Satelliten D7Z2 ausgewählt (Abschnitt 1.5.2). D7Z2 hat eine Größe zwischen 100 kb und 550 kb und liegt weniger als 1 Mb von D7Z1 entfernt (Wevrick und Willard, 1991), in dem das Derivatvchromosom schon einmal gebrochen ist (Hansen, 1975; Abschnitt 2.1.8.2). Der  $\alpha$ -Satellit D7Z2 liegt vom  $\alpha$ -Satelliten D7Z1 aus in Richtung 7pter (Wevrick und Willard, 1991; Abbildung 12) und ist daher im Derivatvchromosom des Zellhybriden RR14 enthalten (Abbildung 11). In der Zelllinie 4AF2/3/KO15 liegen beide  $\alpha$ -Satelliten auf einem 3,3 Mb großen Restriktionsfragment (Wevrick et al., 1992). Würde das Derivatvchromosom im Bereich D7Z2 durch den Vektor gebrochen, entstünde bei ähnlichen Größenverhältnissen in der Zelllinie RR14 ein Minichromosom, welches kleiner als 3,3 Mb groß wäre. Da allerdings weder die Größe von D7Z1 noch der Abstand von D7Z1 zu D7Z2 in dieser Zelllinie bekannt ist, könnte das Minichromosom auch erheblich kleiner als 3,3 Mb sein.

Um eine größtmögliche Basenübereinstimmung des homologen Abschnittes aus D7Z2 zu gewährleisten, wurde er aus DNA der Zelllinie RR14 kloniert. Dieser 2,7 kb große HOR (Abschnitt 1.5.1.2) entspricht dem des Plasmids pMGB7 (Waye et al., 1987), der aus einem Phagen subkloniert wurde. Damit aus dem Bereich D7Z2 ein größeres als das 2,7 kb Fragment zur Verfügung steht, wurde das Insert aus dem Vektor herausgeschnitten und als Dimer zurückligiert. Im Zuge der Klonierungsexperimente entstanden auch Plasmide mit monomeren  $\alpha$ -Satelliteninserts. Daher standen vier unterschiedliche Plasmide mit Inserts der Größen 2,7 kb und 5,4 kb in unterschiedlicher Orientierung zu den Schnittstellen des Vektors pBluescriptIISK(+) als homologe Sequenzbereiche zur Verfügung (Abschnitt 3.3.2.5).

Innerhalb eines HOR besteht eine Sequenzhomologie von mehr als 99% (Durfy und Willard, 1989) und die einzelnen Monomere sind in unidirektionaler Orientierung zueinander in größere DNA-Abschnitte organisiert (Lee et al., 1997). Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß auch die konstruierten dimeren Inserts im Vektor einen entsprechenden homologen Sequenzabschnitt im Chromosom haben und sich in Größe und Sequenz nicht oder nur geringfügig unterscheiden. Dies ist für eine homologe Rekombination notwendig. Die Orientierung der  $\alpha$ -Satellitenabschnitte D7Z1 und D7Z2 zu umliegenden Sequenzabschnitten des Chromosoms 7 ist bisher nicht geklärt. Daher war es sinnvoll D7Z2-Sequenzen in beiden möglichen Orientierungen in den Fragmentierungsvektor einzufügen.



**Abbildung 33: Die Integration des Vektors pPNTelD7Z2 kann zu zwei unterschiedlichen Derivatvchromosomen führen**

Je nach Orientierung des  $\alpha$ -Satelliten D7Z2 im Derivatvchromosom 7p kann der Vektor pPNTelD7Z2 (V) das Chromosom so brechen, daß **A** ein Minichromosom aus Sequenzen des Zentromers von Chromosom 7 (M1) oder **B** ein Derivatvchromosom 7p ohne D7Z1-Anteile (M2) entsteht.

Zur Transfektion der Zelllinie RR14 konnte aus Zeitgründen nur einer der 4 klonierten Vektoren verwendet werden. Da die Orientierung der  $\alpha$ -Satellitensequenz D7Z2 im Chromosom nicht bekannt ist, könnte bei einer Fragmentierung des Derivatvchromosoms in D7Z2 auch ein Chromosom entstehen, welches nur aus Sequenzen des kurzen Arms von Chromosom 7 und Teilen des  $\alpha$ -Satelliten D7Z2 besteht und keinen D7Z1-Anteil mehr enthält (Abbildung 33B). Cremer et al. beschreiben ein Derivatvchromosom 7p in der Glioblastom-Zelllinie TC 593, welches bei einer FISH-Untersuchung keine erkennbaren Signale mit der D7Z1 spezifischen Probe  $\alpha 7t1$  ergab (Cremer et al., 1988). Das würde dafür sprechen, daß D7Z1 zur Bildung eines funktionsfähigen Zentromers nicht unbedingt erforderlich ist.

Ob D7Z2 als  $\alpha$ -Satellitenanteil zur Bildung eines aktives Zentromers ausreicht, ist nicht sicher. Denn Untersuchungen an gestreckten Chromosomen mit CREST-Antisera, die an CENPs binden, ergaben keine erkennbaren Immunfluoreszenzsignale im Bereich D7Z2 von normalen menschlichen Chromosomen (Haaf und Ward, 1994). Das wiederum spricht gegen eine Beteiligung von D7Z2 am aktiven Teil des Zentromers des Chromosoms. Das Fehlen von CENPs im Bereich von D7Z2 könnte damit zusammenhängen, daß dieser Bereich nicht mehr aktiv ist. In

dizentrischen Chromosomen ist häufig ein partieller oder kompletter Verlust der CENPs-Bindung und damit der Zentromeraktivität zu beobachten (Earnshaw et al., 1989; Peretti et al., 1986).

Das Fehlen der Fluoreszenzsignale könnte aber auch damit erklärt werden, daß die D7Z2-Sequenz, die erheblich kürzer als D7Z1 ist, zusätzlich viel weniger CENP-B *boxes* enthält. Die geringere Bindung von CREST-Antikörpern kann daher auch auf eine viel geringere Bindung von CENP-B, dem häufigsten der Zentromerproteine, zurückzuführen sein (Cooke et al., 1990). Jedoch gibt die Bindung von CENP-B alleine keinen Aufschluß über die Zentromeraktivität, da beispielsweise das menschliche Y-Chromosom kein CENP-B bindet (Pluta et al., 1995) und CENP-B-*knock out*-Mäuse keinen erkennbaren Phänotyp zeigen (Hudson et al., 1998; Perez-Castro et al., 1998; Kapoor et al., 1998).

Bei den Analysen der Zellklone im Rahmen dieser Arbeit ist kein Derivatvchromosom 7p entdeckt worden, welches nur aus Sequenzen des kurzen Arms ohne D7Z1-Anteilen besteht. Da bisher nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, daß D7Z2 als  $\alpha$ -Satellit ausreicht, um ein aktives Zentromer zu bilden, ist es möglich, daß ein derartiges Derivatvchromosom nicht stabil an die nächste Zellgeneration weitergegeben würde.

Würde der Vektor in der umgekehrten Orientierung, wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, in D7Z2 integrieren, entstünde ein relativ kleines Derivatvchromosom (Abbildung 33A). Die genaue Größe des verbliebenen Stücks D7Z1 im Chromosom 7p der Zelllinie RR14 ist nicht bekannt. In einer anderen Zelllinie (4AF2/3/KO15), die ein nicht gebrochenes Chromosom 7 enthält, liegen beide  $\alpha$ -Satelliten auf einem 3,3 Mb großen Restriktionsfragment (Wevrick et al., 1992). Daher ist ein entstandenes Minichromosom in RR14 wahrscheinlich  $<3,3$  Mb und kann sogar kleiner als das bisher kleinste publizierte, künstlich erzeugte, lineare Minichromosom von 2,4 Mb (Mills et al., 1999) sein. Über die Stabilität eines solchen Chromosoms in der Mauszelllinie Rag, die als Akzeptorzelllinie bei der Erzeugung der Zelllinie RuRag 14-4-7-44-7 verwendet wurde, ist nichts bekannt. Die durch die Transfektion von  $\alpha$ -Satelliten und Telomer-DNA, bzw. YACs entstandenen MACs (Harrington et al., 1997; Ikeno et al., 1998; Henning et al., 1999) waren größer als 2,4 Mb und somit erheblich größer als die transfizierte Ausgangs-DNA. Dies deutet auf eine mögliche Größenselektion linearer Chromosomen in Säugerzellen hin (Harrington et al., 1997b, Ikeno et al., 1998). Es ist denkbar, daß ein durch die Verkürzung in D7Z2 entstandenes Minichromosom, unabhängig von der Orientierung, in der es gebrochen wurde, nicht mitotisch stabil ist und daher nicht nachgewiesen werden konnte. Das würde bedeuten, daß es zur Erzeugung des Minichromosoms notwendig sein kann, das Chromosom 7p weiter telomerwärts zu brechen.

#### 4.2.2.2 Wahrscheinlichkeit einer Integration durch homologe Rekombination

Eine homologe Rekombination ist in Säugerzellen ein relativ seltenes Ereignis. Sie ist von vielen Faktoren abhängig und aufgrund fehlender Erfahrungen mit der verwendeten Zelllinie RR14 in ihrer Häufigkeit nicht vorhersagbar. Die meisten Erfahrungen mit homologer Rekombination wurden mit embryonalen Stammzelllinien der Maus gemacht, da die Erzeugung von transgenen Mäusen und “*knock out*”-Mutanten der Maus heute eine häufig angewendete Methode der molekularen Genetik ist, um die Funktion von Genen *in vivo* zu untersuchen (Capecchi, 1989). Prinzipiell ist eine homologe Rekombination auch in anderen somatischen Zelllinien wie beispielsweise LMtk<sup>-</sup> (Thomas et al., 1986), DT40 (Buerstedde und Takeda, 1991) oder CHO-Zellen (Brown et al., 1994) möglich. Die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination, bzw. das Verhältnis von homologer zu zufälliger Rekombination ist je nach Zelllinie sehr unterschiedlich.

Durch die Transfektion der Zellen mit dem Vektor pPNTelD7Z2(-) ließ sich das menschliche Derivatchromosom 7p der Zelllinie RR14 verkürzen. Die PCR-Analyse von 345 zuvor selektierten Einzelklonen ergab, daß in der DNA des Zellklons XXIII-B1 der telomernahe STS-Marker D7S531 (Dib et al., 1996) nicht mehr nachgewiesen werden konnte, obwohl die Southernblotanalyse das Vorhandensein des  $\alpha$ -Satelliten D7Z1 zeigte. Drei weitere STS-Marker, die sich in der Nähe des Zentromers auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 befinden, konnten jedoch in diesem Zellklon nachgewiesen werden. Die Befunde sind durch eine Deletion des terminalen Chromosomenanteils zu erklären und deuten darauf hin, daß der Vektor nicht durch homologe Rekombination in das Zentromer des Derivatchromosoms, sondern spontan in das menschliche Chromosom der Zelllinie aufgenommen worden ist und dies an der Integrationsstelle gebrochen hat.

Ähnliche Versuche wurden von Brown und Mitarbeitern (Brown et al., 1994) durchgeführt. Die Autoren versuchten, ein Telomerrepeat durch homologe Rekombination in das Zentromer des Y-Chromosom zu integrieren, um Derivatchromosomen des kurzen und des langen Armes künstlich zu erzeugen. Dazu wurden zwei Vektoren konstruiert, die neben dem Telomerrepeat und einem positiven Selektionsmarker (neo), jeweils 5,7 kb aus dem Bereich DYZ1 in entgegengesetzter Orientierung enthielten und in eine Mensch/Hamster Hybridzelllinie, die eine Kopie des menschlichen Y-Chromosoms enthielt, transfiziert. Um jeweils einen Klon zu identifizieren, der ein menschliches Y-Chromosom enthielt, das im Zentromer gebrochen war, mußten 45000 neo-resistente Klone für den langen und 25000 neo-resistente Klone für den kurzen Arm analysiert werden. Davon waren jeweils 12 unabhängig voneinander entstandene Klone

für den langen und 12 für den kurzen Arm. Von ihnen enthielt nur jeweils ein Klon ein Chromosom, welches direkt im Zentromer gebrochen war. Daher müssen sehr wahrscheinlich eine erheblich mehr als 345 selektionierte Zellklone untersucht werden, um einen Klon zu finden, der ein auf das Zentromer verkürztes Minichromosom enthält.

Es wäre hilfreich, die Wahrscheinlichkeit einer gezielten homologen Rekombination zu erhöhen. Dazu kann auf spezifische Selektionsstrategien zurückgegriffen werden (Abschnitt 4.2.2.3), alternativ könnten die Experimente auch in einer geeigneteren Zelllinie durchgeführt werden. In der Hühner-B-Zelllinie DT40 wurde beispielsweise eine erhöhte Rate an homologen gegenüber zufälligen Rekombinationsereignissen im Vergleich zu anderen Zelllinien beobachtet (Buerstedde und Takeda, 1991). Möglicherweise ist die Zelllinie DT40 für Transfektionen mit dem Fragmentierungsvektoren pPNTelD7Z2 besser geeignet als RR14. Zuvor müßte das Derivatvchromosoms 7p jedoch in die Zelllinie DT40 transferiert werden.

#### 4.2.2.3 Selektion zur Anreicherung von homologen Rekombinationsereignissen

Da eine homologe Rekombination in Säugerzellen, wie etwa embryonalen Stammzellen, ein sehr seltenes Ereignis ist, müssen Zellen, die die exogene DNA auf diese Art ins Genom aufgenommen haben, selektionierbar sein. Es hat sich als günstig erwiesen, zwei Selektionsmarker-gene, ein positives und ein negatives, in das Konstrukt einzubauen (Mansour et al., 1988), da auf diese Weise sowohl auf ein generelles Rekombinationsereignis wie auch auf eine spezifische homologe Rekombination selektioniert werden kann.

Als Ausgangsvektor zur Konstruktion des Plasmides pPNTel diene der Vektor pPNT (Tybulewicz et al., 1991). Dieser wurde entwickelt, um Gene in embryonalen Stammzellen der Maus auszuschalten. Mit Hilfe dieses Vektors gelang es, das *c-abl* Protoonkogen in ES Zellen zu zerstören und aus diesen Zellen einen Mausstamm zu züchten, in dem das Gen homozygot mutiert ist (Tybulewicz et al., 1991). Er enthält zwei in eukaryontischen Zellen selektionierbare Markergene, *neo* und *hsv-tk*, die eine Selektion von Zellen, in denen der Vektor durch homologe Rekombination in die Sequenz des Zielgens aufgenommen wurde, ermöglichen (Abschnitt 4.2.2.1).

Als positiver Marker diene hier ein Antibiotikaresistenzgen, das Neomycinresistenzgen (*neo*), das für das Enzym Aminoglycosid-Phosphotransferase kodiert. Dieses Gen macht die Zellen unempfindlich gegen das Antibiotikum Neomycin sowie dessen Analoga, wie etwa Geneticin (G418) (Mansour et al., 1988; Southern und Berg, 1982).

