

Aus dem Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ingo Hansmann)

Molekulare Charakterisierung der chromosomalen Bruchpunkte
einer mit chronischer lymphatischer Leukämie assoziierten
konstitutionellen Translokation $t(6;9)(p12;p24)$

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jörn Rüssel
geboren am 01.08.1979 in Wesel

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ingo Hansmann
2. Prof. Dr. Werner Schempp (Freiburg)

03.03.2009

08.09.2009

Referat und bibliographische Beschreibung

Zielsetzung: Die chronische lymphatische B-Zell-Leukämie (B-CLL) ist eine sehr häufige hämatologische Neoplasie, aber Pathogenese und genetische Einflüsse der Erkrankung konnten bis heute nicht zufriedenstellend aufgeklärt werden. Durch konventionelle Zytogenetik wurde ein Patient mit einer konstitutionellen Translokation t(6;9)(p12;p24) identifiziert, der phänotypisch durch eine klassische B-CLL auffällig geworden war. Auf der Suche nach einer mit dem Phänotyp korrelierenden Unterbrechung eines bekannten Gens sollte die vorliegende Translokation molekularzytogenetisch charakterisiert werden.

Methoden: Beide Translokationsbruchstellen wurden mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) auf Metaphasechromosomen des Patienten kartiert. Als Sonden dienten insgesamt 27 chromosomenspezifische BAC-Klone, 1 cDNA-Klon sowie 4 per *long range* PCR generierte Subfragmente der als Bruchpunkt-überspannend identifizierten Klone.

Ergebnisse: BAC-Klon *RP11-399A15* und ein 11 kb PCR-Subfragment überspannen den 6p12.1 Bruchpunkt. FISH-Analysen mit einem 12 kb *long range* PCR-Subfragment des Bruchpunkt-überspannenden Klons *RP11-147I11* sowie einer cDNA für *DMRT2* (*doublesex and mab-3 related transcription factor*) kartieren den 9p24.3 Bruchpunkt maximal 8 kb proximal von *DMRT2*, welches u. a. in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird.

Schlussfolgerungen: Datenbankanalysen der publizierten Transkripte innerhalb der chromosomalen Bruchpunktregionen legen nahe, dass es durch die Translokation nicht zu einer physikalischen Unterbrechung eines bereits bekannten Gens gekommen ist. Positionseffekte auf die Genexpression vorhandener Kandidatengene in der unmittelbaren Umgebung der Bruchstellen, v. a. *DMRT2*, können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Verfeinerung der Bruchpunktkarte auf das Basenpaarlevel, Untersuchungen der Bruchpunktregionen auf nicht-kodierende Elemente der Genexpression sowie Funktionsanalysen möglicher Kandidatengene sollten im Rahmen einer weiterführenden Charakterisierung der vorliegenden Phänotyp-Genotyp-Beziehung durchgeführt werden.

Rüssel, Jörn: Molekulare Charakterisierung der chromosomalen Bruchpunkte einer mit chronischer lymphatischer Leukämie assoziierten konstitutionellen Translokation t(6;9)(p12;p24). Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Identifizierung menschlicher Krankheitsgene	1
1.2	Fallbericht: Patient mit chronischer lymphatischer Leukämie und konstitutioneller Translokation t(6;9)(p12;p24)	2
1.2.1	Familienanamnese/Stammbaum	3
1.2.2	Chronische lymphatische B-Zell-Leukämie – Epidemiologie und molekularbiologischer Wissensstand	5
1.2.3	Putative Kandidatengene für die Translokation t(6;9)(p12;p24)	8
1.3	Zielstellung	10
2	Material und Methodik	11
2.1	Allgemeines Arbeitsmaterial	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Enzyme	12
2.1.3	Nukleinsäure-Molekulargewichtstandards	13
2.1.4	Stammlösungen, Puffer und Nährmedien	13
2.1.5	Gebrauchswaren	14
2.1.6	Geräte	15
2.1.7	Vorgefertigte Systeme (Kits)	16
2.2	Spezielles Arbeitsmaterial	16
2.2.1	Probandenmaterial	16
2.2.2	DNA- und cDNA-Klone	16
2.2.3	Vorgefertigte subtelomerische FISH-Sonden	17
2.2.4	Oligonukleotide (Primer)	17
2.3	Methodik zur <i>in-silico</i> -Analyse	18
2.3.1	Online-Datenbanken/Genom-Navigationsprogramme	18

2.3.2	Software	20
2.4	Methodik zur Isolierung spezifischer DNA-Fragmente	20
2.4.1	Bakterienkulturen	20
2.4.2	Herstellung von Stammkulturen	21
2.4.3	Präparation, Reinigung und Fällung von BAC- und Plasmid-DNA	21
2.4.4	Generierung BAC-spezifischer Subfragmente mittels <i>long range</i> PCR	21
2.4.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	23
2.4.6	Restriktionsenzymatische Spaltung	23
2.4.7	Gelelektrophoretische Auftrennung	24
2.4.8	Extraktion aus Agarosegelen	25
2.5	Methodik zur molekularen Charakterisierung spezifischer DNA-Fragmente und Bruchpunktkartierung	26
2.5.1	DNA-Größenbestimmung	26
2.5.2	Nicht-radioaktive BAC-DNA-Sequenzierung	26
2.5.3	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	27
3	Ergebnisse	34
3.1	<i>In-silico</i> -Analyse der zytogenetisch ermittelten Bruchpunktregionen	34
3.2	Molekularzytogenetische Kartierung der genomischen Bruchpunktregionen 6p12 und 9p24	34
3.2.1	FISH-Analyse des Subtelomerbereichs 9p	34
3.2.2	Molekulare Charakterisierung 6p12-/9p24-spezifischer BAC-Klone	36
3.2.3	FISH-Analysen zur Identifizierung Bruchpunkt-überspannender BAC-Klone	42
3.2.4	Feinkartierung mittels <i>long range</i> PCR generierter FISH-Sonden	47
3.2.5	Identifizierung und FISH-Kartierung eines DMRT2-spezifischen cDNA-Klons	51
3.2.6	Resultierende Klon-Contigs der eingegrenzten Kandidatenregionen	53

3.3	<i>In-silico</i> -Transkriptkarte der Kandidatenregion	54
4	Diskussion	56
4.1	Eingrenzung von Kandidatenregionen	56
4.1.1	Bedeutung einer konstitutionellen Translokation	56
4.1.2	Charakterisierung des Subtelomerbereichs 9p	57
4.1.3	Physikalische (Fein-)kartierung der Translokationsbruchpunkte	57
4.1.4	Balanciertheit der Translokation	58
4.2	Kandidatengene	59
4.2.1	JAK2/RUNX2	59
4.2.2	DMRT2	59
4.2.3	Weitere Transkripte innerhalb der Kandidatenregion 9p24.3 und die besondere Rolle der miRNAs	61
4.2.4	Positionseffekte	62
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	66
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis	70
7	Thesen	80

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
°C	Grad Celsius
AP	Alkalische Phosphatase
BAAD	<i>Biotinylated Anti-Avidin D</i>
BAC	künstliches Bakterienchromosom (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
B-CLL	chronische lymphatische B-Zell-Leukämie
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BP	Bruchpunkt(region)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CCD	<i>Charged Coupled Device</i>
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
cen	Zentromer
CGH	vergleichende Genomhybridisierung (<i>comparative genomic hybridization</i>)
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin (=Vincristin), Prednison (Polychemotherapie-Schema)
cm	Zentimeter
CML	chronische myeloische Leukämie
COT=C ₀ t	Produkt aus DNA-Konzentration und Zeit (Reassoziationskinetik)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddNTP	2'-didesoxynucleosid-5'-triphosphat
der	Derivat(chromosom)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-desoxynucleosid-5'-triphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-desoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (<i>ethylenedinitrilotetraacetic acid</i>)
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Normwert der Fallbeschleunigung = 9,80665 ms ⁻¹
Gpt/l	Gigapartikel pro Liter (=10 ⁹ l ⁻¹)
h	Stunde(n)

HCl	Chlorwasserstoff/Salzsäure
HGP	<i>Human Genome Project</i>
IgV _H	variable Immunglobulin-Schwerketten-Genregion
ISCN	Internationales System für die zytogenetische Nomenklatur des Menschen (<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>)
ish	<i>in-situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilo-Basenpaar(e)
LB	Luria-Bertani
LMP	niedriger Schmelzpunkt (<i>low melting point</i>)
LOH	Heterozygotitätsverlust (<i>loss of heterozygosity</i>)
LRPCR	<i>long range</i> (Langstrecken-) PCR
M	molar
Mb	Mega-Basenpaar(e)
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
miRNA	<i>micro</i> -Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	p-Nitrotetrazoliumblausäure
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEEO	niedrige Elektroendosmose
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	kurzer Chromosomenarm
Pa	Pascal
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pmol	picomol
ppb	Teile pro Milliarde (<i>parts per billion</i>) = 10 ⁻⁹
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RPCI	<i>Roswell Park Cancer Institute</i>
rpm	min ⁻¹ ; Drehzahl (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (<i>Resource Center and Primary Database</i>)

s	Sekunde(n)
S/m	Siemens pro Meter (elektrische Leitfähigkeit)
sp	<i>split signal</i>
SSC	<i>sodium citrate standard</i>
t	Translokation
TAR	telomerassoziierte Wiederholung (<i>telomere associated repeat</i>)
tel	Telomer
TOC	gesamter organisch gebundener Kohlenstoff (<i>total organic carbon</i>)
U	Einheiten (<i>Units</i>)
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UV	Ultraviolett(strahlung)
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Quotient aus Gewicht und Volumen (<i>weight/volume</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)

1 Einleitung

Auf der Suche nach an Krankheiten beteiligten Genen beim Menschen spielt die humangenetische Forschung eine wichtige Rolle. Insbesondere gilt dies auch für Identifizierung von Faktoren, die eine Anfälligkeit gegenüber komplexen Krankheiten verursachen, bei denen nicht nur singuläre Gene betroffen sind. Durch die Lokalisierung und Klonierung dieser Gene sind in den letzten Jahren sowohl beim Verständnis als auch in der Diagnostik, Therapieplanung und Prognoseeinschätzung von multifaktoriellen Erkrankungen mit genetischem Einfluss erhebliche Fortschritte erzielt worden. Ein Beispiel ist der auf Chromosom 17q21 kartierte Locus BRCA1 (*breast cancer 1 gene*) in Familien mit gehäuftem Auftreten von Mammakarzinomen (Hall et al. 1990). Auch wenn dessen Entdeckung die Pathogenese der Erkrankung nicht erklärt, kann er als wichtiger Marker die Frühdiagnostik in betroffenen Familien verbessern.