Der negative Selektionsmarker diene dazu, Zellen zu eliminieren, in denen der Vektor an



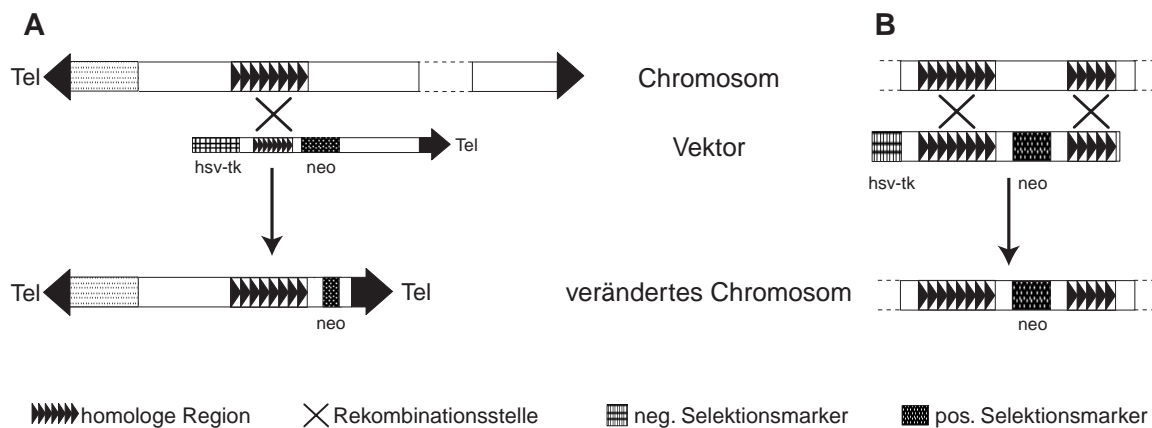
einer zufälligen, nicht homologen Stelle des Genoms integriert wurde. Es handelt sich dabei um ein Gen, dessen Produkt die Zellen empfindlich gegen ein dem Medium zugesetztes Substrat macht. Bei der Konstruktion von pPNTel wurde das Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-Gen (*hsvtk*) verwendet (Mansour et al., 1988; Littlefield, 1964). Zellen, die das *hsvtk*-Gen exprimieren, sind sensitiv gegen die Virostatika Acyclovir und Gancyclovir. Das negative Selektionsmarkergen wird randständig zu dem homologen Sequenzbereich in den Vektor eingefügt.

Zellen, in denen das Konstrukt durch homologe Rekombination aufgenommen wurde, können doppelt selektioniert werden. Wird der linearisierte Vektor ins Genom einer Zelle integriert, ist diese unempfindlich gegen das Antibiotikum Geneticin [G418]. Bei einer homologen Rekombination wird der randständig gelegene negative Selektionsmarker (*hsvtk*) nicht mit ins Genom integriert. Dadurch bleiben nur die Zellen, die den Vektor an der gewünschten Stelle ins Genom aufgenommen haben, unempfindlich gegenüber dem zugesetzten Substrat (Gancyclovir). Durch die Verwendung dieser positiv-negativ Selektionsstrategie kann die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination in ES-Zellen der Maus zur Erzeugung von "knock out"-Mutanten um den Faktor 2000 erhöht werden (Mansour et al., 1988). Von der Annahme ausgehend, daß sowohl die konstruierten Vektoren, als auch die beiden verwendeten Zelllinien, in dieser Arbeit und der von Brown et al. (1994)(Abschnitt 4.2.2.2) zur Verkürzung des Y-Chromosoms verwendeten, die selben Eigenschaften in Bezug auf homologe Rekombinationstätigkeit hätten, müßte durch die verwendete Selektionsstrategie einer von etwa 20-30 Klonen durch homologe Rekombination verkürzt worden sein. Diese günstige Vorhersage ist so nicht eingetreten, denn keiner der 217 Zellklone, die ein Derivatvchromosom 7p enthielten, konnte durch homologe Rekombination in der vorliegenden Arbeit verkürzt werden. Die Integration des Vektors erfolgte stattdessen durch ein nichthomologes Rekombinationsereignis mit einem unbekanntem Chromosomenabschnitt des Derivatvchromosoms. Die Diskrepanz zur erwarteten Häufigkeit könnte dadurch erklärt werden, daß der Faktor 2000 (Mansour et al., 1988) für die Anreicherung von Zellen, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, ein experimentell ermittelter Wert in einer embryonalen Stammzelllinie ist und daher sehr wahrscheinlich nicht ohne weiteres auf andere Zelllinien übertragbar ist.

Neben der verwendeten Zelllinie und der Konstruktion des Vektors (Hasty et al., 1991a, 1992) beeinflussen auch andere Parameter, wie die Länge des homologen DNA Abschnittes (Hasty et al., 1991b), der Grad der Homologie zwischen der chromosomalen und der homologen Sequenz im Vektor (Deng und Capecchi, 1992), die Methode mit der die DNA in die Zelle transfiziert

wird (Thomas et al., 1986) sowie die Lokalisation der chromosomalen Sequenz, mit der eine Rekombination stattfinden soll (Hasty et al., 1994), die Effizienz dieser Methode.

So war der homologe Bereich des Vektors, der in dieser Arbeit verwendet wurde, etwa 2 kb kürzer als der von Brown et al. (1994) beschriebene. Je kürzer dieser Bereich ist, desto unwahrscheinlicher wird eine homologe Rekombination (Hasty et al., 1991b).



**Abbildung 34: Vergleich von pNTElDZ72 mit Vektoren zur Erzeugung von "knock out"-Mutanten**

A: Verkürzung des Derivatchromosoms 7p durch den Vektor pNTElD7Z2 B: Einfügen des *neo*-Gens in eine kodierende, chromosomale Region zur Generierung von "knock out"-Mutanten.

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pNTElD7Z2(-) unterscheidet sich von den für *gene targeting* verwendeten Vektoren (Mansour et al., 1988), da er keinen zweiten homologen Chromosomenabschnitt enthält. Stattdessen ist an dieser Stelle der Telomerrepeat, der das Chromosom abschließen soll, positioniert. Das *neo*-Resistenzgen liegt also außerhalb der homologen Region und wird nicht von ihr umgeben. Außerdem soll der Vektor nicht im eigentlichen Sinn in die Region integrieren, wie er es bei einem *gene targeting* idealerweise tut. Der Telomerrepeat distal des Neomycinresistenzgens soll zu einem Bruch des Chromosoms an dieser Stelle führen und liegt daher am Ende des linearisierten Vektors, an der Stelle, an der ansonsten der zweite homologe Sequenzabschnitt in dem "knock out"-Konstrukt eingefügt wird (Abbildung 34). Welche Auswirkung diese konstruktuelle Änderung auf die durchgeführte Selektionsstrategie hat, wurde bisher noch nicht experimentell untersucht. Es wurde zwar ein in der Anordnung der funktionellen Elemente ähnlicher Vektor, pHTtkM3 (Farr et al., 1991) konstruiert, aber über die gezielte Verkürzung eines Chromosoms mit diesem Plasmid ist bisher nichts bekannt.

Wird durch die konstruktuelle Änderung die Effizienz der Selektionsstrategie negativ beeinflusst, muß möglicherweise eine noch viel größere Anzahl an Zellklonen selektioniert und analysiert werden, um einen Klon zu erhalten, in dem das Derivatchromosom 7p durch homologe Rekombination im Zentromer verkürzt wurde.

### 4.2.3 Vermehrung von humanen Minichromosomen in Hefe

Um menschliche Minichromosomen eingehender untersuchen zu können, ist es sinnvoll, sie auch in Organismen einbringen und vermehren zu können, die Eigenschaften aufweisen, die eine Beeinflussung des Chromosoms erleichtern. Zur späteren Vermehrung eines potentiellen Minichromosoms in Hefe sind eine Reihe zusätzlicher Sequenzelemente in den Fragmentierungsvektor pPNTel eingefügt worden. Die drei Sequenzelemente *ARS1*, *CEN4* und *URA3* wurden dem YAC-Vektor pYAC4 (Burke et al., 1987) entnommen. Die autonome Replikationssequenz *ARS* und das Hefezentromer *CEN* sind neben den Telomeren der Hefe für die geregelte Weitergabe von Chromosomen in *S. cerevisiae* nötig (Murray und Szostak, 1983). Das *URA3*-Gen dient als Selektionsmarker (Abschnitt 3.3.2.2). Als Telomere können in Hefe auch menschliche Telomerrepeats dienen. Dies wurde dazu genutzt, menschliche Telomere in *S. cerevisiae* zu klonieren (Riethmann et al., 1989). Daher sollte es ausreichen, in ein potentielles Mini-Säugerchromosom ein Hefezentromer und eine autonome Replikationssequenz mit einzufügen, um es in *S. cerevisiae* vermehren zu können. Bis heute ist in der Literatur kein Minichromosom beschrieben worden, welches klein genug wäre, um es in *S. cerevisiae* zu vermehren. Dennoch schien es in der vorliegenden Arbeit sinnvoll, den Vektor so zu konstruieren, daß gegebenenfalls eine Amplifikation eines Minichromosoms in Hefe möglich wäre. Auch andere Experimentatoren haben aus ähnlichen Überlegungen die drei oben beschriebenen Hefeelemente mit in ihre Fragmentierungsvektoren aufgenommen (Brown et al., 1994).

## 4.3 Ausblick

### 4.3.1 Schritte zur weiteren Verkürzung des Derivatvchromosoms 7p

Durch die Integration des Vektors pPNTelD7Z2(-) in das menschliche Derivatvchromosom 7p des Klons XXIII-B1 ist neben einem neuen Telomer auch ein in Eukaryonten positiv selektionierbarer Marker mit eingeführt worden. Damit eignet sich der Klon zur Übertragung des modifizierten 7p-Chromosoms in andere Zellen, da eine Selektion auf die Zellen möglich ist, die das Derivatvchromosom 7p aufgenommen haben. Um dieses Chromosom gezielt weiter zu verkürzen wäre es sinnvoll, es in eine andere Zelllinie zu transferieren, welche eine erhöhte Rate an homologen Rekombinationen aufweist. Als Zelllinie wäre die Hühner-B-Zelllinie DT40 geeignet (Buerstedde und Takeda, 1991). In diese Zelllinie konnte durch Mikrozell-vermittelten Chromosomentransfer das Minichromosom HyTM1/36 (Farr et al., 1992) eingeschleust werden, um es in einem nächsten Schritt durch Telomer-verursachte Chromosomenfragmentierung verbunden mit homologer Rekombination gezielt zu verkürzen (Mills et al., 1999). Die Autoren wählten als homologen Sequenzabschnitt ein 12,5 kb langes Restriktionsfragment aus dem *ZXDA*-Gen, welches 400 kb vom  $\alpha$ -Satellitenbereich des X-Chromosoms entfernt liegt. Dadurch ist es gelungen, ein nur 2,4 kb großes, mitotisch stabiles Minichromosom zu erzeugen. Es wurden dabei 2 von nur 200 Klonen identifiziert, die ein verkürztes Chromosom aufwiesen, ohne eine positiv-negativ Selektionsstrategie zu verwenden. Dies spricht für eine hohe Frequenz von homologen Rekombinationsereignissen in der Zelllinie DT-40.

Bei einem weiteren Versuch zur Verkürzung des Derivatvchromosoms des Zellklons XXI-II-B1 sollte ebenfalls ein größerer homologer DNA-Bereich, als der in pPNTelD7Z2(+/-), verwendet werden. Dazu bieten sich die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektoren mit einem doppelt so großen Sequenzabschnitt aus D7Z2, pPNTel2xD7Z2(+/-), an. Sinnvoll wäre auch, daß *neo*-Gen durch einen anderen positiv selektionierbaren Markergen, wie z.B. das Hygromycinresistenzgen, auszutauschen, da das Derivatvchromosom des Zellklons XXIII-B1, schon ein Neomycinresistenzgen durch die erste Verkürzungsrunde enthält. Dazu stehen die beiden Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *XhoI* zur Verfügung. Durch das Einfügen eines neuen Resistenzgens wäre dann eine Selektion auf ein weiteres Integrationsereignis möglich.

Die Orientierung der  $\alpha$ -Satellitensequenz D7Z2 im Zentromer des Derivatvchromosoms 7p ist bisher nicht bekannt. Daher ist es möglich, daß bei der Transfektion des Vektors pPNTelD7Z2(-) Chromosomen 7p ohne D7Z1-Anteil entstanden sind (Abbildung 33B). Bei

weiteren Verkürzungsexperimenten des Chromosoms sollten deswegen auch die Vektoren pPNTelD7Z2(+) und pPNTel2xD7Z2(+), mit gegenläufiger Orientierung des  $\alpha$ -Satelliten, zur Verwendung kommen.

Die Ergebnisse von Brown et al. (1994) lassen vermuten, daß die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination in konstitutivem Heterochromatin der Zentromere erheblich schlechter ist als in euchromatischen Chromosomenabschnitten. Da als DNA-Abschnitt bei pPNTelD7Z2 für die homologe Rekombination der  $\alpha$ -Satellit D7Z2 gewählt wurde, der zusätzlich Aufgaben als Teil des Zentromers haben kann, wäre zu überlegen, ob ein euchromatischer Bereich auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 in der näheren Umgebung des Zentromers als homologer Bereich zur Rekombination gewählt werden kann, um das Chromosom an dieser Stelle ein weiteres mal mit höherer Wahrscheinlichkeit zu verkürzen.

## 4. 4 MACs, Minichromosomen und Chromosomenfragmente: Stand der Technik, Perspektiven und Anwendungen

Die Entwicklung von künstlichen Chromosomen in der Hefe *S. cerevisiae* (YACs) (Murray und Szostak, 1983) war ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Funktion eukaryontischer Chromosomen. Sind erst einmal alle wichtigen Chromosomenbestandteile identifiziert und charakterisiert besteht die Aussicht, in ähnlicher Weise künstliche Säugerchromosomen mit definierten funktionellen Sequenzabschnitten zu erzeugen. Dabei sind die künstlichen Chromosomen selbst erst einmal ein wichtiges Vehikel zur Erforschung funktionell wichtiger chromosomaler Elemente höherer, mehrzelliger Organismen. Darüber hinaus lassen sie sich als Vektoren zur Expression größerer chromosomaler Regionen verwenden.

### 4.4.1 Entwicklung artifizierlicher Säugerchromosomen

In den letzten Jahren sind eine Reihe wichtiger Versuche durchgeführt worden, bei denen künstliche Chromosomen durch die Transfektion von zuvor klonierten (YACs, BACs)  $\alpha$ -Satelliten und Telomeren in der Zelllinie HT-1080 erzeugt wurden (Harrington et al., 1997b, Ikeno et al., 1998, Henning et al., 1999; Ebersole et al., 2000)(Abschnitt 1.6.1). Die entstandenen *de novo* Chromosomen waren Multimere der transfizierten Ausgangs-DNA, die sich durch einen nicht näher bekannten Prozeß in der Zelllinie gebildet haben.