Die großen Bemühungen des *Human Genome Project* (HGP) hatten u. a. eine physikalische Karte mit der nahezu vollständigen Sequenz des menschlichen Genoms (International Human Genome Sequencing Consortium 2001; 2004) sowie die Integration zytogenetischer, Kopplungs-, Strahlungshybrid- und Sequenzmarker des menschlichen Genoms (Cheung et al. 2001) zum Ergebnis. Auf dieser Grundlage gestaltete sich fortan die chromosomale Kartierung von (Krankheits-)Genen wesentlich effektiver und effizienter (Collins und McKusick 2001).

1.1 Identifizierung menschlicher Krankheitsgene

Die Anzahl bekannter proteincodierender Gene innerhalb der menschlichen Genomsequenz wird in aktuellen Sequenzdatenbanken (basierend auf *NCBI Build 36 Assembly*, November 2005) mit 20 067 angegeben und liegt damit um ein Vielfaches unter den ursprünglichen Schätzungen (Liang et al. 2000). Viele dieser Gene bzw. Transkripte wurden durch Computeranalysen (*in-silico*) vorhergesagt (Zhang 2002) und bislang nur unzureichend oder gar nicht experimentell bearbeitet. Auf den vorhandenen Ressourcen aufbauend, konnte die medizinische Forschung in den letzten Jahren immer mehr Krankheitsgene mittels Positionsklonierung identifizieren. Diese Eingrenzung von Kandidatengen innerhalb einer definierten chromosomalen Region hat heutzutage positionsunabhängige Vorgehensweisen wie die Funktionsklonierung an Bedeutung übertroffen (Collins 1992). Eine Alternative zu aufwendigen Kopplungsanalysen anhand von

Familien, in denen eine bestimmte Krankheit segregiert, ist das Ausnutzen von Chromosomenanomalien. Die zytogenetische Charakterisierung von krankheitsassoziierten balancierten Chromosomenaberrationen wie Translokationen und Inversionen ist ein Erfolg versprechendes Instrument bei der Identifizierung beteiligter Gene (Bugge et al. 2000, Stankiewicz und Lupski 2002, Abeysinghe et al. 2004). Einige Krankheitsgene wie der AN2-Locus bei der familiären Aniridie (Gessler et al. 1989) oder das Sonic-Hedgehog-Gen bei der Holoprosenzephalie (Belloni et al. 1996) konnten auf diese Weise entdeckt werden. Die Entwicklung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) hat die zytogenetische Kartierung von chromosomalen Bruchstellen in puncto Empfindlichkeit und Auflösung optimiert (Trask 1991, van Ommen et al. 1995). Durch die Sequenzierungsprojekte des HGP steht mittlerweile ein umfangreiches Contig von überlappenden, kartierten und sequenzierten (BAC)-Klonen mit großen Inserts zur Verfügung, die bei der FISH eingesetzt eine hochauflösende Analyse chromosomaler Rearrangements ermöglichen. Auf diese Weise konnte z. B. eine Haploinsuffizienz des NSD1-Gens als Hauptursache des Sotos-Syndroms identifiziert werden (Kurotaki et al. 2002).

1.2 Fallbericht: Patient mit chronischer lymphatischer Leukämie und konstitutioneller Translokation t(6;9)(p12;p24)

Im Sommer 2005 wurde in der Genetischen Beratungsstelle des Instituts für Humangenetik und Medizinische Biologie an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg ein damals 71-jähriger Patient vorgestellt. Bei diesem war im Februar 2003 eine chronische lymphatische B-Zell-Leukämie (B-CLL) im Stadium C nach Binet (Binet et al. 1981) mit einer Thrombozytopenie < 100 Gpt/l, generalisierten Lymphknotenvergrößerungen und einer nodulären lymphozytischen Knochenmarksinfiltration von 80 – 90 % diagnostiziert worden. Nach einer Monochemotherapie mit 6 Zyklen Chlorambucil von Februar bis September 2003 und einer aufgrund der ungenügenden Remissionstendenz („minimal response“) darauf folgenden Kombinationschemotherapie mit 4 Zyklen nach dem CHOP-Schema von Mai bis Juli 2004 (Abbruch wegen Arzneimittelpneumonitis) wurde bei partieller Remission der Krankheit (noduläre Restinfiltration des Knochenmarks) im März 2005 eine zytogenetische Untersuchung zur Prognoseeinschätzung (→1.2.2) am Institut für Zell- und Molekularpatho-

logie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Interphasezytogenetische FISH-Analysen mit Locus-spezifischen Sonden konnten die für eine B-CLL charakteristischen Deletionen in 11q22–q23 und 13q14 nicht nachweisen. Zwei weitere charakteristische Anomalien (Deletion/Mutation von p53 auf 17p13 und Trisomie 12) konnten aufgrund geringer Hybridisierungseffizienz nicht ausgeschlossen werden (schriftliche Befundmitteilung durch die Direktorin des Institutes, Frau Prof. Dr. med. Schlegelberger). Die konventionelle Zytogenetik zeigte jedoch einen balancierten Austausch genetischen Materials zwischen den kurzen Armen der Chromosomen 6 und 9 in allen untersuchten Metaphasen, sowohl im Knochenmark als auch in den stimulierten Lymphozytenkulturen. Somit ergab sich die Diagnose eines konstitutionellen ISCN-Karyotyps 46,XY,t(6;9)(p12;p24). Diese Chromosomenaberration ist in der Literatur bislang nicht beschrieben, eine Aussage über eine die Prognose betreffende Wertigkeit daher nicht möglich.

1.2.1 Familienanamnese/Stammbaum

Träger balancierter konstitutioneller Translokationen haben bei der meiotischen Teilung im Rahmen der Gametogenese ein erhöhtes Risiko, Keimzellen mit unbalancierten Karyotypen hervorzubringen (Clifford et al. 1994). Aufgrund der resultierenden partiellen Mono- bzw. Trisomien des diploiden Chromosomensatzes können eine erhöhte Inzidenz von Frühaborten, aber auch Neugeborene mit anomalen Phänotypen differenten Ausmaßes die Folge sein. Darüber hinaus können die Nachkommen natürlich auch wieder Träger der balancierten Translokation sein und wären damit einem gegenüber Menschen mit normalem Karyotyp etwa doppelt so hohen Risiko für die Entwicklung kongenitaler Anomalien ausgesetzt (Warburton 1991). Somit war eine weitergehende Analyse des Segregationsmusters der vorliegenden Translokation begleitend zur humangenetischen Beratung bei dem hier vorgestellten Patienten indiziert. Eine klinische Untersuchung durch eine Fachärztin für Humangenetik ergab keine zusätzlichen phänotypischen Auffälligkeiten. Die erneute Chromosomenanalyse aus peripheren Lymphozytenkulturen am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie konnte die Diagnose einer konstitutionellen Translokation t(6;9)(p12;p24) in sämtlichen untersuchten Metaphasen bestätigen (Abb. 1, 2).

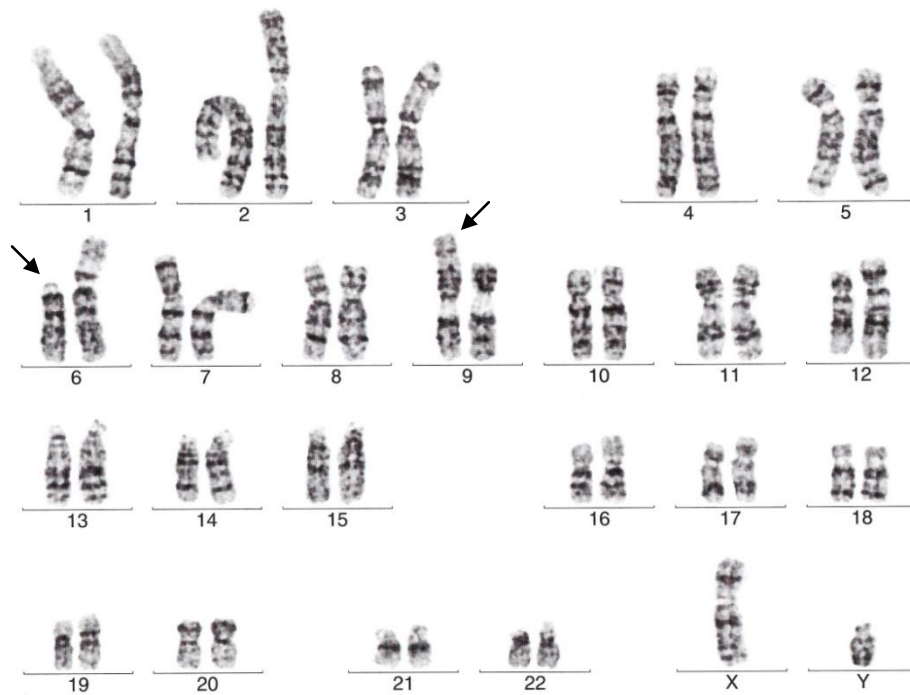


Abb. 1: Karyogramm des Patienten mit konstitutioneller Translokation $t(6;9)(p12;p24)$.

G-Bänderung auf 550-Banden-Niveau (vgl. ISCN 1995). Schwarze Pfeile zeigen auf die derivativen Chromosomen 6 und 9.

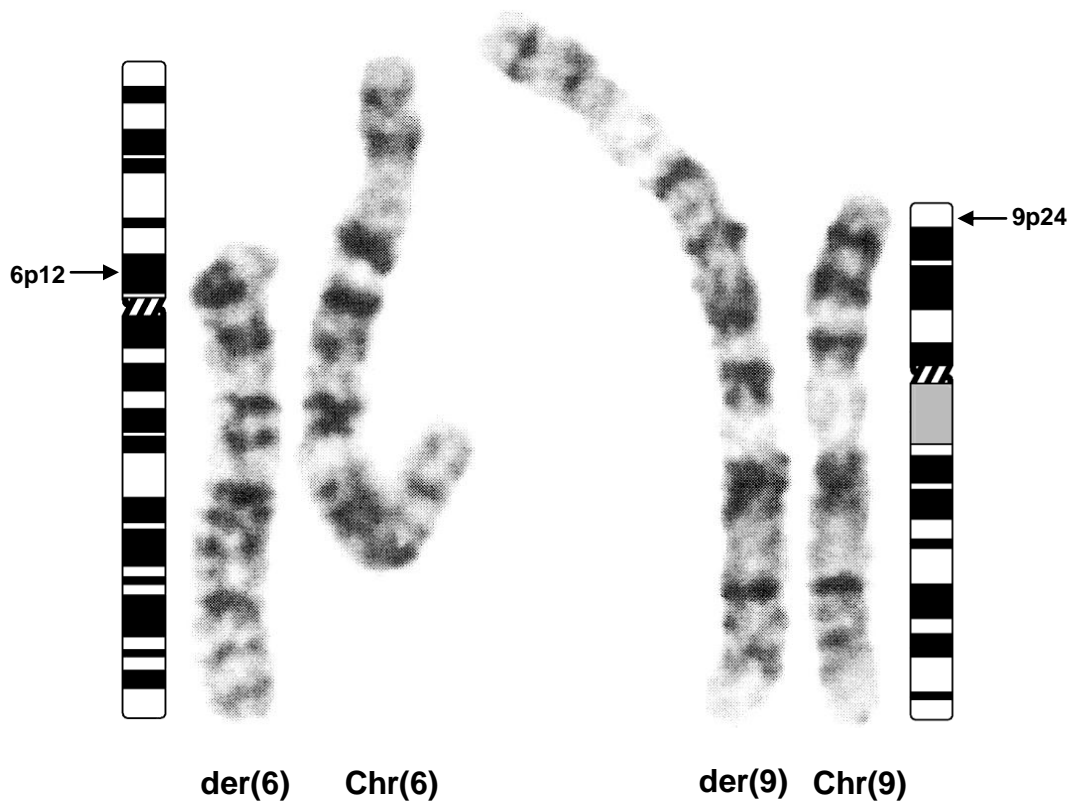


Abb. 2: Darstellung der an der Translokation beteiligten Chromosomen.

Die Bruchpunktregionen sind auf den nebenstehenden Ideogrammen durch Pfeile markiert. Chr=normales Chromosom; der=derivatives Chromosom.

Als Ergebnis einer ausführlichen Familienanamnese wurde der in Abb. 3 gezeigte Stammbaum konstruiert. Über eine eventuelle familiäre Segregation der Translokation kann keine Aussage getroffen werden, da der Patient die Untersuchung weiterer Familienangehöriger ablehnt. Tochter und Enkelin scheinen einen familienanamnestisch unauffälligen Phänotyp aufzuweisen.

Der Patient war nach ausführlicher Aufklärung durch eine Fachärztin für Humangenetik bereit, sein Blut für diese experimentelle Arbeit zur Verfügung zu stellen.

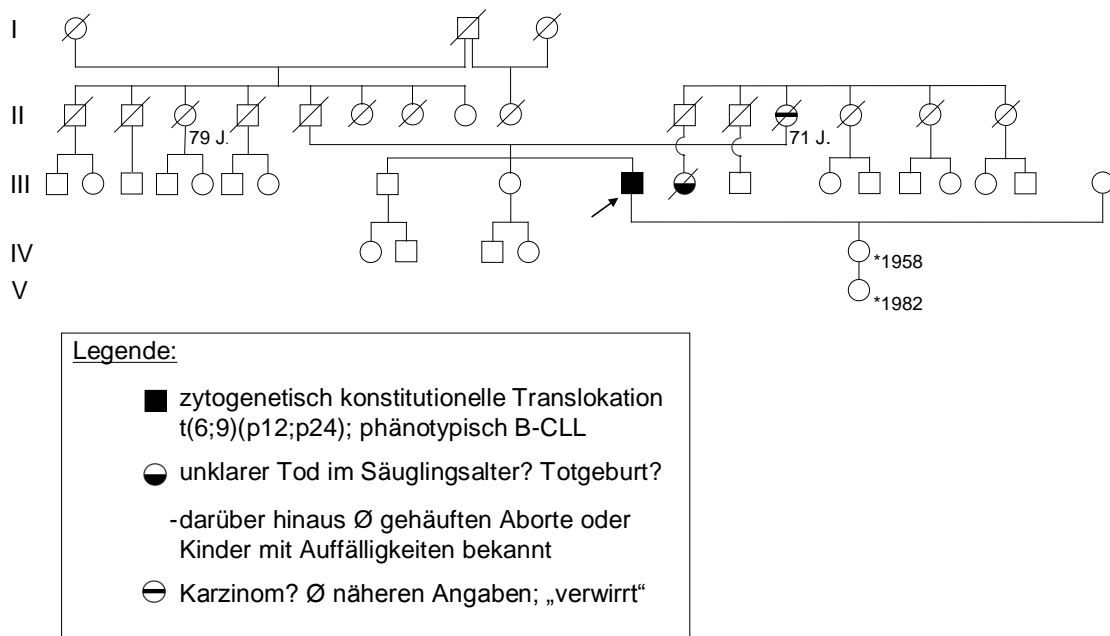


Abb. 3: Stammbaum der Familie des zur genetischen Beratung vorstellig gewordenen Patienten III-10 (Pfeil) mit B-CLL und konstitutionellem Karyotyp 46,XY,t(6;9)(p12;p24).

1.2.2 Chronische lymphatische B-Zell-Leukämie – Epidemiologie und molekularbiologischer Wissensstand

Die chronische lymphatische B-Zell-Leukämie ist in der aktuellen WHO-Klassifikation als reifzellige (periphere) B-Zell-Neoplasie eingeordnet (Harris et al. 1999) und lässt sich immunphänotypisch von den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen mit leukämischer Ausschwemmung abgrenzen (Matutes et al. 1994). Epidemiologisch betrach-

tet ist die B-CLL von allen bislang beschriebenen Entitäten die häufigste Leukämie der Erwachsenen in der westlichen Welt (Wiley et al. 2002) mit einem medianen Erkrankungsalter von 65 Jahren. Aktuelle Daten sehen die Inzidenzrate in den USA bei 5,17 pro 100 000 Personenjahre (Morton et al. 2006) und deutsche Krebsregister zeigen ähnlich hohe Neuerkrankungsraten auf (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2006). Studien mit einer großen Anzahl betroffener Familien legen nahe, dass die familiäre Inzidenz um das dreifache höher ist als für die Normalpopulation erwartet werden kann (Gunz et al. 1975), wenngleich ein konkreter Erbgang bislang nicht identifiziert werden konnte, was für die Komplexität dieser Erkrankung spricht. Neue Studiendaten (Casey et al. 2006) sehen eine signifikante Steigerung der B-CLL-Inzidenz in Familien mit Fällen hämatologischer Neoplasien und diskutieren einen dominanten Vererbungsmodus.

Die Pathogenese der B-CLL ist einzigartig und bislang nicht zufriedenstellend aufgeklärt. Es kommt zu einer niedrigmalignen klonalen Proliferation reif wirkender B-Lymphozyten mit gestörter Immunktion, die aufgrund einer Apoptoseresistenz in peripherem Blut, Knochenmark und lymphatischen Organen akkumulieren (Caligiaris-Cappio und Hamblin 1999). Zunehmende hämatopoetische Insuffizienz, Organomegalien und humorale Immundefizienz bestimmen demnach den äußerst heterogenen klinischen Verlauf (medianes Überleben zwischen 2–20 Jahren) und vor allem Komplikationen durch schwere Infektionen, Kachexie und Blutungen führen letztendlich zum Tod, wenn nicht krankheitsunabhängige Faktoren und Komorbidität aufgrund des hohen Alters ursächlich sind.

Die größten Fortschritte bei der Aufspürung pathogenetisch und prognostisch bedeutender genetischer Faktoren gelangen bei der B-CLL auf zytogenetischem Wege, zumal ca. 80 % der mittels interphasezytogenetischen FISH-Sonden untersuchten Fälle klonale Chromosomenanomalien aufweisen (Döhner et al. 2000). Zu den rekurrierenden Aberrationen mit gesichertem prognostischem Wert, unabhängig vom klinischen Stadium, gehören den Autoren zufolge die Deletionen 13q14, 11q22-q23 und 17p13 sowie die Trisomie 12. Ebenfalls häufig ($\geq 5\%$) sind die Deletion 6q21, die Trisomien 3q27 und 8q24 sowie Translokationen mit Beteiligung von 14q32.

Pathogenetische Bedeutung haben vor allem die Deletionen in 11q22-q23 und 17p13 durch die Eingrenzung kritischer Regionen für Kandidatengene erlangt. So konnte ATM

(*ataxia teleangiectasia mutated*) in 11q22.3 als putatives Tumorsuppressorgen identifiziert (Rotman und Shiloh 1998) und dessen Inaktivierung durch Mutation bei der chronischen lymphatischen Leukämie nachgewiesen werden (Starostik et al. 1998). Das für eine Proteinkinase codierende ATM phosphoryliert im Rahmen der Reparatur von DNA-Strangbrüchen *in vitro* auch das bei multiplen Tumoren beteiligte Tumorsuppressorgen p53 (Banin et al. 1998), welches wiederum innerhalb der Kandidatenregion 17p13 kartiert. Gaidano et al. (1991) konnten p53-Mutationen bei der B-CLL erstmals aufzeigen und in jüngster Zeit hat sich der Deletionsnachweis von p53 bei erkrankten Patienten zu einem Parameter erheblicher prognostischer und therapeutischer Relevanz entwickelt (Döhner et al. 1995; 2000).

Auf der Suche nach weiteren genetischen Parametern der B-CLL zeigte sich, dass die variable Immunglobulin-Schwerketten-Genregion (IgV_H) innerhalb der Chromosomenbande 14q32 in B-CLL-Klonen häufig durch Translokationen betroffen ist. Eine Studie wies in etwa der Hälfte der untersuchten Fälle somatisch mutierte IgV_H-Gene in Verbindung mit einem insgesamt günstigeren Krankheitsverlauf nach (Hamblin et al. 1999). Spätere Untersuchungen bestätigten für Patienten mit mutierten, von Postkeimzentrumszellen abstammenden malignen Klonen, ein unabhängig vom klinischen Stadium längeres medianes Gesamtüberleben als für Patienten mit unmutierten, aus Präkeimzentrumszellen hervorgehenden Klonen (Kröber et al. 2002). Ebenfalls auffällig war das nahezu exklusive Auftreten von prognostisch ungünstigen chromosomalen Aberrationen in der IgV_H-unmutierten Gruppe. Es stellt sich die Frage, ob hier aus pathogenetischer Sicht nicht etwa zwei unterschiedliche Krankheitsentitäten definiert werden müssen (Hamblin et al. 1999). Der unmutierte IgV_H-Status korreliert zusätzlich zum aggressiven klinischen Verlauf stark mit der Expression der *zytoplasmatischen Tyrosinkinase 70* (ZAP-70), die auch als eigenständiger Prognosemarker postuliert wird (Rassenti et al. 2004). Obgleich dieser wichtigen Entdeckungen darf jedoch letztendlich nicht vergessen werden, dass für den Großteil der bei der B-CLL häufig veränderten Chromosomenregionen noch keine Kandidatengene identifiziert wurden bzw. deren Beteiligung an der Pathogenese durch funktionelle Analysen nicht bestätigt werden konnte (Pekarsky et al. 2005).