Bei keinem der erzeugten Chromosomen war es bisher möglich, die genaue DNA-Sequenz zu bestimmen. Die Zusammensetzung der MACs wurde durch FISH oder Restriktionskartierung ermittelt (Harrington et al., 1997b, Ikeno et al., 1998; Masumato et al., 1998). Dabei konnten allerdings nur die Sequenzen identifiziert werden, deren Sequenzzusammensetzung zuvor bekannt war und die daher als Hybridisierungssonde zur Verfügung standen. Durch die Verwendung humaner, chromosomenspezifischer Proben konnte in den MACs, die sich aus YACs gebildet haben, keine andere als die zuvor in die Zellen eingebrachte DNA nachgewiesen werden (Ikeno et al., 1998; Masumato et al., 1998). Die Auflösung dieser Methode liegt jedoch im Bereich des mikroskopisch Sichtbaren. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich kleinere endogene Sequenzanteile anderer Chromosomen in den MACs befinden. Aufgrund der relativen Größe und der repetitiven Natur der Zentromere (Abschnitt 1. 5) war eine detailliertere Sequenzanalyse der entstandenen Chromosomen bisher nicht möglich.

Ob sich bei den Versuchen von Harrington und Mitarbeitern (1997b) die MACs nur aus  $\alpha$ -

Satelliten und Telomersequenzen gebildet haben, ist ebenfalls unsicher. Bei den beschriebenen Experimenten bildeten sich nur dann MACs, wenn zusätzlich zu den künstlich erzeugten  $\alpha$ -Satelliten und Telomerrepeats humane, genomische DNA cotransfiziert wurde. Bei der Cotransfektion mit Maus-DNA bildeten sich keine künstlichen Chromosomen. Dies kann durch das Fehlen von potentiellen Replikationsursprüngen in den künstlich erzeugten DNA-Anteilen erklärt werden, aber auch damit, daß der transfizierte  $\alpha$ -Satellit allein nicht ausreicht, ein Zentromer zu bilden. Daher ist die Frage, welche Sequenzen zur Ausbildung eines Zentromers benötigt werden, immer noch nicht eindeutig zu beantworten. Die Analyse von Neozentromeren zeigt, daß sich auch an anderen Sequenzen als  $\alpha$ -Satelliten in menschlichen Zellen Zentromere bilden können (Barry et al., 1999)(Abschnitt 1.5.3).

Neben der Entwicklung und näheren Untersuchung künstlicher Säugerchromosomen wurden schon bestehende natürliche Chromosomen durch Telomer-verursachte Chromosomenfragmentierung sukzessiv verkürzt. Dabei entstanden Minichromosomen, die kleiner als 5 Mb sind (Farr et al., 1991, 1992, 1995; Itzhaki et al., 1992; Barnett et al., 1993; Brown et al., 1994; Heller et al., 1996; Shen et al., 1997; Mills et al., 1999)(Abschnitt 1.6.2). Das kleinste von ihnen wurde aus dem humanen X-Chromosom erzeugt, ist etwa 2,4 Mb groß und besteht in der Hauptsache aus  $\alpha$ -Satelliten DNA (~1,8 Mb). Daneben enthält es einen etwa 40 kb großen  $\gamma$ -Satellitenanteil und ein Teil des Zinkfingergens *ZXDA*, in dem es bei der letzten Verkürzungsrunde gebrochen wurde (Mills et al., 1999).

#### 4.4.2 Manipulation von Säugerchromosomen

In den letzten Jahren sind einige interessante Techniken zur gezielten Manipulation von Chromosomen der Bakterien und Hefen, aber auch von Säugerchromosomen entwickelt worden. Sie ermöglichen die Kombination verschiedener DNA-Elemente in den einzelnen Spezies und können so zur Etablierung von künstlichen Chromosomen als Expressionsvektoren beitragen.

In Hefe ist eine gezielte Rekombination zwischen zwei Chromosomen durch Einbringen homologer Sequenzanteile in beide Chromosomen möglich (Den Dunnen et al., 1992; Larin et al., 1996). Die Verwendung von häufig vorkommenden humanen Repeatsequenzen kann zur Neukombination oder Deletion bestehender YACs verwendet werden. Dazu sind spezielle TAR-(Transformations Assoziierte Rekombinations)-Vektoren erzeugt worden, die neben den zur autonomen Replikation benötigten Hefesequenzen Anteile menschlicher Repeats enthalten (Larionov et al., 1996). Dadurch könnten in *S. cerevisiae* gezielt neue Gene in Minichromosomenvektoren eingebracht oder diese verkürzt werden. Anschließend könnten die Minichromosomen wieder in Säugerzellen transferiert werden, um ihre Funktionalität zu untersuchen.

Für einen Austausch von Chromosomen zwischen Hefen und Säugerzellen eignen sich Hefestämme, deren Telomerase so verändert ist, daß an den Chromosomenenden statt der eigenen die Telomersequenzen von Säugetieren angehängt werden (Henning et al., 1998). Dies ist notwendig, da der menschliche Telomerrepeat als Template für die Telomerase von *S. cerevisiae* verwendet werden kann, die Hefe aber ihren eigenen Repeat an die humanen Telomerenden anfügt (Cross et al., 1989). Dieser Repeat ist wiederum in Säugerzellen kein Template für die Säugetiertelomerase (Hanish et al., 1994). Daher würden die Enden des Minichromosoms von der menschlichen Telomerase nicht mehr verlängert, was auf Dauer den Verlust dieses künstlichen Chromosoms zur Folge haben könnte.

Die gezielte homologe Rekombination zweier Sequenzen in DT40-Zellen, die eine erhöhte Rate an homologen zu nichthomologen Rekombinationen aufweisen (Buerstedde und Takeda, 1991), ist eine Möglichkeit zur effizienten Manipulation von Chromosomen (Kuroiwa et al., 1998; Mills et al., 1999; Kuroiwa et al., 2000). In DT40-Zellen können gezielt Chromosomen durch Telomer-vermittelte Chromosomenverkürzung gebrochen (Kuroiwa et al., 1998; Mills et al., 1999), aber auch neue Sequenzabschnitte in Chromosomen eingefügt werden (Buerstedde und Takeda, 1991; Kuroiwa et al., 2000). Mit dem *Cre-loxP*-Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 (Abremski et al., 1983) lassen sich auch in Säugerzellen Translokationen zwischen verschiedenen Chromosomen hervorrufen, um Gene oder ganze Chromosomen neu zu kombinieren, die keine homologen Sequenzanteile enthalten (Smith et al., 1995; van Deursen et al., 1995; Kuroiwa et al., 2000). Durch Cotransfektion von zu exprimierenden Genen, Selektionsmarker-DNA und Satelliten-DNA können gleichfalls neue Gene in Minichromosomen eingebracht werden (Guiducci et al., 1999).

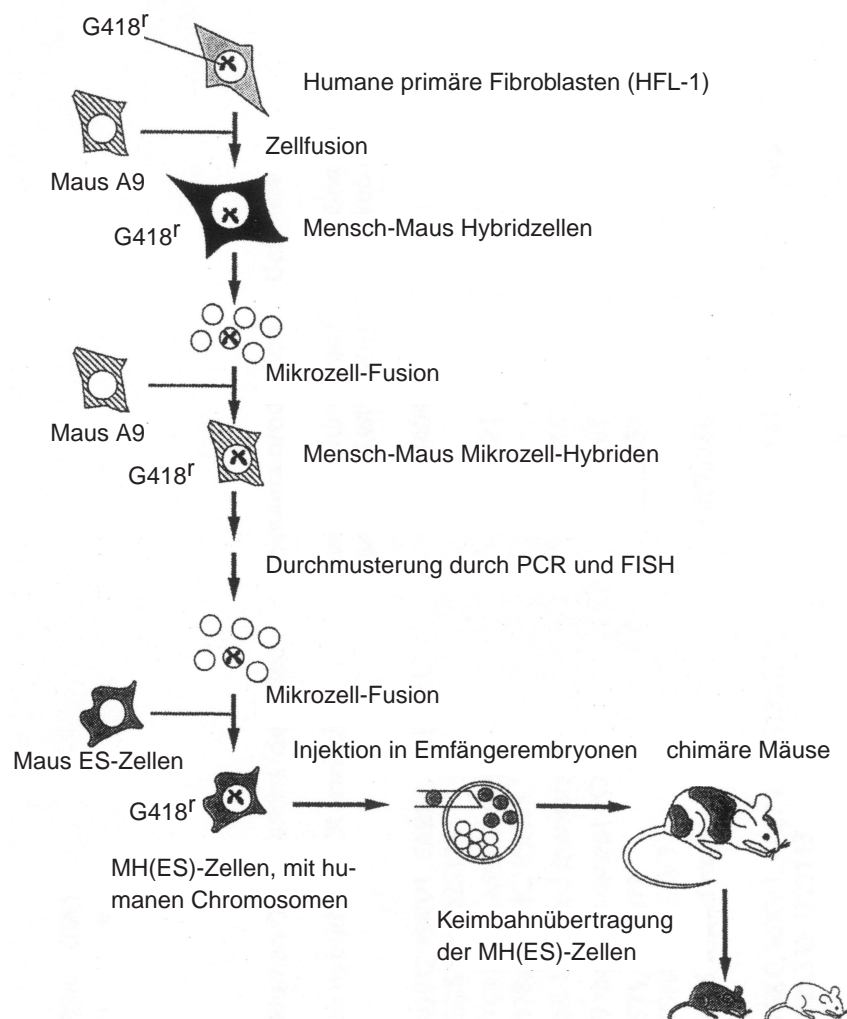
Es stehen damit eine Reihe von Verfahren zur Verfügung, um bereits bestehende MACs, bzw. Minichromosomen miteinander zu kombinieren oder diese weiter zu verkürzen. Aufgrund der relativen Größe bestehender MACs und Minichromosomen sind vor allen Dingen die Verfahren, welche Manipulation von Chromosomen innerhalb der Säugerzelle ermöglichen, momentan von Interesse.



### 4.4.3 Anwendungsmöglichkeiten

Durch Mikrozell-vermittelten Chromosomentransfer (MMCT)(Fournier et al., 1977) ist es gelungen, menschliche Mini-Chromosomen (Shen et al., 1997) in embryonale Stammzellen der Maus zu transferieren und transgene Mäuse aus ihnen aufzuziehen (Shen et al., 2000). Durch die Integration von Zentromerabschnitten der Maus in ein humanes Mini-Chromosom ist ein Minichromosom (ST1) in ES-Zellen entstanden, welches etwa 4,5 Mb groß ist, stabil auf die Tochterzellen weitergegeben wurde und auch in Geweben von Mäusen, die aus den ES-Zellen gezüchtet wurden, wiederzufinden war (Shen et al., 2000). Jedoch wird dieses Mini-Chromosom noch relativ ineffizient auf die nächste Mausgeneration weitergegeben (Shen et al., 2000).

Experimente von Tomizuka und Mitarbeiter haben gezeigt, wie es möglich ist, Chromosomen oder Chromosomenfragmente (hCFs) als "Vektoren" zu verwenden und diese sogar durch die Keimbahn auf die nächste Säugetiergeneration zu übertragen. Dazu wurden Mäuse aus ES-Zellhybriden herangezogen, die ganze menschliche Chromosomen oder hCFs enthielten. Zur Erzeugung dieser embryonalen Mausstammzelllinien wurde zuerst in Chromosomen humaner embryonaler Fibroblasten ein Neomycinrestistenzgen durch zufällige Integration eingebracht. Die Zellen wurden danach mit der Mauszelllinie A9 verschmolzen und G418-Resistente Hybridzellklone selektioniert, die als Donorzelllinie für einen Mikrozell-vermittelten Chromosomentransfer verwendet wurden. Nachdem die Mikrozellen erneut mit A9-Zellen verschmolzen wurden, konnten etwa 700 unabhängig voneinander entstandene G418-resistente Klone selektioniert werden. Diese Zellen wurden dann mit PCR auf die humanen Immunglobulin- (*Ig*)-Gene  $\kappa$ ,  $\lambda$  und Gene für die schwere Kette sowie mit Markern für die Chromosomen 2, 14 und 22 untersucht. Die Klone, die die Sequenz für die menschlichen Igs enthalten, wurden zum MMCT mit ES-Zellen verwendet um aus ihnen Mäuse zu erzeugen, die menschliche *Ig*-Gene exprimieren (Tomizuka et al., 1997)(Abbildung 35).



**Abbildung 35: Erzeugung von MH(ES)-Zellen**

Schematische Darstellung der Erzeugung von Mensch-Maus hybridzellen mit embryonalen Stammzellen der Maus, MH(ES), zur Herstellung chimärer Mäuse, die humane Gene exprimieren, die auf menschlichen Chromosomen oder Chromosomenfragmenten hCF liegen.  $G418^r$ : G418-Resistenz (aus Tomizuka et al., 1997)

Durch die Kreuzung zweier transchromosomaler (Tc) Mauslinien wurden Mäuse gezüchtet, die menschliche Antikörper exprimieren (Tomizuka et al., 2000). Eine der beiden transchromosomalen Mauslinien enthält das humane  $Ig\kappa$ -Gen [Tc(w23)], die andere ein menschliches Chromosom-14-Fragment, welches den  $IgH$ -Locus trägt [Tc(SC20)]. Als Ausgangslinie wurde eine  $Ig\kappa/IgH$  doppel "knock out"-Mausmutante (KO) verwendet, bei der beide Mausgene funktionsunfähig waren. Diese doppelt Tc- doppelt KO-Mäuse eignen sich zur Herstellung "menschlicher" monoklonaler Antikörper. Die Ergebnisse demonstrieren, daß die Tc-Technologie zur Humanisierung des Mausgenoms genutzt werden kann.

Bei den Arbeiten von Kuroiwa und Mitarbeitern wurden viele der bereits erwähnten Techniken vereint um das humane Chromosomenfragment Tc(SC20)(Tomizuka et al., 2000) als manipulierbaren "Minichromosomenvektor" zu etablieren. Dazu wurde die *Cre/loxP* vermittelte Chromosomentranslokation und die Telomer verursachte Chromosomenfragmentierung in DT40-Zellen durchgeführt, die eine erhöhte Rate an homologen Rekombinationen aufweist.

Eine etwa 10 Mb große chromosomale Region um den humanen  $Ig\lambda$ -Locus auf Chromosom 22 wurde durch die Integration einer *loxP-site* auf einer Seite und einer gerichteten Telomer-verursachten Chromosomenfragmentierung auf der entgegengesetzten Seite (Kuroiwa et al., 1998) eingegrenzt. Durch die stabile Expression der Cre-Rekombinase in DT40 Zellen, die sowohl das Chromosomenfragment Tc(SC20), in der ebenfalls eine *loxP*-Seite integriert wurde, sowie das humane Chromosom 22-Fragment enthielt, fand eine Translokation dieser beiden Chromosomenfragmente statt. Die 10 Mb große chromosomale Region um den  $Ig\lambda$ -Locus, die allein nicht mitotisch stabil ist, wurde so mit dem stabilen Tc(SC20) Chromosomenfragment, welches den  $IgH$  Locus enthält, gekoppelt ( $\lambda$ -HAC). Durch MMCT wurde dieses neu zusammengesetzte Chromosom anschließend in ES-Zellen der Maus transferiert und aus diesen chimäre Mäuse herangezogen, die menschliche  $IgH$ - und  $Ig\lambda$ -Loci exprimieren (Kuroiwa et al., 2000).

Diese Verbindung von Minichromosomen-, Tc-Technologie, Cre/*loxP*-Rekombinationssystem und homologe Rekombination in DT40-Zellen zeigt auf, welche Möglichkeiten in Zukunft zur Erzeugung transgener Tiere zur Verfügung stehen werden.

Eine andere Arbeit (Hernandez et al., 1999) befaßt sich mit der Untersuchung von Gendosiseffekten, die eine Rolle bei menschlichen Erkrankungen spielen. Die Trisomie des Chromosoms 21 führt zum Down Syndrom und ist die häufigste der Aneuploidien beim Menschen (1 von 600 lebend Geborenen und 1 von 150 Schwangerschaften weltweit). Als wahrscheinliche Ursache für die Ausprägung des Phänotyps wird eine Verschiebung der Gendosis angenommen. Zur Etablierung eines Mausmodellsystems verwendeten die Autoren ein Protokoll des Mikrozell-vermittelten Chromosomentransfers, bei dem die Mikrozellen zusätzlich mit  $\gamma$ -Strahlen bestrahlt werden (Dowdy et al., 1990), um Chromosomenfragmente des menschlichen Chromosoms 21 in ES-Zellen einzuschleusen und Mauslinien aus ihnen zu züchten. Die chimären Mäuse dienen als Modell zur Untersuchung, welche chromosomalen Regionen an der Ausprägung spezieller Phänotypen verantwortlich sind. Die TC-Technologie kann so auch zur Erforschung von Erkrankungen beitragen, bei denen die Gendosis als Ursache des Phänotyps angenommen wird.

Die beschriebenen Versuchsansätze haben in den letzten Jahren eine Reihe von künstlich erzeugten oder verkürzten Chromosomen hervorgebracht, die nur zum Teil mitotisch stabil sind. Die Entwicklung von Minichromosomenvektoren, die während Mitose und Meiose stabil weitergegeben werden, ist jedoch notwendig, um große chromosomale DNA-Abschnitte in Zellen einschleusen und damit zur Erzeugung transgener Tiere effektiv verwenden zu können. Um

MACs oder Minichromosomen als Vektoren bei der Gentherapie einzusetzen, ist darüberhinaus eine detaillierte Kenntnis der einzelnen Sequenzabschnitte der Vektoren unabdingbar. Gene, die sich direkt am oder im Zentromer befinden und exprimiert werden, dürfen keinesfalls in Gentherapievektoren enthalten sein, da sie ein unkalkulierbares Risiko für den Patienten darstellen. In diesem Falle wäre nicht abzuschätzen, welchen Einfluß das bereits im Vektor enthaltene Gen auf die Homöostase der Empfängerzelle hat. Zum Ausschluß eines jeglichen Risikos müssen daher noch kleinere artifizielle oder Minichromosomenvektoren hergestellt werden, die eine gezieltere Analyse und Manipulation der Vektorsequenzen zulassen. Ein Transfer der verwendeten MACs, oder Minichromosomen in anderen besser manipulierbaren Systemen, wie etwa *S. pombe*, *S. cerevisiae* oder *E. coli* wäre bei diesem Vorhaben von großem Vorteil. Dazu müßten die bestehenden Minichromosomen durch weitere, idealerweise gezielte Fragmentierungen wenn möglich so weit verkürzt werden, daß sie in den genannten Modellorganismen vermehrungsfähig sind. Es macht also weiterhin Sinn, möglichst kleine MACs und Minichromosomen zu erzeugen, deren Vermehrung auch außerhalb von Säugerzellen möglich ist.

## 5 Zusammenfassung

Das Genom der meisten höheren Organismen enthält neben den kodierenden und regulatorischen Sequenzen auch Sequenzabschnitte, die für die funktionelle Organisation des Genoms in Chromosomen und die geregelte Weitergabe der Erbinformation an die Tochterzellen notwendig sind. Als bedeutende funktionelle Elemente wurden in *S. cerevisiae* Replikationsursprünge (ARS), Telomere (TEL) und das Zentromer (CEN) identifiziert. Bei Säugetieren macht die Komplexität der Genome jedoch das Auffinden funktioneller DNA-Sequenzen erheblich schwieriger als bei einfachen Eukaryonten. So konnte bisher als einziges die DNA-Sequenz, die für die Telomerfunktion in Säugerzellen notwendig ist, eindeutig identifiziert werden.

Eine Teilaufgabe dieser Arbeit war es, überlappende genomische Klone aus dem Zentromerbereich des menschlichen Chromosoms 7 durch STS-Gehalt-Kartierung zu sortieren, um die Grundlage für eine eventuell folgende Sequenzanalyse dieses strukturell wichtigen Chromosomenabschnitts zu schaffen und die Analyse von verkürzten Chromosomen 7p zu ermöglichen. Von insgesamt 136 bereits vorsortierten Klonen konnten dabei 69 in 7 kleine *contigs* eingeteilt werden, die zwischen den STS-Markern D7S499 auf dem kurzen Arm 7p und D7S2503 auf dem langen Arm 7q lagen.

In einem der verwendeten Klone, BAC 7c23, konnte das Gen des kleinen Hitzeschockproteins HSP27 nachgewiesen werden. Bei genauerer Untersuchung des Klones ergab sich eine Lokalisation auf dem langen Arm 7q11.1-11.2 zwischen den STS-Markern D7S489 und D7S669.

Künstliche Säugerchromosomen könnten analog den künstlichen Chromosomen der Hefe (YACs) ein wichtiges Werkzeug für die Erforschung und Veränderung der Geninformation in Säugetieren sein. Es wurde deswegen ein Vektor konstruiert, mit dem man durch Telomer-vermittelte Chromosomenfragmentierung ein natürliches Chromosom verkürzen kann, um ein möglichst kleines Chromosom zu erhalten, welches später als Basis zur Erzeugung eines künstlichen Säugerchromosoms dienen sollte. Zur Verkürzung wurde eine Mensch/Maus-Hybridzelllinie (RuRag 14-4-7-44-7) gewählt, in der der kurze Arm des menschlichen Chromosom 7 vereinzelt als Derivatvchromosom vorliegt. In den zur Verkürzung konstruierten Vektor wurde ein Teil des Zentromers von Chromosom 7 aus dem Bereich D7Z2 eingefügt. Diese Sequenz soll das *targeting* (gezielte Einbringen) des Vektors direkt in das Zentromer des Derivatvchromosoms ermöglichen. Der Vektor wurde weiterhin mit einem 800 bp langen Telomerrepeat ausgestattet, der Chromosomen fragmentieren und an der Bruchstelle ein künstliches Ende an-

fügen kann. Zusätzlich wurden die drei Hefeelemente ARS1, CEN4 und URA3 eingefügt. Durch das Einbringen dieser Sequenzelemente sollte ein ausreichend verkürztes menschliches Chromosom in *S. cerevisiae* vermehrt und dadurch besser manipuliert werden können. Der Vektor (pPNTel) enthielt zudem die beiden selektierbaren Markergene *neo* und *hsv-tk*. Während das *neo*-Gen die Möglichkeit eröffnet, Zellen zu selektionieren, die den Vektor stabil ins Genom integriert haben, können durch das *hsv-tk*-Gen die Zellen angereichert werden, die ihn durch homologe Rekombination gezielt an einer bestimmten Stelle des Genoms aufgenommen haben.

In Transfektionsversuchen konnte gezeigt werden, daß die Vektoren in der Lage sind, die Chromosomen der Zelllinie RuRag 14-4-7-44-7 zu fragmentieren. In einem von insgesamt 345 selektionierten Zellklonen (XXIII-B1) wurde das menschliche Derivatvchromosom 7p verkürzt.

Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektoren und die erzielten Kartierungsergebnisse sind eine wertvolle Grundlage für weiterführende Arbeiten zur Herstellung von Minichromosomen. Der Ansatz der Verkürzung eines bereits existierenden Derivatvchromosoms besitzt im Vergleich zu vielen anderen Verkürzungsstrategien, bzw. einer Neukonstruktion das Potential, durch eine weitere Verkürzung ein Minichromosom entstehen zu lassen, welches möglicherweise keine kodierenden Sequenzabschnitte mehr enthält. Ein solches Minichromosom wäre ein idealer Vektor zur stabilen Expression großer genomischer Abschnitte in Säugerzellen und transgenen Tieren.

## 6 Abkürzungen

APS	Ammoniumumpersulfat
ARS	autonome Replikationssequenz
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	künstliches Bakterienchromosom
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder-Serum-Albumin
ca.	circa
CEN	Zentromer
CENP	Zentromerprotein
CIP	Alkalische Phosphatase (vom Kalbsthymus)
cM	<i>centiMorgan</i>
cR	<i>centiRays</i>
CREST	Calcinosis, Raynaud-Phänomen, Oesophagus-Dysmotilität, Sklerodaktylie, Telangiectasie
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyrironukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Embryonale Stammzellen
EST	<i>expressed sequence tagged sites</i>
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-isothyocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
G418	Geneticin
GANC	Gancyclovir
HAC	künstliches humanes Chromosom
hCF	humanes Chromosomenfragment
HOR	<i>higher-order-repeat</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
Hsp	Hitzeschockprotein
HSV	<i>Herpes simplex</i> Virus
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
KO	<i>knock out</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAC	künstliches Säugerchromosom
Mb	Megabasen

neo	Neomycin
p	kurzer Chromosomenarm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	<i>Personal Computer</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PS	Penicillin, Streptomycin
q	langer Chromosomenarm
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RR14	Ru Rag 14-4-7-44-(7)
RR6	Ru Rag 6-20-12
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
STS	<i>sequence-tagged site</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Transchromosomal
TE	Tris-EDTA
TEL	Telomer
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen-diamin
tk	Thymidinkinase
TNE	Tris-Natrium-EDTA
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
trp	Tryptophan
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
ura	Uracil
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozent
Vol	Volumen
w/v	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid
YAC	künstliches Hefechromosom

Für Mengen-, Größen-, Zeit- und andere physikalische Angaben wurden SI- oder gesetzliche Einheiten verwendet. Die Basen der Nukleinsäuren wurden mit dem gebräuchlichen Einbuchstabencode abgekürzt.



## 7 Literaturverzeichnis

- Aagaard L., Laible G., Selenko P., Schmid M., Dorn R., Schotta G., Kuhfittig S., Wolf A., Lebersorger A., Singh P.B., Reuter G. und Jenuwein T. (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *Embo J*, **18**: 1923-1938.
- Abremski K., Hoess R. und Sternberg N. (1983) Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*, **32**: 1301-1311.
- Agresti A., Meneveri R., Siccardi A.G., Marozzi A., Corneo G., Gaudi S. und Ginelli E. (1989) Linkage in human heterochromatin between highly divergent Sau3A repeats and a new family of repeated DNA sequences (HaeIII family). *J Mol Biol*, **205**: 625-631.
- Aladjem M.I., Rodewald L.W., Kolman J.L. und Wahl G.M. (1998) Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus. *Science*, **281**: 1005-1009.
- Alexandrov I.A., Mashkova T.D., Akopian T.A., Medvedev L.I., Kisselev L.L., Mitkevich S.P. und Yurov Y.B. (1991) Chromosome-specific alpha satellites: two distinct families on human chromosome 18. *Genomics*, **11**: 15-23.
- Alexandrov I.A., Medvedev L.I., Mashkova T.D., Kisselev L.L., Romanova L.Y. und Yurov Y.B. (1993) Definition of a new alpha satellite suprachromosomal family characterized by monomeric organization. *Nucleic Acids Res*, **21**: 2209-2215.
- Alexandrov I.A., Mitkevich S.P. und Yurov Y.B. (1988) The phylogeny of human chromosome specific alpha satellites. *Chromosoma*, **96**: 443-453.
- Allshire R.C., Gosden J.R., Cross S.H., Cranston G., Rout D., Sugawara N., Szostak J.W., Fantes P.A. und Hastie N.D. (1988) Telomeric repeat from *T. thermophila* cross hybridizes with human telomeres. *Nature*, **332**: 656-659.
- Anand R., Riley J.H., Butler R., Smith J.C. und Markham A.F. (1990) A 3.5 genome equivalent multi access YAC library: construction, characterisation, screening and storage. *Nucleic Acids Res*, **18**: 1951-1956.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. und Struhl K. (1987) Gene Targeting by Homologous Recombination. *Current Protocols in molecular biologie. Green Publishing Associates and Wiley-Intersciences*, New York: 9.15.
- Barnett M.A., Buckle V.J., Evans E.P., Porter A.C., Rout D., Smith A.G. und Brown W.R. (1993) Telomere directed fragmentation of mammalian chromosomes. *Nucleic Acids Res*, **21**: 27-36.
- Barry A.E., Howman E.V., Cancilla M.R., Saffery R. und Choo K.H. (1999) Sequence analysis of an 80 kb human neocentromere. *Hum Mol Genet*, **8**: 217-227.
- Bauch W., Hellkuhl B. und Grzeschik K.H. (1978) Regional assignment of the gene for human beta-glucuronidase by the use of human-mouse cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet*, **22**: 434-436.
- Baum C., Forster P., Hegewisch-Becker S. und Harbers K. (1994) An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques*, **17**: 1058-1062.

- Bayne R.A., Broccoli D., Taggart M.H., Thomson E.J., Farr C.J. und Cooke H.J. (1994) Sandwiching of a gene within 12 kb of a functional telomere and alpha satellite does not result in silencing. *Hum Mol Genet*, **3**: 539-546.
- Beattie T.L., Zhou W., Robinson M.O. und Harrington L. (1998) Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol*, **8**: 177-180.
- Bellanne-Chantelot C., Lacroix B., Ougen P., Billault A., Beauvils S., Bertrand S., Georges I., Glibert F., Gros I., Lucotte G. et al. (1992) Mapping the whole human genome by fingerprinting yeast artificial chromosomes. *Cell*, **70**: 1059-1068.
- Bender K. und Grzeschik K.H. (1976) Assignment of the genes for human glyoxalase I to chromosome 6 and for human esterase D to chromosome 13. *Cytogenet Cell Genet*, **16**: 93-96.
- Bianchi A., Smith S., Chong L., Elias P. und de Lange T. (1997) TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *Embo J*, **16**: 1785-1794.
- Biessmann H., Carter S.B. und Mason J.M. (1990) Chromosome ends in *Drosophila* without telomeric DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 1758-1761.
- Bilaud T., Brun C., Ancelin K., Koering C.E., Laroche T. und Gilson E. (1997) Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet*, **17**: 236-239.
- Bloom K. (1993) The centromere frontier: kinetochore components, microtubule-based motility, and the CEN-value paradox. *Cell*, **73**: 621-624.
- Bouffard G.G., Idol J.R., Braden V.V., Iyer L.M., Cunningham A.F., Weintraub L.A., Touchman J.W., Mohr-Tidwell R.M., Peluso D.C., Fulton R.S., Ueltzen M.S., Weissenbach J., Magness C.L. und Green E.D. (1997) A physical map of human chromosome 7: an integrated YAC contig map with average STS spacing of 79 kb. *Genome Res*, **7**: 673-692.
- Broccoli D., Smogorzewska A., Chong L. und de Lange T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*, **17**: 231-235.
- Brown K.E., Barnett M.A., Burgtorf C., Shaw P., Buckle V.J. und Brown W.R. (1994) Dissecting the centromere of the human Y chromosome with cloned telomeric DNA. *Hum Mol Genet*, **3**: 1227-1237.
- Brown W. und Tyler-Smith C. (1995) Centromere activation. *Trends Genet*, **11**: 337-339.
- Brown W.R. (1989) Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature*, **338**: 774-776.
- Bryan T.M., Sperger J.M., Chapman K.B. und Cech T.R. (1998) Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena thermophila* and *Oxytricha trifallax*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 8479-8484.
- Buchman A.R., Lue N.F. und Kornberg R.D. (1988) Connections between transcriptional activators, silencers, and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. *Mol Cell Biol*, **8**: 5086-5099.
- Buerstedde J.M. und Takeda S. (1991) Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell*, **67**: 179-188.
- Burke D.T., Carle G.F. und Olson M.V. (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*, **236**: 806-812.
- Cahill D.P., Lengauer C., Yu J., Riggins G.J., Willson J.K., Markowitz S.D., Kinzler K.W. und Vogelstein B. (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, **392**: 300-303.