Die B-CLL ist durch konventionelle Zytostatika-Therapien nicht heilbar, durch verbesserte Therapieoptionen wie Hochdosis-Chemotherapie, additive Immuntherapien (spezi-

fische Antikörper), autologe und allogene Stammzelltransplantation können in letzter Zeit jedoch risikoadaptierte und durchaus kurative Ansätze im Rahmen klinischer Studien angeboten werden (Wendtner et al. 2004). Im Fokus der klinisch-wissenschaftlichen Diskussion steht immer wieder die Frage nach einem optimalen, risikoadaptierten Therapieregime, vor allem in frühen Krankheitsstadien. Dazu gehört nicht nur die Bewertung von bisher bekannten Prognosefaktoren, sondern auch die Ermittlung neuer Krankheitsvariablen (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project 1993).

Die humangenetische Forschung versucht über die Identifizierung und Bestätigung von Kandidatengenen die Aufklärung der molekularen Pathogenese der B-CLL voranzutreiben. Dies kann nicht nur bei der Diagnostik und Prognoseeinschätzung, sondern auch bei der Entwicklung innovativer Therapieansätze hilfreich sein. Die vorliegende Arbeit soll dazu über die molekulargenetische Charakterisierung einer bisher unbekanntes B-CLL assoziierten Translokation einen Beitrag leisten.

1.2.3 Putative Kandidatengene für die Translokation t(6;9)(p12;p24)

Sämtliche bisher durchgeführten Kartierungsversuche zur Identifizierung neuer Kandidatengene für die B-CLL (→1.2.2) haben nicht zu Genregionen geführt, die mit den lichtmikroskopischen Bruchpunktregionen der in dieser Arbeit untersuchten Translokation t(6;9)(p12;p24) in Verbindung gebracht werden könnten. Die Bruchpunkte liegen jedoch in der kritischen Nähe zweier Gene, die in der Literatur im Zusammenhang mit der Ätiopathogenese hämatologischer Neoplasien diskutiert werden (Verma et al. 2003; Blyth et al. 2001). Dies sind zum einen JAK2 (*Janus Kinase 2*) auf Chromosom 9p24 (Kartierung: Pritchard et al. 1992) und zum anderen RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*) auf 6p21 (Kartierung: Levanon et al. 1994).

RUNX2 ist eines von bislang drei klonierten humanen Genen einer Familie mit spezifischen konservierten DNA-Bindungsdomänen („runt domains“). Im Gegensatz zu RUNX1, welches eines der am häufigsten durch Translokationsbrüche in akuten Leukämien betroffenen Gene darstellt (Zhang et al. 1997), fehlt für RUNX2 noch ein derartig begründeter Zusammenhang (Blyth et al 2005). Mundlos et al. (1997) etablierten Funktionsverlustmutationen („loss of function“) in RUNX2 als ursächlich für die Entwicklung der Kleidokranialdysplasie.

JAK2 gehört zur Familie der Rezeptor-ungebundenen Janus-Tyrosinkinasen (Wilks et al. 1991), die assoziiert mit diversen Zytokinrezeptoren und deren Liganden die Phosphorylierung von Tyrosinresten intrazellulärer Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren wie z. B. STAT (*signal transducer and activator of transcription*) regulieren und damit eine essenzielle Funktion innerhalb der Signaltransduktion lymphoider und myeloider Zellen einnehmen (Ihle 1995). Kralovics et al. (2005) identifizierten JAK2 als Kandidat für die Pathogenese klonaler myeloproliferativer Erkrankungen, indem sie das Gen bei zahlreichen Patienten über die Mikrosatellitenkartierung einer Region mit Heterozygotitätsverlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9pLOH) zuordneten. Als Ursache des 9pLOH bei diesen Patienten erwies sich eine die Tyrosinkinase aktivierende („gain of function“) V617F-Punktmutation in JAK2. Diese und einige später isolierte Mutationen (vgl. OMIM *147796) konnten bislang neben den klassischen myeloproliferativen Erkrankungen auch in akuten myeloiden Leukämien gefunden werden, jedoch nicht in akuten sowie chronischen lymphoiden Leukämien (Levine et al. 2005). Ein entscheidender Einfluss gestörter JAK2-Aktivität auf die maligne hämatologische Proliferation wurde durch die Identifizierung von bislang drei JAK2-Fusionsgenen bei Patienten mit Leukämien der myeloiden (akut und chronisch) und lymphoiden (akut) Zellreihe und assoziierten chromosomalen Translokationen unter Beteiligung von 9p24 postuliert. Dazu gehören ETV6-JAK2 (Peeters et al. 1997), BCR-JAK2 (Griesinger et al. 2005) und zuletzt PCM1-JAK2 (Reiter et al. 2005). Bisher sind diese Fusionsgene allerdings nicht bei Patienten mit B-CLL nachgewiesen worden.

Gerade deshalb stellte sich vor dem Hintergrund des vorliegenden Falles eines Patienten mit B-CLL die Frage, ob nicht durch die assoziierte Translokation t(6;9)(p12;p24) auch hier ein Fusionsgen mit Beteiligung von JAK2 entstanden ist und somit JAK2 als ebenso wichtiger Kandidat für die Pathogenese dieser hämatologisch-neoplastischen Entität hervortritt. Die therapeutischen Konsequenzen einer solchen Entdeckung wären erheblich, da sie die Basis für eine mögliche gezielte Therapie der gestörten JAK2-Signaltransduktion durch pharmazeutische Tyrosinkinasehemmung ähnlich wie bei experimentellen Ansätzen in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (Meydan et al. 1996) bilden würde. Die Entdeckung von *bcr/abl* als Fusionsprotein mit permanenter Tyrosinkinase-Aktivität und konsekutiver maligner Transformation der hämatopoetischen Stammzelle bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) zeigt exem-

plarisch, wie durch eine einzige genetische Aberration die molekularbiologische Grundlage einer hämatologischen Neoplasie geklärt werden konnte (Sawyers 1999). Mit dem Phenylaminopyrimidin „Imatinib“ lassen sich heute hohe und lang anhaltende Raten kompletter hämatologischer, zytogenetischer und sogar molekularer Remissionen bei den meisten Patienten mit *bcr/abl*-positiver CML erreichen (Goldman und Melo 2003).

1.3 Zielstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte über eine Charakterisierung der Bruchpunkte einer konstitutionellen, lichtmikroskopisch balancierten Translokation $t(6;9)(p12;p24)$ bei einem Patienten mit chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie zu einer Identifizierung putativer ätiopathogenetischer Faktoren dieser hämatologischen Neoplasie beigetragen werden. Mithilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung sollten dazu DNA-Contigs zur Generierung hochauflösender physikalischer Karten der genomischen Region um die Translokationsbruchpunkte auf den kurzen Armen der Chromosomen 6 und 9 isoliert werden. Auf dieser Grundlage sollte im weiteren Verlauf analysiert werden,

- inwiefern die genetische Umstrukturierung bei dem Patienten auf molekularer Ebene tatsächlich ohne Verlust oder Gewinn von Genmaterial (Balanciertheit) einherzugehen scheint und
- ob es durch eine oder sogar beide Chromosomenbruchstellen möglicherweise zu einer Alteration codierender Gene (Kandidatengene) wie etwa JAK2 auf 9p24 oder RUNX2 auf 6p12 gekommen ist.

2 Material und Methodik

2.1 Allgemeines Arbeitsmaterial

Es folgen zunächst Auflistungen der in dieser Arbeit verwendeten allgemeinen Labormaterialien mit Hersteller bzw. Bezugsquelle sowie eine Aufstellung und Rezeptur der eingesetzten Stammlösungen, Puffer und Nährmedien.

Hitzestabile Lösungen, Geräte und Gebrauchswaren wurden bei einer Temperatur von 120 °C und einem Umgebungsdruck von 10^5 Pa für eine Zeit von 20 min im Dampfdruck-Autoklaven sterilisiert. Temperaturempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Vakuum-Filtrationssystems (Porengröße 0,22 µm) oder Spritzenfiltern (Porengröße 0,20 µm) steril filtriert.

2.1.1 Chemikalien

Jeweils in Klammern findet sich, soweit verfügbar, die jeweilige CAS-Registrierungsnummer, der internationale Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe zur eindeutigen Identifizierung.

Agar (9002-18-0)	Fluka/Riedel-de Haën, Seelze
Agarose (9012-36-6), LMP, NEE0	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz (69-52-3)	Roche Diagnostics, Mannheim
BAAD (26628-22-8)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
BCIP Dinatriumsalz (102185-33-1)	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-16-dUTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Borsäure (10043-35-3)	Merck, Darmstadt
BSA (9048-46-8)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Chloramphenicol (56-75-7)	Fluka/Riedel-de Haën, Seelze
COT Human DNA	Roche Diagnostics, Mannheim
DAPI (28718-90-3)	Abbott Laboratories, Wiesbaden
Dextransulfat (9042-14-2)	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (3483-12-3)	Merck, Darmstadt
dNTP-Set (3624-46-2)	Roche Diagnostics, Mannheim
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (6381-92-6)	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure (64-19-7)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (64-17-5)	Carl Roth, Karlsruhe

Ethidiumbromid (1239-45-8)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fluorescein Avidin D (26628-22-8)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Formaldehyd (50-00-0)	Fluka/Riedel-de Haën, Seelze
Formamid (75-12-7)	Fluka/Riedel-de Haën, Seelze
Glycerin (56-81-5)	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt (8013-01-2)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol (67-63-0)	Fluka/Riedel-de Haën, Seelze
Lachssperm-DNA (9007-49-2)	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (7791-18-6)	Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumacetat-Trihydrat (6131-90-4)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (7647-14-5)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (1310-73-2)	Carl Roth, Karlsruhe
NBT (68-12-2)	Roche Diagnostics, Mannheim
PBS (10x Fertiglösung)	Biochrom, Berlin
Propidiumiodid (25535-16-4)	Fluka/Riedel-de Haën, Seelze
Salzsäure (7647-01-0)	Merck, Darmstadt
tri-Natriumcitrat-Dihydrat (6132-04-3)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-acetat (6850-28-8)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base (77-86-1)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Triton</i> [®] X-100 (9002-93-1)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Trypton/Pepton aus Casein (91079-40-2)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Tween</i> [®] 20 (9005-64-5)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Vectashield</i> [®] Mounting Medium H-1000	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.1.2 Enzyme

DNA-Polymerase I (9012-90-2)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I (9003-98-9)	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A (9001-99-4)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Streptavidin-AP conjugate</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Pepsin (9001-75-6)	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.3 Nukleinsäure-Molekulargewichtstandards

<i>100 bp DNA Ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>GeneRuler® 1kb DNA Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Lambda Ladder PFG Marker</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
<i>Low Range PFG Marker</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
<i>MidRange II PFG Marker</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.

2.1.4 Stammlösungen, Puffer und Nährmedien

Zur Herstellung aller wässrigen Lösungen wurde Wasser aus dem Ultrapureinstwassersystem *Milli-Q® PF Plus* der Firma Millipore (elektrische Leitfähigkeit $< 5,5 \cdot 10^{-6}$ S/m bei 25 °C und TOC-Gehalt < 10 ppb) entnommen. Einige hier nicht aufgelistete spezielle Puffer und Lösungen werden weiter unten im Rahmen der Beschreibung einzelner Methoden aufgeführt. Die Zusammensetzung vorgefertigter Puffer aus kommerziellen Kits ist, soweit vom Hersteller veröffentlicht, den jeweiligen Packungsbeilagen zu entnehmen.

Antibiotikastammlösungen (Lagerung bei -20 °C)

Ampicillin (Amp)	50 mg/ml (in H ₂ O)
Chloramphenicol (Cm)	34 mg/ml (in Ethanol)

Puffer

20 x SSC	0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat 3 M NaCl pH 7,0
1 M Tris-HCl	1 M Tris-Base variable pH-Einstellung (mit Salzsäure)
0,5 M EDTA pH 8,0	0,5 M EDTA Dinatriumsalz Dihydrat pH 8,0 (mit Natriumhydroxid)
TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0
50 x TAE	2 M Tris-acetat 50 mM EDTA pH 8,0
5 x TBE	225 mM Tris-Base 225 mM Borsäure

	10 mM EDTA pH 8,0
	pH 8,3
3 M NaAc pH 5,2	3 M Natriumacetat-Trihydrat
	pH 5,2 (mit Essigsäure)

Bakterienmedien und -nährböden

LB-Medium	1 % Trypton/Pepton aus Casein
	0,5 % Hefeextrakt
	0,5 % Natriumchlorid
	pH 7,5
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar (in LB-Medium)
	Antibiotika (je nach angestrebter Selektion)
	Amp 50 µg/ml oder Cm 30 µg/ml
LB-Agar-Platten	ca. 30 ml LB-Agar pro Petrischale
(Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C)	

2.1.5 Gebrauchswaren

Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Falcon</i> -Röhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glasküvetten	Schütt Labortechnik, Göttingen
Impfösen	
Laborgläser <i>Fisherbrand</i> [®]	Fisher Scientific, Schwerte
Messzylinder	Schott, Jena
Nylonmembranen <i>Hybond</i> [®] N+	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnbrecht
Rubber Cement <i>Fixogum</i> [®]	Marabuwerke, Tamm
Skalpelle	B. Braun Melsungen, Melsungen
Spritzenfilter (steril)	Heinemann Labortechnik, Duderstadt
Vakuum-Filtrationssystem <i>Stericup</i> [®]	Carl Roth, Karlsruhe
Verschlussfolie <i>Parafilm</i> [®] M	American National Can, Chicago, IL USA

2.1.6 Geräte

Autoklav <i>SANOclav</i>	Schütt Labortechnik, Göttingen
Blockthermostat <i>BT 100</i>	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Brutschrank <i>Heraeus B 6420</i>	Heraeus Instruments, Osterode
Bunsenbrenner <i>FIREBOY eco</i>	Heinemann Labortechnik, Duderstadt
Elektrophorese-Systeme	
Gelkammern <i>EasyCast® B2</i>	Owl Sep. Systems, Portsmouth, NH USA
Spannungsgeräte	Schütt Labortechnik, Göttingen
Feinwaage <i>Sartorius L 420 S</i>	Sartorius, Göttingen
Gel-Dokumentations-Systeme	
Enhanced Analysis System <i>E.A.S.Y.</i>	
UV-Transilluminatoren	
Heizplatte	MEDAX Nagel, Kiel
Hybridisierungsöfen <i>HERAhybrid</i>	Heraeus Instruments, Osterode
Kryostat <i>Biometra F10-C</i>	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifugen	
<i>Megafuge 1.0R</i>	Heraeus Instruments, Osterode
<i>Sigma 3K20</i>	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Magnetheizrührer <i>IKAMAG® RCT</i>	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroliterpipetten	
<i>Eppendorf Research®</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Pipetman®</i>	Gilson International B.V., Bad Camberg
Mikroskopiersysteme	
<i>ISIS FISH Imaging System V5.0</i>	MetaSystems, Altlußheim
Fluoreszenzmikroskop <i>Axioplan 2</i>	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Fotomikroskop <i>Axiophot</i>	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Videokamera <i>IMAC-CCD S30</i>	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg
pH-Meter <i>CG 810</i>	Schott, Mainz
Pulsfeldgelelektrophorese-System	
<i>CHEF-DR® III System</i>	
Kühleinheit, Pumpe	
Schüttelinkubatoren <i>Innova® 4000/4300</i>	New Brunswick Scientific, Edison, NJ USA

Schüttelwasserbad <i>GFL 1086</i>	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Schüttler <i>IKA-Vibrax® VXR</i>	IKA Labortechnik, Staufen
Sicherheitswerkbank Klasse II <i>NuAire</i>	Zapf Instrumente, Sarstedt
Thermocycler <i>Mastercycler® gradient</i>	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge <i>Biofuge® pico</i>	Heraeus Instruments, Osterode
Ultrareinstwassersystem <i>Milli-Q® PF Plus</i>	Millipore, Schwalbach
UV-Crosslinker <i>Stratalinker® 1800</i>	Stratagene, La Jolla, CA USA
UV-Spektralphotometer <i>GeneQuant® pro</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortex-Schüttler <i>Genie® 2</i>	Schütt Labortechnik, Göttingen
Wasserbäder	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen

2.1.7 Vorgefertigte Systeme (Kits)

<i>BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>DNA Extraction Kit</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Expand Long Template PCR System</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Long PCR Enzyme Mix</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NucleoBond® Plasmid Midi Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren

2.2 Spezielles Arbeitsmaterial

Im Folgenden sollen Art und Herkunft des Untersuchungsmaterials beschrieben werden, welches in direktem Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit bezogen und eingesetzt wurde.

2.2.1 Probandenmaterial

Von dem in 1.2 vorgestellten Patienten stand periphervenös entnommenes, heparinisier-tes Vollblut zur Chromosomenpräparation aus Lymphozytenkulturen (modifiziert nach Francke und Oliver 1978) für die geplanten FISH-Analysen zur Verfügung.

2.2.2 DNA- und cDNA-Klone

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 27 DNA-Klone und 1 cDNA-Klon vom *RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung* (Heubnerweg 6, 14059 Berlin) auf der Grundlage vorheriger Datenbankrecherchen (→2.3) bezogen. In diesem Abschnitt findet sich eine Übersicht der verwendeten (c)DNA-Bibliotheken (Tab. 1).

Eine genaue Aufstellung der einzelnen Klone einschließlich ihrer molekularen Charakterisierung erfolgt in Kapitel 3.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten (c)DNA-Bibliotheken.

N=Anzahl der bestellten Klone.

N	Bibliothek	Art	Quelle	Vektor	Stamm	Resistenz	Referenz
24	RPCI Human Male BAC Library 11	genomisch	Blut (Homo sapiens, männlich)	pBACe3.6	<i>E. coli</i> DH10B	Chloramphenicol	Osoegawa et al. 2001
3	CalTech Human BAC Library D	genomisch	Sperma (Homo sapiens)	pBeloBAC11	<i>E. coli</i> DH10B	Chloramphenicol	Kim et al. 1996
1	Human pooled cDNA (NIH_MGC_122)	cDNA	gemischt (Homo sapiens, weiblich)	pCMV-SPORT6	<i>E. coli</i> DH10B	Ampicillin	Gerhard et al. 2004

2.2.3 Vorgefertigte subtelomerische FISH-Sonden

Zur FISH-Analyse des Subtelomers auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 wurde das *TelVysion[®] 9p SG Probe/Hybridization Set* (DNA-Sondengröße 128 kb; Kartierung innerhalb der letzten 190 kb des Chromosomenendes; Referenz: Knight et al. 2000) der Firma Abbott Laboratories (Wiesbaden) bestellt und gemäß Herstellerangaben angewendet (→2.5.3).

2.2.4 Oligonukleotide (Primer)

Als Oligonukleotide für die (End-)Sequenzierung einzelner bestellter Klone (→2.5.2) dienten aus Promotor- und Genregionen der benutzten Klonierungsvektoren abgeleitete Standard-Primer. Das Design individueller Primer für die *long range* PCR (→2.4.4) erfolgte aus Sequenz-Datenbankeinträgen mit Hilfe der Internet-basierten Software Primer3 (→2.3.2). Tab. 2 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten und ausschließlich von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogenen Oligonukleotide. Der Name spezifisch berechneter Primer ist ein Konstrukt aus der internationalen Bezeichnung des BAC-Klons, dessen Sequenz als Matrize diente, sowie einer Buchstabenfolge von A bis C.

Tab. 2: Bezeichnung und Basensequenz der verwendeten Primer für Sequenzierungen und *long range* PCR.

Primerbezeichnung	Primersequenz
<i>Vektorspezifische Primer</i>	
T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6 Promoter	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'
M13 forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
<i>long range PCR-Primer</i>	
147I11-A forward	5'-CACTGTGAAATATAACCAACTGCAGCTTAC-3'
147I11-A reverse	5'-CACTACCTTTTCCTATTTACCCTTCACACTG-3'
147I11-B forward	5'-GAACCCTAAGAATTTGTGAATGTCCAGTAG-3'
147I11-B reverse	5'-AAAAGTCTTGAGTCGCAACTACCTAATCAC-3'
147I11-C forward	5'-CTGGGTTTTCAATACTCTACTGTGTCTCCT-3'
147I11-C reverse	5'-CTCACTCCCTGAGTAACAAGTTGGTAAGAT-3'
399A15-A forward	5'-GGAAGTGTAGTCAAGTGACAGAGAACAGAG-3'
399A15-A reverse	5'-ACAACCAGCTTAGAGAAGAACATAAACGAC-3'

Die in lyophilisiertem Zustand gelieferten Oligonukleotide wurden nach ihrem Eintreffen in sterilem Wasser gelöst, auf eine Arbeitskonzentration von 10 µM verdünnt und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.3 Methodik zur *in-silico*-Analyse

Zusätzlich zu den experimentellen Tätigkeiten an der Laborbank wurden folgende EDV-gestützten Hilfsmittel eingesetzt.