- Camargo M. und Cervenka J. (1982) Patterns of DNA replication of human chromosomes. II. Replication map and replication model. *Am J Hum Genet*, **34**: 757-780.
- Cambareri E.B., Aisner R. und Carbon J. (1998) Structure of the chromosome VII centromere region in *Neurospora crassa*: degenerate transposons and simple repeats. *Mol Cell Biol*, **18**: 5465-5477.
- Campbell M.S. und Gorbsky G.J. (1995) Microinjection of mitotic cells with the 3F3/2 anti-phosphoepitope antibody delays the onset of anaphase. *J Cell Biol*, **129**: 1195-1204.
- Capecchi M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**: 1288-1292.
- Carroll S.M., DeRose M.L., Kolman J.L., Nonet G.H., Kelly R.E. und Wahl G.M. (1993) Localization of a bidirectional DNA replication origin in the native locus and in epically amplified murine adenosine deaminase loci. *Mol Cell Biol*, **13**: 2971-2981.
- Chan G.K., Jablonski S.A., Sudakin V., Hittle J.C. und Yen T.J. (1999) Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol*, **146**: 941-954.
- Chong L., van Steensel B., Broccoli D., Erdjument-Bromage H., Hanish J., Tempst P. und de Lange T. (1995) A human telomeric protein. *Science*, **270**: 1663-1667.
- Choo K.H. (1997) Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet*, **61**: 1225-1233.
- Choo K.H. (1998) Turning on the centromere. *Nat Genet*, **18**: 3-4.
- Choo K.H., Vissel B., Nagy A., Earle E. und Kalitsis P. (1991) A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic Acids Res*, **19**: 1179-1182.
- Chumakov I.M., 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.
- Ciocca D.R., Oesterreich S., Chamness G.C., McGuire W.L. und Fuqua S.A. (1993) Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst*, **85**: 1558-1570.
- Collins K. und Gandhi L. (1998) The reverse transcriptase component of the Tetrahymena telomerase ribonucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 8485-8490.
- Cooke C.A., Bernat R.L. und Earnshaw W.C. (1990) CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore. *J Cell Biol*, **110**: 1475-1488.
- Cooke H. (1992) Using chromosome features in genome mapping. *Trends Biotechnol*, **10**: 23-26.
- Cooper K.F., Fisher R.B. und Tyler-Smith C. (1992) Structure of the pericentric long arm region of the human Y chromosome. *J Mol Biol*, **228**: 421-432.
- Cooper K.F., Fisher R.B. und Tyler-Smith C. (1993) Structure of the sequences adjacent to the centromeric alphoid satellite DNA array on the human Y chromosome. *J Mol Biol*, **230**: 787-799.
- Corneo G., Ginelli E. und Polli E. (1967) A satellite DNA isolated from human tissues. *J Mol Biol*, **23**: 619-622.

- Corneo G., Ginelli E. und Polli E. (1968) Isolation of the complementary strands of a human satellite DNA. *J Mol Biol*, **33**: 331-335.
- Corneo G., Ginelli E. und Polli E. (1970) Repeated sequences in human DNA. *J Mol Biol*, **48**: 319-327.
- Corneo G., Ginelli E. und Polli E. (1971) Renaturation properties and localization in heterochromatin of human satellite DNA's. *Biochim Biophys Acta*, **247**: 528-534.
- Coverley D. und Laskey R.A. (1994) Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem*, **63**: 745-776.
- Cremer T., Lichter P., Borden J., Ward D.C. und Manuelidis L. (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet*, **80**: 235-246.
- Croce C.M. und Koprowski H. (1974) Somatic cell hybrids between mouse peritoneal macrophages and SV40-transformed human cells. I. Positive control of the transformed phenotype by the human chromosome 7 carrying the SV40 genome. *J Exp Med*, **140**: 1221-1229.
- Cross S.H., Allshire R.C., McKay S.J., McGill N.I. und Cooke H.J. (1989) Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature*, **338**: 771-774.
- Cutts S.M., Fowler K.J., Kile B.T., Hii L.L., O'Dowd R.A., Hudson D.F., Saffery R., Kalitsis P., Earle E. und Choo K.H. (1999) Defective chromosome segregation, microtubule bundling and nuclear bridging in inner centromere protein gene (Incenp)-disrupted mice. *Hum Mol Genet*, **8**: 1145-1155.
- de la Puente A., Velasco E., Perez Jurado L.A., Hernandez-Chico C., van de Rijke F.M., Scherer S.W., Raap A.K. und Cruces J. (1998) Analysis of the monomeric alphoid sequences in the pericentromeric region of human chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet*, **83**: 176-181.
- de Lange T. und DePinho R.A. (1999) Unlimited mileage from telomerase? *Science*, **283**: 947-949.
- de Lange T., Shiue L., Myers R.M., Cox D.R., Naylor S.L., Killery A.M. und Varmus H.E. (1990) Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*, **10**: 518-527.
- Den Dunnen J.T., Grootsholten P.M., Dauwerse J.G., Walker A.P., Monaco A.P., Butler R., Anand R., Coffey A.J., Bentley D.R., Steensma H.Y. et al. (1992) Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD-gene by homologous YAC recombination. *Hum Mol Genet*, **1**: 19-28.
- Deng C. und Capecchi M.R. (1992) Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol*, **12**: 3365-3371.
- DePamphilis M.L. (1997) The search for origins of DNA replication. *Methods*, **13**: 211-219.
- DePamphilis M.L. (2000) Review: nuclear structure and DNA replication. *J Struct Biol*, **129**: 186-197.
- Depinet T.W., Zackowski J.L., Earnshaw W.C., Kaffe S., Sekhon G.S., Stallard R., Sullivan B.A., Vance G.H., Van Dyke D.L., Willard H.F., Zinn A.B. und Schwartz S. (1997) Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet*, **6**: 1195-1204.

- 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. und Weissenbach J. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*, **380**: 152-154.
- Dieken E.S., Epner E.M., Fiering S., Fournier R.E. und Groudine M. (1996) Efficient modification of human chromosomal alleles using recombination- proficient chicken/human microcell hybrids. *Nat Genet*, **12**: 174-182.
- Dijkwel P.A. und Hamlin J.L. (1995) The Chinese hamster dihydrofolate reductase origin consists of multiple potential nascent-strand start sites. *Mol Cell Biol*, **15**: 3023-3031.
- Ding J., Hayashi M.K., Zhang Y., Manche L., Krainer A.R. und Xu R.M. (1999) Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev*, **13**: 1102-1115.
- Dong F., Miller J.T., Jackson S.A., Wang G.L., Ronald P.C. und Jiang J. (1998) Rice (*Oryza sativa*) centromeric regions consist of complex DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 8135-8140.
- Dowdy S.F., Scanlon D.J., Fasching C.L., Casey G. und Stanbridge E.J. (1990) Irradiation microcell-mediated chromosome transfer (XMMCT): the generation of specific chromosomal arm deletions. *Genes Chromosomes Cancer*, **2**: 318-327.
- Drwringa H.L., Toji L.H., Kim C.H., Greene A.E. und Mulivor R.A. (1993) NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panels 1 and 2. *Genomics*, **16**: 311-314.
- du Sart D., Cancilla M.R., Earle E., Mao J.I., Saffery R., Tainton K.M., Kalitsis P., Martyn J., Barry A.E. und Choo K.H. (1997) A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nat Genet*, **16**: 144-153.
- Dujardin D., Wacker U.I., Moreau A., Schroer T.A., Rickard J.E. und De Mey J.R. (1998) Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol*, **141**: 849-862.
- Dunham I., Shimizu N., Roe B.A., Chissoe S., Hunt A.R., Collins J.E., Bruskiwich R., Beare D.M., Clamp M., Smink L.J., Ainscough R., Almeida J.P., Babbage A., Bagguley C., Bailey J., Barlow K., Bates K.N., Beasley O., Bird C.P., Blakey S., Bridgeman A.M., Buck D., Burgess J., Burrill W.D., O'Brien K.P. et al. (1999) The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*, **402**: 489-495.
- Dutta A. und Bell S.P. (1997) Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**: 293-332.
- Earnshaw W.C. und Bernat R.L. (1991) Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma*, **100**: 139-146.
- Earnshaw W.C. und Cooke C.A. (1989) Proteins of the inner and outer centromere of mitotic chromosomes. *Genome*, **31**: 541-552.
- Earnshaw W.C., Ratrie H.d. und Stetten G. (1989) Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma*, **98**: 1-12.
- Earnshaw W.C. und Rothfield N. (1985) Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*, **91**: 313-321.

- Ebersole T.A., Ross A., Clark E., McGill N., Schindelbauer D., Cooke H. und Grimes B. (2000) Mammalian artificial chromosome formation from circular alphoid input DNA does not require telomere repeats. *Hum Mol Genet*, **9**: 1623-1631.
- Echeverri C.J., Paschal B.M., Vaughan K.T. und Vallee R.B. (1996) Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J Cell Biol*, **132**: 617-633.
- Edenberg H.J. und Huberman J.A. (1975) Eukaryotic chromosome replication. *Annu Rev Genet*, **9**: 245-284.
- Eichler E.E. (1999) Repetitive conundrums of centromere structure and function. *Hum Mol Genet*, **8**: 151-155.
- Eversole A. und Maizels N. (2000) In vitro properties of the conserved mammalian protein hnRNP D suggest a role in telomere maintenance. *Mol Cell Biol*, **20**: 5425-5432.
- Fang G. und Cech T.R. (1993) Oxytricha telomere-binding protein: DNA-dependent dimerization of the alpha and beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 6056-6060.
- Farr C., Fantes J., Goodfellow P. und Cooke H. (1991) Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 7006-7010.
- Farr C.J., Bayne R.A., Kipling D., Mills W., Critcher R. und Cooke H.J. (1995) Generation of a human X-derived minichromosome using telomere-associated chromosome fragmentation. *Embo J*, **14**: 5444-5454.
- Farr C.J., Stevanovic M., Thomson E.J., Goodfellow P.N. und Cooke H.J. (1992) Telomere-associated chromosome fragmentation: applications in genome manipulation and analysis. *Nat Genet*, **2**: 275-282.
- Faulkner N.E., Vig B., Echeverri C.J., Wordeman L. und Vallee R.B. (1998) Localization of motor-related proteins and associated complexes to active, but not inactive, centromeres. *Hum Mol Genet*, **7**: 671-677.
- Felsenfeld G. (1992) Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature*, **355**: 219-224.
- Feng J., Funk W.D., Wang S.S., Weinrich S.L., Avilion A.A., Chiu C.P., Adams R.R., Chang E., Allsopp R.C., Yu J. et al. (1995) The RNA component of human telomerase. *Science*, **269**: 1236-1241.
- Fetni R., Richer C.L., Malfoy B., Dutrillaux B. und Lemieux N. (1997) Cytologic characterization of two distinct alpha satellite DNA domains on human chromosome 7, using double-labeling hybridizations in fluorescence and electron microscopy on a melanoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet*, **96**: 17-22.
- Fournier R.E. und Ruddle F.H. (1977) Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster, and human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**: 319-323.
- Furuta K., Chan E.K.L., Kiyosawa K., Reimer G., Luderschmidt C. und Tan E.M. (1997) Heterochromatin protein HP1Hsbeta (p25beta) and its localization with centromeres in mitosis. *Chromosoma*, **106**: 11-19.
- Gorbsky G.J., Chen R.H. und Murray A.W. (1998) Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J Cell Biol*, **141**: 1193-1205.

- Goss S.J. und Harris H. (1977) Gene transfer by means of cell fusion. II. The mapping of 8 loci on human chromosome 1 by statistical analysis of gene assortment in somatic cell hybrids. *J Cell Sci*, **25**: 39-57.
- Gottschling D.E. und Zakian V.A. (1986) Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell*, **47**: 195-205.
- Grady D.L., Ratliff R.L., Robinson D.L., McCanlies E.C., Meyne J. und Moyzis R.K. (1992) Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 1695-1699.
- Green E.D., Idol J.R., Mohr-Tidwell R.M., Braden V.V., Peluso D.C., Fulton R.S., Massa H.F., Magness C.L., Wilson A.M., Kimura J. et al. (1994) Integration of physical, genetic and cytogenetic maps of human chromosome 7: isolation and analysis of yeast artificial chromosome clones for 117 mapped genetic markers. *Hum Mol Genet*, **3**: 489-501.
- Green E.D. und Olson M.V. (1990a) Chromosomal region of the cystic fibrosis gene in yeast artificial chromosomes: a model for human genome mapping. *Science*, **250**: 94-98.
- Green E.D. und Olson M.V. (1990b) Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 1213-1217.
- Green E.D., Riethman H.C., Dutchik J.E. und Olson M.V. (1991) Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones. *Genomics*, **11**: 658-669.
- Greenberg R.A., Allsopp R.C., Chin L., Morin G.B. und DePinho R.A. (1998) Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*, **16**: 1723-1730.
- Greider C.W. (1998) Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Curr Biol*, **8**: R178-181.
- Greig G.M. und Willard H.F. (1992) Beta satellite DNA: characterization and localization of two subfamilies from the distal and proximal short arms of the human acrocentric chromosomes. *Genomics*, **12**: 573-580.
- Griffith J., Bianchi A. und de Lange T. (1998) TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J Mol Biol*, **278**: 79-88.
- Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H. und de Lange T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **97**: 503-514.
- Gruss P. und Sauer G. (1975) Repetitive primate DNA containing the recognition sequences for two restriction endonucleases which generate cohesive ends. *FEBS Lett*, **60**: 85-88.
- Guiducci C., Ascenzioni F., Auriche C., Piccolella E., Guerrini A.M. und Donini P. (1999) Use of a human minichromosome as a cloning and expression vector for mammalian cells. *Hum Mol Genet*, **8**: 1417-1424.
- Gyapay G., Schmitt K., Fizames C., Jones H., Vega-Czarny N., Spillett D., Muselet D., Prud'Homme J.F., Dib C., Auffray C., Morissette J., Weissenbach J. und Goodfellow P.N. (1996) A radiation hybrid map of the human genome. *Hum Mol Genet*, **5**: 339-346.
- Haaf T., Warburton P.E. und Willard H.F. (1992) Integration of human alpha-satellite DNA into simian chromosomes: centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation. *Cell*, **70**: 681-696.
- Haaf T. und Ward D.C. (1994) Structural analysis of alpha-satellite DNA and centromere proteins using extended chromatin and chromosomes. *Hum Mol Genet*, **3**: 697-709.

- Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., Beijersbergen R.L., Brooks M.W. und Weinberg R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**: 464-468.
- Hames B.D. und Higgins S.J. (1985) Nucleic acid hybridisation: A practical approach. *IRL Press Ltd.*, Oxford.
- Hand R. und Gautschi J.R. (1979) Replication of mammalian DNA in vitro. Evidence for initiation from fiber autoradiography. *J Cell Biol*, **82**: 485-493.
- Hanish J.P., Yanowitz J.L. und de Lange T. (1994) Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 8861-8865.
- Hansen S. (1975) A case of centric fission in man. *Humangenetik*, **26**: 257-259.
- Harley C.B., Futcher A.B. und Greider C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**: 458-460.
- Harrington J.J., Van Bokkelen G., Mays R.W., Gustashaw K. und Willard H.F. (1997a) Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet*, **15**: 345-355.
- Harrington L., Zhou W., McPhail T., Oulton R., Yeung D.S., Mar V., Bass M.B. und Robinson M.O. (1997b) Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev*, **11**: 3109-3115.
- Hastie N.D., Dempster M., Dunlop M.G., Thompson A.M., Green D.K. und Allshire R.C. (1990) Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, **346**: 866-868.
- Hasty P., Crist M., Grompe M. und Bradley A. (1994) Efficiency of insertion versus replacement vector targeting varies at different chromosomal loci. *Mol Cell Biol*, **14**: 8385-8390.
- Hasty P., Rivera-Perez J. und Bradley A. (1991a) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **11**: 5586-5591.
- Hasty P., Rivera-Perez J. und Bradley A. (1992) The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **12**: 2464-2474.
- Hasty P., Rivera-Perez J., Chang C. und Bradley A. (1991b) Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **11**: 4509-4517.
- Hattori M., Fujiyama A., Taylor T.D., Watanabe H., Yada T., Park H.S., Toyoda A., Ishii K., Totoki Y., Choi D.K., Soeda E., Ohki M., Takagi T., Sakaki Y., Taudien S., Blechschmidt K., Polley A., Menzel U., Delabar J., Kumpf K., Lehmann R., Patterson D., Reichwald K., Rump A., Schillhabel M. und Schudy A. (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. The chromosome 21 mapping and sequencing consortium. *Nature*, **405**: 311-319.
- He D., Zeng C., Woods K., Zhong L., Turner D., Busch R.K., Brinkley B.R. und Busch H. (1998) CENP-G: a new centromeric protein that is associated with the alpha-1 satellite DNA subfamily. *Chromosoma*, **107**: 189-197.
- Heinzel S.S., Krysan P.J., Tran C.T. und Calos M.P. (1991) Autonomous DNA replication in human cells is affected by the size and the source of the DNA. *Mol Cell Biol*, **11**: 2263-2272.



- Heller R., Brown K.E., Burgtorf C. und Brown W.R. (1996) Mini-chromosomes derived from the human Y chromosome by telomere directed chromosome breakage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 7125-7130.
- Henning K.A., Moskowitz N., Ashlock M.A. und Liu P.P. (1998) Humanizing the yeast telomerase template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 5667-5671.
- Henning K.A., Novotny E.A., Compton S.T., Guan X.Y., Liu P.P. und Ashlock M.A. (1999) Human artificial chromosomes generated by modification of a yeast artificial chromosome containing both human alpha satellite and single-copy DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 592-597.
- Hernandez D., Mee P.J., Martin J.E., Tybulewicz V.L. und Fisher E.M. (1999) Transchromosomal mouse embryonic stem cell lines and chimeric mice that contain freely segregating segments of human chromosome 21. *Hum Mol Genet*, **8**: 923-933.
- Hickey E., Brandon S.E., Potter R., Stein G., Stein J. und Weber L.A. (1986a) Sequence and organization of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein. *Nucleic Acids Res*, **14**: 4127-4145.
- Hickey E., Brandon S.E., Sadis S., Smale G. und Weber L.A. (1986b) Molecular cloning of sequences encoding the human heat-shock proteins and their expression during hyperthermia. *Gene*, **43**: 147-154.
- Horvath M.P., Schweiker V.L., Bevilacqua J.M., Ruggles J.A. und Schultz S.C. (1998) Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA. *Cell*, **95**: 963-974.
- Hoskins R.A., Nelson C.R., Berman B.P., Laverty T.R., George R.A., Ciesiolka L., Naeemuddin M., Arenson A.D., Durbin J., David R.G., Tabor P.E., Bailey M.R., DeShazo D.R., Catanese J., Mammoser A., Osoegawa K., de Jong P.J., Celniker S.E., Gibbs R.A., Rubin G.M. und Scherer S.E. (2000) A BAC-based physical map of the major autosomes of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**: 2271-2274.
- Hua X.H. und Newport J. (1998) Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex and cdc6, but dependent on cdk2. *J Cell Biol*, **140**: 271-281.
- Huang C.Y., Chang C.P., Huang C.L. und Ferrell J.E., Jr. (1999) M phase phosphorylation of cytoplasmic dynein intermediate chain and p150(Glued). *J Biol Chem*, **274**: 14262-14269.
- Hudson D.F., Fowler K.J., Earle E., Saffery R., Kalitsis P., Trowell H., Hill J., Wreford N.G., de Kretser D.M., Cancilla M.R., Howman E., Hii L., Cutts S.M., Irvine D.V. und Choo K.H. (1998) Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *J Cell Biol*, **141**: 309-319.
- Hudson T.J., Stein L.D., Gerety S.S., Ma J., Castle A.B., Silva J., Slonim D.K., Baptista R., Kruglyak L., Xu S.H. et al. (1995) An STS-based map of the human genome. *Science*, **270**: 1945-1954.
- Huxley C. (1994) Mammalian artificial chromosomes: a new tool for gene therapy. *Gene Ther*, **1**: 7-12.
- Ikeno M., Grimes B., Okazaki T., Nakano M., Saitoh K., Hoshino H., McGill N.I., Cooke H. und Masumoto H. (1998) Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat Biotechnol*, **16**: 431-439.

- Itzhaki J.E., Barnett M.A., MacCarthy A.B., Buckle V.J., Brown W.R. und Porter A.C. (1992) Targeted breakage of a human chromosome mediated by cloned human telomeric DNA. *Nat Genet*, **2**: 283-287.
- Jabs E.W., Goble C.A. und Cutting G.R. (1989) Macromolecular organization of human centromeric regions reveals high- frequency, polymorphic macro DNA repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 202-206.
- Jackson M.S., Mole S.E. und Ponder B.A. (1992) Characterisation of a boundary between satellite III and alphoid sequences on human chromosome 10. *Nucleic Acids Res*, **20**: 4781-4787.
- Jackson M.S., Rocchi M., Thompson G., Hearn T., Crosier M., Guy J., Kirk D., Mulligan L., Ricco A., Piccininni S., Marzella R., Viggiano L. und Archidiacono N. (1999) Sequences flanking the centromere of human chromosome 10 are a complex patchwork of arm-specific sequences, stable duplications and unstable sequences with homologies to telomeric and other centromeric locations. *Hum Mol Genet*, **8**: 205-215.
- Jackson M.S., Slijepcevic P. und Ponder B.A. (1993) The organisation of repetitive sequences in the pericentromeric region of human chromosome 10. *Nucleic Acids Res*, **21**: 5865-5874.
- Jeppesen P. und Turner B.M. (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, **74**: 281-289.
- Jin D.Y., Spencer F. und Jeang K.T. (1998) Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell*, **93**: 81-91.
- Jorgensen A.L., Bostock C.J. und Bak A.L. (1986) Chromosome-specific subfamilies within human alphoid repetitive DNA. *J Mol Biol*, **187**: 185-196.
- Jorgensen P.M., Brundell E., Starborg M. und Hoog C. (1998) A subunit of the anaphase-promoting complex is a centromere-associated protein in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **18**: 468-476.
- Kallio M., Weinstein J., Daum J.R., Burke D.J. und Gorbsky G.J. (1998) Mammalian p55CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex, and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events. *J Cell Biol*, **141**: 1393-1406.
- Kapoor M., Montes de Oca Luna R., Liu G., Lozano G., Cummings C., Mancini M., Ouspenski I., Brinkley B.R. und May G.S. (1998) The cenpB gene is not essential in mice. *Chromosoma*, **107**: 570-576.
- Karlseder J., Broccoli D., Dai Y., Hardy S. und de Lange T. (1999) p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*, **283**: 1321-1325.
- Karpen G.H. und Allshire R.C. (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet*, **13**: 489-496.
- Kelly R.E., DeRose M.L., Draper B.W. und Wahl G.M. (1995) Identification of an origin of bidirectional DNA replication in the ubiquitously expressed mammalian CAD gene. *Mol Cell Biol*, **15**: 4136-4148.
- Kersting M. (1997) Charakterisierung zentromernaher DNA-Abschnitte auf Chromosom 7 des Menschen. Diplomarbeit, *Philipps-Universität Marburg*, Marburg.

- Kim I.G., Jun D.Y., Sohn U. und Kim Y.H. (1997) Cloning and expression of human mitotic centromere-associated kinesin gene. *Biochim Biophys Acta*, **1359**: 181-186.
- Kim S.H., Kaminker P. und Campisi J. (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet*, **23**: 405-412.
- Kipling D. und Warburton P.E. (1997) Centromeres, CENP-B and Tigger too. *Trends Genet*, **13**: 141-145.
- Klebe R.J., Chen T. und Ruddle R.H. (1970) Mapping of a human genetic regulator element by somatic cell genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **66**: 1220-1227.
- Klein F., Laroche T., Cardenas M.E., Hofmann J.F., Schweizer D. und Gasser S.M. (1992) Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J Cell Biol*, **117**: 935-948.
- Kobayashi T., Rein T. und DePamphilis M.L. (1998) Identification of primary initiation sites for DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene initiation zone. *Mol Cell Biol*, **18**: 3266-3277.
- Koch J. (2000) Neocentromeres and alpha satellite: a proposed structural code for functional human centromere DNA. *Hum Mol Genet*, **9**: 149-154.
- Koslowicz A., Bauer C., Ames M. und Godfrey J. (1999) The sequence of Homo sapiens BAC clone CTA-363M4; Acc. No.: AC006388.
- Krebs I. (1994) Restriktionskartierung im Chromosomenabschnitt 7q1 des Menschen. Diplomarbeit, *Philipps-Universität Marburg*, Marburg.
- Kumagai H., Sato N., Yamada M., Mahony D., Seghezzi W., Lees E., Arai K. und Masai H. (1999) A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **19**: 5083-5095.
- Kunz J., Scherer S.W., Klawitz I., Soder S., Du Y.Z., Speich N., Kalff-Suske M., Heng H.H., Tsui L.C. und Grzeschik K.H. (1994) Regional localization of 725 human chromosome 7-specific yeast artificial chromosome clones. *Genomics*, **22**: 439-448.
- Kuroiwa Y., Shinohara T., Notsu T., Tomizuka K., Yoshida H., Takeda S., Oshimura M. und Ishida I. (1998) Efficient modification of a human chromosome by telomere-directed truncation in high homologous recombination-proficient chicken DT40 cells. *Nucleic Acids Res*, **26**: 3447-3448.
- Kuroiwa Y., Tomizuka K., Shinohara T., Kazuki Y., Yoshida H., Ohguma A., Yamamoto T., Tanaka S., Oshimura M. und Ishida I. (2000) Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase- sized chromosome inserts. *Nat Biotechnol*, **18**: 1086-1090.
- Kyrion G., Boakye K.A. und Lustig A.J. (1992) C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **12**: 5159-5173.
- LaBranche H., Dupuis S., Ben-David Y., Bani M.R., Wellinger R.J. und Chabot B. (1998) Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat Genet*, **19**: 199-202.

- Landis G., Kelley R., Spradling A.C. und Tower J. (1997) The k43 gene, required for chorion gene amplification and diploid cell chromosome replication, encodes the Drosophila homolog of yeast origin recognition complex subunit 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 3888-3892.
- Larin Z., Fricker M.D. und Tyler-Smith C. (1994) De novo formation of several features of a centromere following introduction of a Y alphoid YAC into mammalian cells. *Hum Mol Genet*, **3**: 689-695.
- Larin Z., Taylor S.S. und Tyler-Smith C. (1996) A method for linking yeast artificial chromosomes. *Nucleic Acids Res*, **24**: 4192-4196.
- Larionov V., Kouprina N., Graves J., Chen X.N., Korenberg J.R. und Resnick M.A. (1996) Specific cloning of human DNA as yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 491-496.
- Larionov V., Kouprina N., Nikolaishvili N. und Resnick M.A. (1994) Recombination during transformation as a source of chimeric mammalian artificial chromosomes in yeast (YACs). *Nucleic Acids Res*, **22**: 4154-4162.
- Lee C., Li X., Jabs E.W., Court D. und Lin C.C. (1995) Human gamma X satellite DNA: an X chromosome specific centromeric DNA sequence. *Chromosoma*, **104**: 103-112.
- Lee C., Wevrick R., Fisher R.B., Ferguson-Smith M.A. und Lin C.C. (1997) Human centromeric DNAs. *Hum Genet*, **100**: 291-304.
- Lendvay T.S., Morris D.K., Sah J., Balasubramanian B. und Lundblad V. (1996) Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics*, **144**: 1399-1412.
- Lengauer C., Green E.D. und Cremer T. (1992) Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics*, **13**: 826-828.
- Levis R.W., Ganesan R., Houtchens K., Tolar L.A. und Sheen F.M. (1993) Transposons in place of telomeric repeats at a Drosophila telomere. *Cell*, **75**: 1083-1093.
- Li B., Oestreich S. und de Lange T. (2000) Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell*, **101**: 471-483.
- Liao H., Winkfein R.J., Mack G., Rattner J.B. und Yen T.J. (1995) CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol*, **130**: 507-518.
- Lin C.C., Sasi R., Lee C., Fan Y.S. und Court D. (1993) Isolation and identification of a novel tandemly repeated DNA sequence in the centromeric region of human chromosome 8. *Chromosoma*, **102**: 333-339.
- Lin J.J. und Zakian V.A. (1996) The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 13760-13765.
- Lingner J. und Cech T.R. (1996) Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 10712-10717.
- Lingner J., Cech T.R., Hughes T.R. und Lundblad V. (1997a) Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 11190-11195.