2.3.1 Online-Datenbanken/Genom-Navigationsprogramme

UCSC Genome Browser (Kent et al. 2002)

Die *Genome Bioinformatics Group* der *University of California Santa Cruz* (UCSC) stellt der Öffentlichkeit mit dem UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) ein Internet-basiertes Instrument zur Verfügung, mit dem der Anwender die enormen Datenmengen der Genomprojekte systematisch zu durchsuchen vermag. Über eine grafische Benutzeroberfläche kann durch die ständig aktualisierten zytogenetischen, genetischen und physikalischen Karten mit variablen Zoom-Stufen von der Chromosomen-ebene bis zur Nukleotidsequenz navigiert und dabei u. a. Gene, Exons, ESTs, Genvorhersagen, RNAs und Proteine identifiziert werden. Der Browser stellt eine Verknüpfung

zu zahlreichen anderen Datenbanken (Spezialdatenbanken s. u.) her und auch Homologievergleiche der humanen Genomsequenzen mit anderen Spezies wie z. B. der Maus lassen sich darstellen. Die zusammengesetzten Sequenzen für das humane Genom basieren auf der nicht-redundanten Referenzsequenz des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), Bethesda, USA. Im Zeitraum der Erstellung dieser Arbeit wurde die Version 36 (veröffentlicht im Oktober 2005) verwendet.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1990)

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) wird dazu verwendet, experimentell ermittelte DNA- oder Protein-Sequenzen mit bereits in einer Datenbank vorhandenen Sequenzen zu vergleichen. Als Ergebnis liefert das Programm eine Reihe lokaler Alignments, d. h. Gegenüberstellungen von Stücken der gesuchten Sequenz mit ähnlichen Stücken aus der Datenbank. Darüber hinaus gibt BLAST an, wie signifikant die gefundenen Treffer sind.

NCBI Clone Registry

Elektronische Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone>) des NCBI, die Informationen über genomische Klone und Bibliotheken (Sequenzdaten, Kartierung und Bezugsquellen) integriert und im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde, um experimentell gewonnene Daten über die bezogenen Klone mit Datenbankeinträgen zu vergleichen.

Spezialdatenbanken

Für die Erstellung von Transkriptkarten innerhalb der experimentell ermittelten Kandidatenregionen wurden in dieser Arbeit zusätzlich folgende spezielle Datenbanken gescreent:

- **miRBase Release 9.2** (<http://microrna.sanger.ac.uk>): Sammlung bisher identifizierter miRNAs und deren genomischer Zuordnung durch das *Wellcome Trust Sanger Institute* (Griffiths-Jones 2004, Griffiths-Jones et al. 2006).
- **CpG-Inseln:** Der UCSC Genome Browser (s. o) integriert eine Suche nach validen CpG-Inseln innerhalb einer definierten genomischen Region mit Hilfe eines Algorithmus, der die Gardiner-Garden-Kriterien erfüllt (Gardiner-Garden und Frommer 1987).

- **Genscan-Genvorhersagen:** In Genome Browser integrierte Suche nach Genvorhersagen, die auf einem Computermodell beruhen (Burge und Karlin 1997).
- **VEGA-Datenbank** (<http://vega.sanger.ac.uk>): Die *Vertebrate Genome Annotation Database* (VEGA) wird von der Havana-Gruppe am *Wellcome Trust Sanger Institute* gepflegt und enthält manuell annotierte Transkripte (Ashurst et al. 2005).

2.3.2 Software

Isis FISH Imaging System V5.0

Software zur Steuerung der am Fluoreszenzmikroskop montierten CCD-Kamera sowie Verwaltung und Bearbeitung der digitalisierten Metaphasen.

Primer3 (Rozen und Skaletsky 2000)

Frei verfügbares Programm mit einem umfangreichen Algorithmus und variablen Eingabeoptionen zum Design von Oligonukleotid-Primern für die PCR über ein Webinterface (http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Als Sequenzvorlage dienen o. g. Datenbanken.

NEBcutter V2.0 (Vincze et al. 2003)

Internet-Software (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) mit der Funktionalität, frei wählbare DNA-Sequenzen auf offene Leseraster und Restriktionsenzym-Schnittstellen zu durchsuchen. Einsatz im Rahmen der Restriktionsanalyse und Größenbestimmung der bezogenen Klone zur Abschätzung des zu erwartenden Bandenmusters.

2.4 Methodik zur Isolierung spezifischer DNA-Fragmente

Sofern nicht anders angegeben, erfolgt die Beschreibung der im Folgenden aufgeführten molekularbiologischen Methoden in Anlehnung an publizierte Standardprotokolle (Sambrook et al. 1989).

2.4.1 Bakterienkulturen

Alle über das RZPD bezogenen Klone wurden zur Wiederherstellung von Einzelkolonien unmittelbar auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, invers bei 37 °C für 12 – 24 h inkubiert, mit *Parafilm*[®] verschlossen und anschließend bei 4 °C gelagert. Zur Vorbereitung auf die DNA-Präparation wurden jeweils 5 ml LB-Medium unter Zusatz von 5 µl

Chloramphenicol (Arbeitskonzentration ~ 30 µg/ml) mit einer Einzelkolonie angeimpft und auf dem Schüttler bei 280 rpm und 37 °C für 8 h inkubiert. Anschließend wurden 2 ml dieser Vorkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium und 100 µl Chloramphenicol überführt, über Nacht bei 280 rpm und 37 °C geschüttelt und die Bakterien in der Kühlzentrifuge 30 min bei 4000 rpm pelletiert.

2.4.2 Herstellung von Stammkulturen

Eine Langzeit-Asservierung der bestellten Klone erfolgte durch Herstellung von Glycerin-Stocks. Dazu wurden 800 µl einer frischen Übernachtskultur zusammen mit 200 µl sterilem Glycerin in ein 2-ml-Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss pipettiert und nach schonendem Vermischen (kurzes Vortexen) sofort auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C eingelagert.

2.4.3 Präparation, Reinigung und Fällung von BAC- und Plasmid-DNA

Zur Isolierung von BAC- und Plasmid-DNA (cDNA-Klon) wurde das *NucleoBond[®] Plasmid Midi Kit* der Firma Macherey-Nagel und die darin enthaltenen Pufferlösungen gemäß Herstellerempfehlungen verwendet. Die Extraktion der DNA aus den vorbereiteten Bakterienzellpellets einer 100-ml-Übernachtskultur beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979) und anschließender Lysatreinigung mittels Anionenaustauscherchromatographie über die mitgelieferten *NucleoBond[®] AX 100* Säulen. Das Eluat wurde in 1,5-ml-Reaktionsgefäße aufgenommen und die reine DNA mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt, 30 min bei 25 000 g und 4 °C zentrifugiert, mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA-Pellets konnten dann in 30 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

2.4.4 Generierung BAC-spezifischer Subfragmente mittels *long range* PCR

Das zur FISH-Analyse selektierte Klon-Contig wurde durch Generierung spezifischer Subfragmente mittels *long range* PCR (LRPCR) verfeinert. Diese Methode lässt sich auf das gleiche Prinzip wie die Standard-PCR (Saiki et al. 1985) zurückführen, d. h. eine Amplifizierung spezifischer DNA-Bereiche selbst bei sehr geringer DNA-Ausgangsmenge. Über eine zyklische Wiederholung von Denaturierung der Matrizen-DNA, Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) und Synthese einer

komplementären DNA-Kopie in einem programmierbaren Thermocycler kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung. Während die bei der Standard-PCR zum Einsatz gebrachte thermostabile Taq-Polymerase aufgrund akkumulierender Fehlhybridisierungen nur recht kurze Amplifikationen bis ca. 5 kb erlaubt, lassen sich durch die bei der LRPCR verwendete Polymerasemischung (Taq + Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität zur Fehlerkorrektur, z. B. Pfu) Fragmente von bis zu 50 kb generieren (Barnes 1994; Cheng et al. 1994). Für die geplanten FISH-Analysen wurden LRPCR-Amplifikate von Bruchpunkt-überspannenden BAC-Klonen in der Größenordnung 10 kb angestrebt und nach entsprechender *in-silico*-Analyse (→2.3) individuelle Primer (je 30 bp) bestellt (→2.2.4). Der Reaktionsansatz erfolgte mit Hilfe des *Expand Long Template PCR System* (Roche), als alternativer Polymerasemix wurde der *Long PCR Enzyme Mix* (Fermentas) eingesetzt. Die im Folgenden angegebene Rezeptur der Komponenten und die Reaktionsbedingungen sind unter Berücksichtigung der Herstellerempfehlungen modifiziert worden und geben die Modalitäten wieder, unter denen die LRPCR hier am besten funktioniert hat.

Reaktionsansatz (in 0,2-ml-Reaktionsgefäßen):

5 ng	BAC-DNA (linearisiert; →2.4.6)
5 µl	10 x PCR-Puffer 3 mit MgCl ₂ und Detergenzien (im Kit enthalten)
1,75 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1,5 µl	Forward-Primer (10 µM)
1,5 µl	Reverse-Primer (10 µM)
0,6 µl	Enzym-Mix (Roche oder Fermentas; 5 U/µl)
ad 50 µl	H ₂ O

Der Enzym-Mix wurde stets zuletzt hinzugefügt und der Ansatz nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren unmittelbar in den programmierten und auf 93 °C vorgeheizten Thermocycler gegeben.