- Lingner J., Hughes T.R., Shevchenko A., Mann M., Lundblad V. und Cech T.R. (1997b) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, **276**: 561-567.
- Little R.D., Platt T.H. und Schildkraut C.L. (1993) Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol*, **13**: 6600-6613.
- Littlefield J.W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science*, **145**: 847-853.
- Lundblad V. und Szostak J.W. (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, **57**: 633-643.
- Mackay A.M., Ainsztein A.M., Eckley D.M. und Earnshaw W.C. (1998) A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis. *J Cell Biol*, **140**: 991-1002.
- Mahtani M.M. und Willard H.F. (1998) Physical and genetic mapping of the human X chromosome centromere: repression of recombination. *Genome Res*, **8**: 100-110.
- Maio J.J. (1971) DNA strand reassociation and polyribonucleotide binding in the African green monkey, *Cercopithecus aethiops*. *J Mol Biol*, **56**: 579-595.
- Makarov V.L., Hirose Y. und Langmore J.P. (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, **88**: 657-666.
- Maney T., Hunter A.W., Wagenbach M. und Wordeman L. (1998) Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J Cell Biol*, **142**: 787-801.
- Mansour S.L., Thomas K.R. und Capecchi M.R. (1988) Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, **336**: 348-352.
- Manuelidis L. (1978) Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma*, **66**: 23-32.
- Manuelidis L. und Wu J.C. (1978) Homology between human and simian repeated DNA. *Nature*, **276**: 92-94.
- Marcand S., Wotton D., Gilson E. und Shore D. (1997) Rap1p and telomere length regulation in yeast. *Ciba Found Symp*, **211**: 76-93.
- Masumoto H., Ikeno M., Nakano M., Okazaki T., Grimes B., Cooke H. und Suzuki N. (1998) Assay of centromere function using a human artificial chromosome. *Chromosoma*, **107**: 406-416.
- Masumoto H., Masukata H., Muro Y., Nozaki N. und Okazaki T. (1989a) A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol*, **109**: 1963-1973.
- Masumoto H., Sugimoto K. und Okazaki T. (1989b) Alphoid satellite DNA is tightly associated with centromere antigens in human chromosomes throughout the cell cycle. *Exp Cell Res*, **181**: 181-196.
- McClintock B. (1941) The stability of broken ends in *Zea mays*. *Genetics*, **26**: 234-282.
- McClintock B. (1942) The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **28**: 458-463.

- McElligott R. und Wellinger R.J. (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *Embo J*, **16**: 3705-3714.
- Melcher M., Schmid M., Aagaard L., Selenko P., Laible G. und Jenuwein T. (2000) Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol*, **20**: 3728-3741.
- Meneveri R., Agresti A., Della Valle G., Talarico D., Siccardi A.G. und Ginelli E. (1985) Identification of a human clustered G + C-rich DNA family of repeats (Sau3A family). *J Mol Biol*, **186**: 483-489.
- Meneveri R., Agresti A., Marozzi A., Saccone S., Rocchi M., Archidiacono N., Corneo G., Della Valle G. und Ginelli E. (1993) Molecular organization and chromosomal location of human GC-rich heterochromatic blocks. *Gene*, **123**: 227-234.
- Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P., Caddle S.D., Ziaugra L., Beijersbergen R.L., Davidoff M.J., Liu Q., Bacchetti S., Haber D.A. und Weinberg R.A. (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, **90**: 785-795.
- Meyne J., Ratliff R.L. und Moyzis R.K. (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 7049-7053.
- Mills W., Critcher R., Lee C. und Farr C.J. (1999) Generation of an approximately 2.4 Mb human X centromere-based minichromosome by targeted telomere-associated chromosome fragmentation in DT40. *Hum Mol Genet*, **8**: 751-761.
- Monaco A.P. und Larin Z. (1994) YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol*, **12**: 280-286.
- Morin G.B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, **59**: 521-529.
- Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L. und Wu J.R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 6622-6626.
- Muller H.J. (1938) The remacking of chromosomes. *The Collecting Net-Woods Hole*, **13**: 181-195.
- Murken J. und Cleve H. (1988) Humangenetik. *Enke*, Stuttgart.
- Murphy T.D. und Karpen G.H. (1995a) Interactions between the nod<sup>+</sup> kinesin-like gene and extracentromeric sequences are required for transmission of a Drosophila minichromosome. *Cell*, **81**: 139-148.
- Murphy T.D. und Karpen G.H. (1995b) Localization of centromere function in a Drosophila minichromosome. *Cell*, **82**: 599-609.
- Murphy T.D. und Karpen G.H. (1998) Centromeres take flight: alpha satellite and the quest for the human centromere. *Cell*, **93**: 317-320.
- Murray A.W., Schultes N.P. und Szostak J.W. (1986) Chromosome length controls mitotic chromosome segregation in yeast. *Cell*, **45**: 529-536.
- Murray A.W. und Szostak J.W. (1983) Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature*, **305**: 189-193.

- Myers E.W., Sutton G.G., Delcher A.L., Dew I.M., Fasulo D.P., Flanigan M.J., Kravitz S.A., Mobarry C.M., Reinert K.H., Remington K.A., Anson E.L., Bolanos R.A., Chou H.H., Jordan C.M., Halpern A.L., Lonardi S., Beasley E.M., Brandon R.C., Chen L., Dunn P.J., Lai Z., Liang Y., Nusskern D.R., Zhan M., Zhang Q., Zheng X., Rubin G.M., Adams M.D. und Venter J.C. (2000) A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science*, **287**: 2196-2204.
- Nagaraja R., MacMillan S., Kere J., Jones C., Griffin S., Schmatz M., Terrell J., Shomaker M., Jermak C., Hott C., Masisi M., Mumm S., Srivastava A., Pilia G., Featherstone T., Mazarrella R., Kesterson S., McCauley B., Railey B., Burough F., Nowotny V., D'Urso M., States D., Brownstein B. und Schlessinger D. (1997) X chromosome map at 75-kb STS resolution, revealing extremes of recombination and GC content. *Genome Res*, **7**: 210-222.
- Nakamura T.M., Morin G.B., Chapman K.B., Weinrich S.L., Andrews W.H., Lingner J., Harley C.B. und Cech T.R. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, **277**: 955-959.
- Nakayama J., Saito M., Nakamura H., Matsuura A. und Ishikawa F. (1997) TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell*, **88**: 875-884.
- Neil D.L., Villasante A., Fisher R.B., Vetrie D., Cox B. und Tyler-Smith C. (1990) Structural instability of human tandemly repeated DNA sequences cloned in yeast artificial chromosome vectors. *Nucleic Acids Res*, **18**: 1421-1428.
- Nelson D.L., Ledbetter S.A., Corbo L., Victoria M.F., Ramirez-Solis R., Webster T.D., Ledbetter D.H. und Caskey C.T. (1989) Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 6686-6690.
- Nugent C.I., Hughes T.R., Lue N.F. und Lundblad V. (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, **274**: 249-252.
- Okazaki S., Tsuchida K., Maekawa H., Ishikawa H. und Fujiwara H. (1993) Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)<sub>n</sub>, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Mol Cell Biol*, **13**: 1424-1432.
- O'Keefe R.T., Henderson S.C. und Spector D.L. (1992) Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol*, **116**: 1095-1110.
- O'Neill L.P. und Turner B.M. (1995) Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *Embo J*, **14**: 3946-3957.
- Palmer D.K., O'Day K., Wener M.H., Andrews B.S. und Margolis R.L. (1987) A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol*, **104**: 805-815.
- Peretti D., Maraschio P., Lambiase S., Lo Curto F. und Zuffardi O. (1986) Indirect immunofluorescence of inactive centromeres as indicator of centromeric function. *Hum Genet*, **73**: 12-16.

- Perez-Castro A.V., Shamanski F.L., Meneses J.J., Lovato T.L., Vogel K.G., Moyzis R.K. und Pedersen R. (1998) Centromeric protein B null mice are viable with no apparent abnormalities. *Dev Biol*, **201**: 135-143.
- Pfarr C.M., Coue M., Grissom P.M., Hays T.S., Porter M.E. und McIntosh J.R. (1990) Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature*, **345**: 263-265.
- Pluta A.F., Mackay A.M., Ainsztein A.M., Goldberg I.G. und Earnshaw W.C. (1995) The centromere: hub of chromosomal activities. *Science*, **270**: 1591-1594.
- Price C.M. (1999) Telomeres and telomerase: broad effects on cell growth. *Curr Opin Genet Dev*, **9**: 218-224.
- Price C.M. und Cech T.R. (1987) Telomeric DNA-protein interactions of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Genes Dev*, **1**: 783-793.
- Prosser J., Frommer M., Paul C. und Vincent P.C. (1986) Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol*, **187**: 145-155.
- Rattner J.B., Hendzel M.J., Furbee C.S., Muller M.T. und Bazett-Jones D.P. (1996) Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *J Cell Biol*, **134**: 1097-1107.
- Riethman H.C., Moyzis R.K., Meyne J., Burke D.T. und Olson M.V. (1989) Cloning human telomeric DNA fragments into *Saccharomyces cerevisiae* using a yeast-artificial-chromosome vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 6240-6244.
- Romanova L.Y., Deriagin G.V., Mashkova T.D., Tumeneva I.G., Mushegian A.R., Kisselev L.L. und Alexandrov I.A. (1996) Evidence for selection in evolution of alpha satellite DNA: the central role of CENP-B/pJ alpha binding region. *J Mol Biol*, **261**: 334-340.
- Rommens J.M., Zengerling S., Burns J., Melmer G., Kerem B.S., Plavsic N., Zsiga M., Kennedy D., Markiewicz D., Rozmahel R. et al. (1988) Identification and regional localization of DNA markers on chromosome 7 for the cloning of the cystic fibrosis gene. *Am J Hum Genet*, **43**: 645-663.
- Rosenberg H., Singer M. und Rosenberg M. (1978) Highly reiterated sequences of SIMIAN-SIMIAN-SIMIAN-SIMIAN-SIMIAN. *Science*, **200**: 394-402.
- Round E.K., Flowers S.K. und Richards E.J. (1997) Arabidopsis thaliana centromere regions: genetic map positions and repetitive DNA structure. *Genome Res*, **7**: 1045-1053.
- Rowles A. und Blow J.J. (1997) Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication. *Curr Opin Genet Dev*, **7**: 152-157.
- Royal A., Garapin A., Cami B., Perrin F., Mandel J.L., LeMeur M., Bregegegre F., Gannon F., LePennec J.P., Chambon P. und Kourilsky P. (1979) The ovalbumin gene region: common features in the organisation of three genes expressed in chicken oviduct under hormonal control. *Nature*, **279**: 125-132.
- Saha P., Thome K.C., Yamaguchi R., Hou Z., Weremowicz S. und Dutta A. (1998) The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45. *J Biol Chem*, **273**: 18205-18209.
- Saitoh H., Tomkiel J., Cooke C.A., Rattie H.d., Maurer M., Rothfield N.F. und Earnshaw W.C. (1992) CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell*, **70**: 115-125.
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.



- Sanchez J.A., Kim S.M. und Huberman J.A. (1998) Ribosomal DNA replication in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res*, **238**: 220-230.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**: 5463-5467.
- Sasaki T. und Fujiwara H. (2000) Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *Eur J Biochem*, **267**: 3025-3031.
- Sato N., Arai K. und Masai H. (1997) Human and *Xenopus* cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7. *Embo J*, **16**: 4340-4351.
- Saurin A.J., Shiels C., Williamson J., Satijn D.P., Otte A.P., Sheer D. und Freemont P.S. (1998) The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol*, **142**: 887-898.
- Scherer S.W., Tompkins B.J. und Tsui L.C. (1992) A human chromosome 7-specific genomic DNA library in yeast artificial chromosomes. *Mamm Genome*, **3**: 179-181.
- Shapiro P.S., Vaisberg E., Hunt A.J., Tolwinski N.S., Whalen A.M., McIntosh J.R. und Ahn N.G. (1998) Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J Cell Biol*, **142**: 1533-1545.
- Shelby R.D., Hahn K.M. und Sullivan K.F. (1996) Dynamic elastic behavior of alpha-satellite DNA domains visualized in situ in living human cells. *J Cell Biol*, **135**: 545-557.
- Shen M.H., Mee P.J., Nichols J., Yang J., Brook F., Gardner R.L., Smith A.G. und Brown W.R. (2000) A structurally defined mini-chromosome vector for the mouse germ line. *Curr Biol*, **10**: 31-34.
- Shen M.H., Yang J., Loupart M.L., Smith A. und Brown W. (1997) Human mini-chromosomes in mouse embryonal stem cells. *Hum Mol Genet*, **6**: 1375-1382.
- Shizuya H., Birren B., Kim U.J., Mancino V., Slepak T., Tachiiri Y. und Simon M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 8794-8797.
- Smith A.J., De Sousa M.A., Kwabi-Addo B., Heppell-Parton A., Impey H. und Rabbitts P. (1995) A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nat Genet*, **9**: 376-385.
- Smith S., Gariat I., Schmitt A. und de Lange T. (1998) Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science*, **282**: 1484-1487.
- Smogorzewska A., van Steensel B., Bianchi A., Oelmann S., Schaefer M.R., Schnapp G. und de Lange T. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*, **20**: 1659-1668.
- Southern P.J. und Berg P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet*, **1**: 327-341.
- Stachan T. und Read A.P. (1996) Molekulare Humangenetik. *Spektrum, Akad. Verlag*, Heidelberg ; Berlin ; Oxford.

- Starr D.A., Williams B.C., Li Z., Etemad-Moghadam B., Dawe R.K. und Goldberg M.L. (1997) Conservation of the centromere/kinetochore protein ZW10. *J Cell Biol*, **138**: 1289-1301.
- Steuer E.R., Wordeman L., Schroer T.A. und Sheetz M.P. (1990) Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. *Nature*, **345**: 266-268.
- Stillman B. (1994) Initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotes. Lessons from lambda. *J Biol Chem*, **269**: 7047-7050.
- Sugata N., Munekata E. und Todokoro K. (1999) Characterization of a novel kinetochore protein, CENP-H. *J Biol Chem*, **274**: 27343-27346.
- Sullivan B.A. und Schwartz S. (1995) Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres. *Hum Mol Genet*, **4**: 2189-2197.
- Sun X., Wahlstrom J. und Karpen G. (1997) Molecular structure of a functional Drosophila centromere. *Cell*, **91**: 1007-1019.
- Tasheva E.S. und Roufa D.J. (1994) A mammalian origin of bidirectional DNA replication within the Chinese hamster RPS14 locus. *Mol Cell Biol*, **14**: 5628-5635.
- Taylor S.S., Ha E. und McKeon F. (1998) The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol*, **142**: 1-11.
- Taylor S.S. und McKeon F. (1997) Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, **89**: 727-735.
- Ten Hagen K.G., Gilbert D.M., Willard H.F. und Cohen S.N. (1990) Replication timing of DNA sequences associated with human centromeres and telomeres. *Mol Cell Biol*, **10**: 6348-6355.
- Thomas K.R., Folger K.R. und Capecchi M.R. (1986) High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, **44**: 419-428.
- Toledo F., Baron B., Fernandez M.A., Lachages A.M., Mayau V., Buttin G. und Debatisse M. (1998) oriGNAI3: a narrow zone of preferential replication initiation in mammalian cells identified by 2D gel and competitive PCR replicon mapping techniques. *Nucleic Acids Res*, **26**: 2313-2321.
- Tomizuka K., Shinohara T., Yoshida H., Uejima H., Ohguma A., Tanaka S., Sato K., Oshimura M. und Ishida I. (2000) Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 722-727.
- Tomizuka K., Yoshida H., Uejima H., Kugoh H., Sato K., Ohguma A., Hayasaka M., Hanaoka K., Oshimura M. und Ishida I. (1997) Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nat Genet*, **16**: 133-143.
- Traut W. (1991) Chromosomen: klassische und molekulare Cytogenetik. *Springer*, Berlin ; Heidelberg ; New York ; London ; Paris ; Tokyo ; Hong Kong ; Barcelona ; Budapest.
- Trowell H.E., Nagy A., Vissel B. und Choo K.H. (1993) Long-range analyses of the centromeric regions of human chromosomes 13, 14 and 21: identification of a narrow domain containing two key centromeric DNA elements. *Hum Mol Genet*, **2**: 1639-1649.