LRPCR-Programm (Eppendorf *Mastercycler*[®] *gradient*):

93 °C	2 min (initiale Denaturierung)	
93 °C	10 s	} 10 Zyklen
66 °C	30 s	
68 °C	8 min	

93 °C	20 s	} 15 Zyklen
66 °C	30 s	
68 °C	8 min (+ 20 s/Zyklus)	
68 °C	7 min (finale Elongation)	
4 °C	halten bis zur Aufarbeitung	

Bei jeder LRPCR wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle Komponenten bis auf die Template-DNA enthielt. Vor der Weiterverarbeitung der amplifizierten DNA wurde dem PCR-Ansatz zunächst ein Aliquot von 10 µl entnommen und auf ein Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen (→2.4.7). Zeigte die Auswertung der Elektrophorese ein Amplifikat mit der zu erwartenden Größe, konnte mit der DNA-Extraktion (→2.4.8) fortgefahren werden.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA wurde über die Messung der Extinktion (optische Dichte OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem UV-Spektralphotometer (*GeneQuant[®] pro*) erreicht. Getreu dem Lambert-Beer-Gesetz errechnet das Gerät die DNA-Konzentration nach der Formel:

$$c = \frac{-\ln\left(\frac{I_1}{I_0}\right)}{\alpha_\lambda \cdot l}$$

mit

- c: Konzentration der absorbierenden DNA in Lösung (z. B. in ng/µl)
- I_1 : Intensität des transmittierten Lichtes
- I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes
- α_λ : Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ (47,5 für dsDNA bei 260 nm)
- l : Weglänge des Lichtes im Material (hier: 1 cm Küvettendurchmesser)

Aus dem angegebenen Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm (OD260/OD280) erhält man des Weiteren eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung (optimaler Bereich 1,8 +/- 0,2).

2.4.6 Restriktionsenzymatische Spaltung

Präparierte zirkuläre BAC-DNA wurde einer Spaltung mit der selten schneidenden Typ-II-Restriktionsendonuklease *NotI* unterzogen, um die spezifischen DNA-Fragmente vom Vektor zu trennen und diese gelelektrophoretisch zu analysieren. Bei den DNA-Fragmenten, die als Matrize für die LRPCR vorgesehen waren, bot sich die restriktionsenzymatische Spaltung zur Linearisierung an. Die Reaktionsansätze erfolgten in dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer O bei den angegebenen Bedingungen. In der Regel wurde jeweils 1 µg DNA mit 10 U *NotI* etwa 2 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend bei 65 °C für 20 min hitzedeaktiviert.

2.4.7 Gelelektrophoretische Auftrennung

Die Agarosegel-Elektrophorese kam zum Einsatz im Rahmen der Nick Translation (→2.5.3) zur Abschätzung des Größenbereichs der Sondenfragmente und nach LRPCR-Reaktionen (→2.4.4) zur Isolierung spezifischer Amplifikate. Bei der molekularen Restriktions- und Größenbestimmung bestellter BAC-Klone wurde auf die Pulsfeldgelelektrophorese zurückgegriffen.

Agarosegel-Elektrophorese

Durch eine Elektrophorese in Standard-Agarosegelen können DNA-Moleküle in einem Größenbereich von 0,1–20 kb aufgetrennt werden. Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurden 0,5–2 %ige Agarosegele verwendet. Die jeweils benötigte Agarosemenge wurde in 1 x TBE- bzw. TAE-Puffer gegeben, durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf etwa 50 °C in einen Gelträger gegossen. Alle DNA-Proben wurden mit 1/10 Vol Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandards dienten DNA-Leitern mit bekannten Fragmentgrößen (→2.1.3). Die Elektrophoresen wurden bei einer Spannung von 6 V/cm mit 1 x TBE bzw. TAE als Laufpuffer durchgeführt. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gele in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) für etwa 20 min angefärbt, kurz in destilliertem Wasser entfärbt und schließlich mit Hilfe eines Videoprinter-Systems dokumentiert.

Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE-Technik ermöglicht die Auftrennung hochmolekularer DNA bis zu einer Größenordnung von ca. 5 Mb (Schwartz und Cantor 1984; Carle et al. 1986).

Physikalische Grundlagen:

Bei der PFGE wird nicht nur die Größe als Funktion des Siebeffekts in der Agarosematrix für die Laufeigenschaften der DNA genutzt, sondern darüber hinaus die Art und Weise ihres Streckungsvermögens im elektrischen Feld. Durch zwei an das Gel angelegte, alternierende Spannungsfelder wird die DNA permanent zu Konformationsänderungen veranlasst, die im Falle kürzerer Fragmente früher, im Falle längerer Ketten später die Reorientierung, Streckung und Wanderung in Richtung des angelegten Feldes zulässt. Die Auftrennung der Fragmente ist dabei von einigen Faktoren wie Pulszeit, Feldstärke, Temperatur, Pufferzusammensetzung, Typ und Konzentration der Agarose

und dem Winkel der Spannungsfelder zueinander abhängig. Größere Fragmente werden durch längere, kleinere Fragmente durch niedrige Pulszeiten separiert.

Apparatur:

Die PFGE erfolgte in einem *CHEF-DR[®] III System* (Bio-Rad Laboratories) mit 1 %igen Agarosegelen in 0,5 x TBE-Puffer. Als Längenstandards dienten in Agarose eingebettete DNA-Leitern bekannter Fragmentlängen (→2.1.3), die in die entsprechenden Gel-taschen gegeben und mit 1 %iger LMP-Agarose bedeckt wurden. Das Gel wurde in die mit vorgekühltem 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt und mit den restriktionsenzymatisch gespaltenen BAC-DNAs beladen (kompletter Restriktionsverdau nach Hitze-deaktivierung mit 1/10 Vol Ladepuffer).

Laufbedingungen (BAC-Klone):

Winkel: 120°
Puls: 2 s – 10 s linear
Laufzeit: 18 h
Feldstärke: 6 V/cm
Temperatur: 14 °C

Färbung und Dokumentation erfolgten analog der Standard-Agarosegel-Elektrophorese.

2.4.8 Extraktion aus Agarosegelen

Spezifische DNA-Amplifikate aus LRPCR-Reaktionen wurden nach elektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten, in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und die enthaltene DNA unter Einsatz des *DNA Extraction Kit* (Fermentas) gemäß Herstellerempfehlungen isoliert. Dieser Methode liegt das Glasmilch-Prinzip zugrunde, bei dem in Standard-Agarose eingebettete DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze an das Material einer Silica-Suspension bindet und nach multiplen Waschschritten durch Lösungen geringer Salzkonzentrationen in großer Ausbeute (etwa 70 %) wieder eluiert wird (Vogelstein und Gillespie 1979). Eine anschließende Fällung ist dabei nicht nötig, sodass die reine DNA-Lösung direkt den weiteren Schritten zugeführt werden konnte.

2.5 Methodik zur molekularen Charakterisierung spezifischer DNA-Fragmente und Bruchpunktkartierung

Neben der in 2.3 dargestellten *in-silico*-Methodik, also dem Herausfiltern relevanter Informationen aus molekularbiologischen Datenbanken, dienen die im Folgenden veranschaulichten experimentellen Ansätze der Charakterisierung der zuvor isolierten DNA-Fragmente. Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ist darüber hinaus das Werkzeug zur eigentlichen Bruchpunktkartierung der zu untersuchenden Translokation.

2.5.1 DNA-Größenbestimmung

Mit den in 2.4.7 erläuterten gelelektrophoretischen Auftrennungsmethoden konnten die vom RZPD bezogenen Klone im Hinblick auf ihre molekulare Größe (Basenpaare) charakterisiert und die gewonnenen experimentellen Daten mit den Angaben in Datenbanken (vgl. Tab. 3) verglichen werden.

2.5.2 Nicht-radioaktive BAC-DNA-Sequenzierung

Die durchgeführten *in-vitro*-Reaktionen zur Sequenzierung von BAC-DNA-Enden im Hinblick auf eine Zuordnung zur humanen Referenzsequenz beruhen auf dem Prinzip des enzymatischen Kettenabbruchs (Sanger et al. 1977). Dabei wurde das *BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) den Herstelleranweisungen folgend eingesetzt. Dieses enthält neben dem Sequenzierungspuffer einen Prämix bestehend aus Taq-DNA-Polymerase, dNTPs und mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs. Die Verwendung dieses Kits ermöglicht die Sequenzierreaktion in nur einem Gefäß mit einer einzigen PCR. Der Einbau eines der vier markierten Didesoxydinukleotide ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP terminiert die Verlängerung der DNA-Kette, wobei Fragmente unterschiedlicher Länge mit einem Didesoxyanalogon am 3'-Ende entstehen. Dieses Fragmentgemisch wird in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs werden durch einen Argonlaser angeregt, das emittierte Licht registriert, und von einer Auswertungssoftware die DNA-Sequenz errechnet. Die Auftrennung und Auswertung der Proben erfolgte am automatischen Sequenziergerät ABI 377 (Applied Biosystems) im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät an der Universität Halle-Wittenberg.

Reaktionsansatz (in 0,2-ml-Reaktionsgefäßen):

1 µg DNA-Template
4 µl Prämix (im Kit enthalten)
2 µl Sequenzierungspuffer (im Kit enthalten)
3,2 pmol Primer (vektorspezifisch, vgl. Tab. 2)
ad 20 µl H₂O

PCR-Programm (Eppendorf *Mastercycler*[®] *gradient*):

95 °C 5 min (initiale Denaturierung)
95 °C 30 s }
50 °C 10 s } 30 Zyklen
60 °C 4 min }
4 °C halten bis zur Aufarbeitung

Aufarbeitung der Sequenzierproben:

Die Fällung der Proben erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol 1,5 M NaAc (in 250 mM EDTA) und 3 Vol 100 % Ethanol. Nach Inkubation auf Eis für 20 min wurde 25 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 4 µl Formamid-Ladepuffer aufgenommen. Die Proben wurden anschließend kühl und lichtgeschützt an das ZMG gegeben und dort unmittelbar vor dem Lauf des Sequenziergels hitzedenaturiert.

2.5.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Pinkel et al. 1986; modifiziert nach Lichter et al. 1988) konnten entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit die selektierten und isolierten spezifischen DNA-Fragmente chromosomal lokalisiert und somit physikalische Karten der Bruchpunktregionen erstellt werden. Bei dieser Sonderform einer Nukleinsäurehybridisierung dienen *in-situ* denaturierte Chromosomenpräparationen auf Objektträgern als Zielnukleinsäuren, die mit einem markierten DNA-Klon (bekannte Sonde) hybridisiert werden. Das Auflösungsvermögen ist abhängig von der eingesetzten Sonde und liegt bei der Metaphase-FISH in der Größenordnung mehrerer Kilobasenpaare. Nach umfangreichen, die Spezifität sichernden Waschschritten werden die Komplexe fluoreszenzmarkiert und anschließend auf einem Fluoreszenzmikroskop *in-situ* ausgewertet. Numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen stellen sich durch eine pathologische Anzahl an Fluoreszenzsignalen, balancierte strukturelle Anomalien

zusätzlich durch deren spezielle räumliche Verteilung (*split signals*) dar. Eine vollständige molekulare Charakterisierung der eingesetzten Klone einschließlich der Sequenzdaten ist im Gegensatz zu reinen PCR-Analysen nicht zwingende Voraussetzung.