- Tybulewicz V.L., Crawford C.E., Jackson P.K., Bronson R.T. und Mulligan R.C. (1991) Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*, **65**: 1153-1163.
- Tyler-Smith C. und Brown W.R. (1987) Structure of the major block of alphoid satellite DNA on the human Y chromosome. *J Mol Biol*, **195**: 457-470.
- Tyler-Smith C., Gimelli G., Giglio S., Florida G., Pandya A., Terzoli G., Warburton P.E., Earnshaw W.C. und Zuffardi O. (1999) Transmission of a fully functional human neocentromere through three generations. *Am J Hum Genet*, **64**: 1440-1444.
- Vafa O. und Sullivan K.F. (1997) Chromatin containing CENP-A and alpha-satellite DNA is a major component of the inner kinetochore plate. *Curr Biol*, **7**: 897-900.
- van Deursen J., Fornerod M., Van Rees B. und Grosveld G. (1995) Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 7376-7380.
- van Steensel B. und de Lange T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, **385**: 740-743.
- van Steensel B., Smogorzewska A. und de Lange T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, **92**: 401-413.
- Velasco E., de la Puente A., Cruces J., Valero M.C., Garcia-Patino E., del Castillo I., Coloma A., Moreno F. und Hernandez-Chico C. (1994) Dinucleotide repeat polymorphisms at the D5S1356, D5S1357 and D7S1480 loci. *Hum Mol Genet*, **3**: 1441.
- Virta-Pearlman V., Morris D.K. und Lundblad V. (1996) Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev*, **10**: 3094-3104.
- Vissel B., Nagy A. und Choo K.H. (1992) A satellite III sequence shared by human chromosomes 13, 14, and 21 that is contiguous with alpha satellite DNA. *Cytogenet Cell Genet*, **61**: 81-86.
- Vortkamp A., Thias U., Gessler M., Rosenkranz W., Kroisel P.M., Tommerup N., Kruger G., Gotz J., Pelz L. und Grzeschik K.H. (1991) A somatic cell hybrid panel and DNA probes for physical mapping of human chromosome 7p. *Genomics*, **11**: 737-743.
- Vos J.M. (1998) Mammalian artificial chromosomes as tools for gene therapy. *Curr Opin Genet Dev*, **8**: 351-359.
- Voullaire L.E., Slater H.R., Petrovic V. und Choo K.H. (1993) A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? *Am J Hum Genet*, **52**: 1153-1163.
- Wada M., Little R.D., Abidi F., Porta G., Labella T., Cooper T., Della Valle G., D'Urso M. und Schlessinger D. (1990) Human Xq24-Xq28: approaches to mapping with yeast artificial chromosomes. *Am J Hum Genet*, **46**: 95-106.
- Walter M.A., Spillett D.J., Thomas P., Weissenbach J. und Goodfellow P.N. (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes. *Nat Genet*, **7**: 22-28.
- Waltz S.E., Trivedi A.A. und Leffak M. (1996) DNA replication initiates non-randomly at multiple sites near the c-myc gene in HeLa cells. *Nucleic Acids Res*, **24**: 1887-1894.
- Wang G., Horsley D., Ma A., Otte A.P., Hutchings A., Butcher G.W. und Singh P.B. (1997) M33, a mammalian homologue of Drosophila Polycomb localises to euchromatin within interphase nuclei but is enriched within the centromeric heterochromatin of metaphase chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, **78**: 50-55.

- Warburton P.E., Cooke C.A., Bourassa S., Vafa O., Sullivan B.A., Stetten G., Gimelli G., Warburton D., Tyler-Smith C., Sullivan K.F., Poirier G.G. und Earnshaw W.C. (1997) Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol*, **7**: 901-904.
- Watson J.D. und Crick F.H.C. (1953) Molecular Structure of Nucleic Acid. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, **171**: 737f.
- Waye J.S., England S.B. und Willard H.F. (1987) Genomic organization of alpha satellite DNA on human chromosome 7: evidence for two distinct alphoid domains on a single chromosome. *Mol Cell Biol*, **7**: 349-356.
- Waye J.S. und Willard H.F. (1989a) Concerted evolution of alpha satellite DNA: evidence for species specificity and a general lack of sequence conservation among alphoid sequences of higher primates. *Chromosoma*, **98**: 273-279.
- Waye J.S. und Willard H.F. (1989b) Human beta satellite DNA: genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 6250-6254.
- Weinrich S.L., Pruzan R., Ma L., Ouellette M., Tesmer V.M., Holt S.E., Bodnar A.G., Lichtsteiner S., Kim N.W., Trager J.B., Taylor R.D., Carlos R., Andrews W.H., Wright W.E., Shay J.W., Harley C.B. und Morin G.B. (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*, **17**: 498-502.
- Wevrick R. und Willard H.F. (1989) Long-range organization of tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromeres of human chromosomes: high-frequency array-length polymorphism and meiotic stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 9394-9398.
- Wevrick R. und Willard H.F. (1991) Physical map of the centromeric region of human chromosome 7: relationship between two distinct alpha satellite arrays. *Nucleic Acids Res*, **19**: 2295-2301.
- Wevrick R., Willard V.P. und Willard H.F. (1992) Structure of DNA near long tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromere of human chromosome 7. *Genomics*, **14**: 912-923.
- Wiens G.R. und Sorger P.K. (1998) Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell*, **93**: 313-316.
- Willard H.F. (1990) Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet*, **6**: 410-416.
- Willard H.F. (1996) Chromosome manipulation: a systematic approach toward understanding human chromosome structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 6847-6850.
- Willard H.F. (1998) Human artificial chromosomes coming into focus. *Nat Biotechnol*, **16**: 415-416.
- Willard H.F. und Waye J.S. (1987) Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. *J Mol Evol*, **25**: 207-214.
- Wolffe A.P. (1992) New insights into chromatin function in transcriptional control. *Faseb J*, **6**: 3354-3361.
- Wolstenholme J. (1992) An introduction to human chromosomes and their analysis. In Rooney D.E. und Czepulkowski B.H. (Hrsg.); Human Cytogenetics. *Oxford University Press*, Oxford, Vol. 1: 1-30.

- Wong A.K. und Rattner J.B. (1988) Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucleic Acids Res*, **16**: 11645-11661.
- Wood K.W., Sakowicz R., Goldstein L.S. und Cleveland D.W. (1997) CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell*, **91**: 357-366.
- Wreggett K.A., Hill F., James P.S., Hutchings A., Butcher G.W. und Singh P.B. (1994) A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet*, **66**: 99-103.
- Xiong Y. und Eickbush T.H. (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *Embo J*, **9**: 3353-3362.
- Yan Z., DeGregori J., Shohet R., Leone G., Stillman B., Nevins J.R. und Williams R.S. (1998) Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 3603-3608.
- Zhong Z., Shiue L., Kaplan S. und de Lange T. (1992) A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol Cell Biol*, **12**: 4834-4843.

## 8 Anhang

### 8.1 FASTA-Vergleich von 7c23\_sp6

7c23\_sp6\_m13.txt /rev

emhum1:hshsp27x

ID HSHSP27X standard; DNA; HUM; 2496 BP.

AC L39370; X03900;

NI g662840

DT 09-MAR-1995 (Rel. 43, Created)

DT 09-MAR-1995 (Rel. 43, Last updated, Version 1)

DE Human heat shock protein 27 (HSPB1) gene exons 1-3, complete cds.

SCORES Init1: 724 Initn: 1072 Opt: 1790

97.1% identity in 481 bp overlap

```

7c23_s                               529       519       509
                               CCCAGCACTTTGGGGGGTTGAAGCANGGAG
hshsp2 GGGCCGGGCGCAGTGGCTCATACCTACAATCCCAGCACTTTGGGGGGTTGAAGCA-GGAG
                2000       2010       2020       2030       2040

7c23_s           499       489       479       469       459       449
GAGTGCTTGAAGCCAAGAGTTNTAGACCAGCCTGGACAACATAGTAAGACTGTCTCTAAA
hshsp2 GAGTGCTTGAAGCCAAGAGTTCTAGACCAGCCTGGACAACATAGTAAGACTGTCTCTAAA
                2050       2060       2070       2080       2090       2100

7c23_s           439       429       419       409       399       389
AAATAAAAATTAGGCAGGGTGGTACTGNAACGCCTGTAGTCCCAGCTACTCANGGAGGCT
hshsp2 AAATAAAAATTAGGCAGGGTGGTACTGC-ACGCCTGTAGTCCCAGCTACTCA-GGAGGCT
                2110       2120       2130       2140       2150       2160

7c23_s           379       369       359       349       339       330
GAGGCAGGAGGATNGCTTGNGCCCAGGAGTTG-AAGGGTACAGTGAGCTAACATCGTGCC
hshsp2 GAGGCAGGAGGATCGCTTGAGCCCA-GAGTTGTGAAGGTACAGTGAGCTAACATCGTGCC
                2170       2180       2190       2200       2210       2220

7c23_s           329       319       309       299       289       279       270
ATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAACAAGATCNTGTNTCAAAACAACCAAAAGCCCAGA
hshsp2 ATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAACAAGATCCTGTCTCAAAACAACCAAAAGCCCAGA
                2230       2240       2250       2260       2270       2280

7c23_s           269       259       249       239       229       219       210
GAGAAAGAGTGAGACCCCATCTTTAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTCATGATTGCAAGGTC
hshsp2 GAGAAAGAGTGAGACCCCATCTTTAAAAG-AAAAAAAAAAAAAAAAAGGTCATGATTGCAAGGTC
                2290       2300       2310       2320       2330       2340

```

```
      209      199      189      179      169      159      150
7c23_s  ACGATTGCAATTAAAAGTGTAAAGGTGGGGAAGGAGGAGGAAATAAGAGAAGCACCTGAGG
      |||
hshsp2  ACGATTGCAATTAAAAGTGTAAAGGTGGGGAAGGAGGAGGAAATAAGAGAAGCACCTGAGG
      2350      2360      2370      2380      2390      2400
```

```
      149      139      129      119      109      99      90
7c23_s  CTTGAGTTCTCAGGAGCACCTAGGTTGGGTCCCAGGTGAAGGGGCACAGAGGTAATTGCA
      |||
hshsp2  CTTGAGTTCTCAGGAGCACCTAGGTTGGGTCCCAGGTGAAGGGGCACAGAGGTAATTGCA
      2410      2420      2430      2440      2450      2460
```

```
      89      79      69      59      49      39      30
7c23_s  CCTCAGAGCTGATGGGAGGATTACTATGTCAAAAGCTTGGCATCGGCTTCAGCACACCCC
      |||
hshsp2  CCTCAGAGCTGATGGGAGGATTACTATGTCA
      2470      2480      2490
      29      19      9
```

```
7c23_s  AAGGACACCACAGTGGACCTGGCAAGCTT
```

## 9 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main waren die Herren:

Aßmus, Greiner, Lüthi, Martiensen, Müller, Müller, Wolfart

und an der Philipps-Universität Marburg die Damen und Herren:

Amon, Aumüller, Beato, Bestgen, Braasch, Dötz, Drenckhahn, Fischer, Franke, Frustorfer, Gansauge, Golenhofen, Grzeschik, Habermehl, Ihm, Kaffarnik, Kirchner, Koecke, Koolmann, Löffler, Lührmann, Mannherz, Melsheimer, Müller, Müller, Neumann, Niessing, Petzold, Rogausch, Röhm, Schachtschabel, Schindler, Schneider, Schulz, Seifart, Siegel, Suske, Truss, Unsicker, Voigt, von Löw, Waßmut, Wesemann, Westfahl, Wiegand



## 10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. K.-H. Grzeschik danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Aufnahme in das Medizinische Zentrum für Humangenetik, die Betreuung und die Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus möchte ich ihm für die gute Zusammenarbeit und das Vertrauen in meine Arbeit danken.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und Boehringer Mannheim danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertation.

Für die gute Zusammenarbeit und die technische Unterstützung möchte ich besonders Elsa Gebrai, Dorothea Bornhold, Hartmut Engel und Knut Schwarz danken. Bei Michael Kersting bedanke ich mich für die freundschaftliche Mitarbeit und Diskussionsbereitschaft während seiner Diplomarbeit und auch danach.

Auch den anderen Mitarbeitern im EG-Labor, hier seien besonders Martha Kalf-Suske, Anja Wild, Martina Wessling, Miranda Faber, Johann Pongratz und Nicole Löwer genannt, danke ich für die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung diverser Materialien und die vielen wichtigen Tips, die zur Durchführung einer wissenschaftlichen Arbeit unabdingbar sind.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre praktische oder theoretische Unterstützung bei meiner Arbeit danken. Das sehr gute Arbeitsklima und der freundliche Umgang wird mir in ständiger Erinnerung bleiben.

Für das Korrekturlesen und die vielen Anregungen bei der Fertigstellung der schriftlichen Arbeit danke ich Sabine Adolph, Karolin Stegmann und Birgit Herber. Für die freundschaftliche Hilfe möchte ich zudem Dorothea Bornhold danken. Sie alle haben mir über manches Tief in dieser Zeit hinweg geholfen.

Vor allem bin ich jedoch Anja Wimmel dankbar, die mir seit Beginn meines Studiums nicht nur fachlich bei Seite steht, sondern im privaten Bereich durch ihre tatkräftige Unterstützung, ihre ungeheure Energie und Durchsetzungskraft im ganz besonderen Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Auch bei ihr möchte ich mich für die unzähligen Korrekturen bedanken, vor allem jedoch für die moralische Unterstützung während der letzten Phase dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich dafür, daß sie mir mein Studium ermöglicht haben. Auch danach konnte ich auf die Unterstützung meines Vaters immer zählen, wofür ich ihm besonders danken möchte.