Auswahl und Vorbehandlung der Objektträger

Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurden bei 100 – 250facher Vergrößerung die Zell- und Metaphasendichte sowie die Spreitungsqualität der Chromosomenpräparate kontrolliert.

Eine Vorbehandlung der Objektträger vor Einsatz in der FISH hat sich für die Qualität des Fluoreszenzpräparates (Hybridisierungsspezifität) in bestimmten Fällen als günstig erwiesen. Durch eine RNase-A-Behandlung wurde auf 1 – 3 Wochen gelagerten Objektträgern die auf dem Objektträger fixierte RNA entfernt. Auf diese Weise wurde eine unspezifische Bindung der markierten DNA-Sonde an endogene RNA verhindert. War auf den Objektträgern viel Zytoplasma zu erkennen, wurden durch eine Pepsin-Behandlung proteinhaltige Zellbestandteile entfernt.

RNase-A-Vorbehandlung:

RNase-A-Lösung: 0,1 mg/ml RNase A in 2 x SSC-Puffer

Vor der eigentlichen Anwendung wurde die RNase-A-Lösung 15 min im Wasserbad gekocht, um darin enthaltene DNasen zu zerstören. Nach Abkühlung der Lösung wurden jeweils 200 µl pro Objektträger aufgetragen, diese dann blasenfrei mit einem 24 x 60 mm Deckglas abgedeckt und die Präparate 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger zweimal 15 min bei RT in einer Küvette mit 2 x SSC gespült, was der Entfernung der RNase-A-Lösung und der Alterung der Objektträger diente.

Pepsin-Vorbehandlung:

Pepsin-Lösung: 20 µl Pepsin
40 ml 0,01 M HCl (vorgewärmt)

Die Objektträger wurden in einer Küvette mit auf 37 °C vorgewärmter Pepsin-Lösung 20 min inkubiert und durchliefen dann folgende Prozedur: 5 min Spülung in 1 x PBS-Puffer jeweils vor und nach einer Postfixation für 5 min in 4 % Formaldehyd-Lösung (alle Schritte bei RT), anschließend Lufttrocknung.

Denaturierung der Chromosomenpräparate

Denaturierungslösung: 70 % Formamid (deionisiert) in 2 x SSC
pH 7,0 (präzise Titration mit Essigsäure)

Vor der Denaturierung wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 90 % und 2 x 99 %) für jeweils 1 min dehydriert. Die frisch angesetzte Denaturierungslösung wurde in einer Küvette auf 70 °C vorgewärmt und die Chromosomenpräparate darin etwa 3 min denaturiert. Anschließend wurden die Objektträger unmittelbar durch eine auf -20 °C gekühlte aufsteigende Ethanol-Reihe geführt (s. o.), luftgetrocknet und noch am selben Tag für die Hybridisierung eingesetzt.

Markierung der DNA-Sonden/Nick Translation

Zur Markierung der isolierten Klone und LRPCR-Produkte (→2.4) kam das Verfahren der Nick Translation (Rigby et al. 1977) zur Anwendung. Dabei wird die Template-DNA zunächst mittels DNase I in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen gespalten, indem das Enzym in einem der beiden Doppelstränge Phosphodiesterbrücken öffnet, wodurch 5'-Enden entstehen (*nicks*). Die 5'-3'-Exonuklease der DNA-Polymerase I baut von dieser Stelle aus das DNA-Fragment ab, während die entstehende Lücke durch die Polymerasefunktion des Enzyms mittels Anhängen von Biotin-markierten Nukleotiden an das freie 3'-OH-Ende wieder geschlossen wird. Somit wird ein DNA-Strang durch einen neuen mit Markierung ersetzt. Über eine Variation der Reaktionsbedingungen, vornehmlich der DNase-Konzentration und Inkubationsdauer, lässt sich eine gezielte Beeinflussung der Fragmentgrößen der markierten Sonden ermöglichen, was essenziell für eine erfolgreiche Hybridisierung ist. Erfahrungswerte ergaben optimale Fragmentgrößen im Bereich von 50-500 bp. Die Effizienz des Einbaus von Biotin-16-dUTP konnte anhand einer Farbreaktion (Dot-Blot) semiquantitativ abgeschätzt werden.

Reaktionsansatz:

1 µg	BAC-DNA/cDNA/LRPCR-Produkt
5 µl	10 x Nick-Puffer (0,5 M Tris-HCl pH 7,4; 0,1 M $MgCl_2$; 0,01 M DTT; 500 µg/ml BSA)
2,4 µl	Biotin-16-dUTP (1 mM)
2,5 µl	dNTP-Mix (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und 0,2 mM dTTP)
4 µl	DNase I eines 1:1000 verdünnten Stocks (1 mg/ml)
2 µl	DNA-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde für 4 h bei 15 °C in einem Kryostat inkubiert und anschließend auf Eis gestellt, um zunächst den Biotin-Einbau mittels Dot-Blot und die Fragmentgrößen per Agarosegel-Elektrophorese (→2.4.7) zu überprüfen.

Dot-Blot:

Puffer 1:	25 mM Tris-HCl pH 7,5	Puffer 2:	25 mM Tris-HCl pH 9,5
	50 mM NaCl		50 mM NaCl
			0,05 % Triton-X

Blocking-Lösung: 7 ml Puffer 1
3 ml 10 % BSA

Mit je 1 µl des Nick-Translations-Ansatzes wurde eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000) angesetzt und jeweils 2 µl dieser Verdünnungen auf einen Nylon-Filter aufgetragen. Die DNA wurde anschließend in einem UV-Crosslinker kovalent an den Filter gebunden. Um unspezifische Bindungen des später zugesetzten Streptavidins an den Filter zu verhindern, wurde dieser 15 min bei RT in Blocking-Lösung inkubiert. Zur Detektion des Biotins wurde der Filter dann 20 min in 9,5 ml Puffer 1 unter Zusatz von 0,3 ml 10 % BSA und 5 µl alkalischer Streptavidin-Phosphatase (0,1 mg/ml) bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten Waschvorgänge, jeweils 2 x 5 min in Puffer 1 und 2 x 5 min in Puffer 2, bevor sich die eigentliche Farbreaktion anschloss. Für diese wurde der Filter 1 h in 10 ml Puffer 2 unter Zusatz von 50 mg/ml BCIP und 100 mg/ml NBT unter Lichtabschluss auf dem Schüttler inkubiert, in 2 x SSC gespült und getrocknet. Eine deutliche Blaufärbung bis zur 1:100-Verdünnung weist auf einen sehr guten Biotin-Einbau hin (Abb. 4).

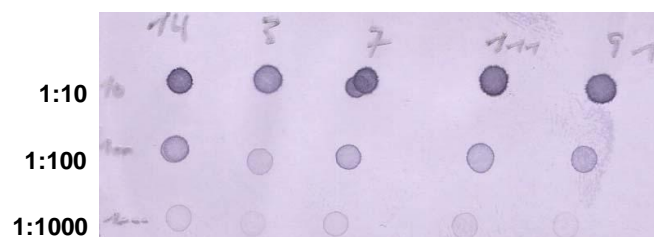


Abb. 4: Beispiel für einen Dot-Blot zur Überprüfung des Biotin-Einbaus bei der Nick Translation.

Von den 5 getesteten Proben zeigen alle eine Blaufärbung bis zu einer Verdünnung von 1:1000 und weisen daher einen ausreichenden Biotin-Einbau auf.

Kontrolle der Fragmentgrößen mittels Agarosegel-Elektrophorese:

Ein 2%-Agarosegel (in TBE-Puffer) wurde mit jeweils 3 µl markierter Probe (zuvor 10 min bei 95 °C denaturiert) und einem 100-bp-Marker wie in 2.4.7 beschrieben bela-

den und die Elektrophorese bei 90 V für 2 h gefahren. Zeigte sich der Fragmentschmier nach Auswertung des Gels weit vom Optimum (50-500 kb) entfernt, wurde der auf Eis stehende Nick-Translations-Ansatz nach Zugabe von zusätzlichen 2 µl DNase I für weitere 2 h bei 15 °C im Kryostat inkubiert und die Fragmentgrößen danach erneut getestet. Abb. 5 illustriert beispielhaft einen Fragmentschmier im optimalen Bereich.

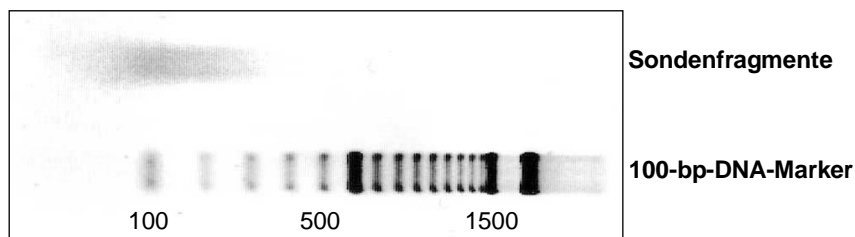


Abb. 5: Auswertung eines Agarosegels mit einer Probe nach Nick Translation.

Der Fragmentschmier zeigt sich in einem optimalen Bereich für die FISH-Analyse.

Suppression unspezifischer Hybridisierungen (Pinkel et al. 1988)

Rekombinante DNA aus eukaryotischen Zellen enthält oft repetitive Sequenzen (Alu- und alphaide Sequenzen), welche bei einer *in-situ*-Hybridisierung auf menschlichen Chromosomen zu einer unspezifischen Markierung vieler Bereiche des Genoms führen würden. Um derartige Kreuzhybridisierungen zu verhindern, wurde der markierten Sonde vor der eigentlichen Hybridisierung sogenannte Kompetitions-DNA in Form von Lachssperm-DNA (Absättigung unspezifischer Sequenzen) und C₀t-1-DNA (Absättigung hochrepetitiver Sequenzen) mit Fragmentgrößen im Bereich von 250 – 500 bp zugeführt. Für LRPCR-Produkte und cDNA wurden in der Regel 5 µl C₀t-1-DNA (1 mg/ml) und 4 µl Lachssperm-DNA (10 mg/ml) und für BACs 9 µl C₀t-1-DNA und 6 µl Lachssperm-DNA verwendet.

Hybridisierungsansatz und Preannealing

Mastermix: 20 % Dextransulfat in 2 x SSC

Je nach geplanter FISH-Analyse wurden pro Objektträger 500 ng markierte BAC-DNA, 100 ng markiertes LRPCR-Produkt oder 50 ng markierte cDNA in 10 µl Hybridisierungslösung eingesetzt. Dafür wurde eine entsprechend abgeschätzte Menge an markierter und mit Kompetitions-DNA versetzter Sonde mit 0,1 Vol. NaAc pH 5,2 und 2,5 Vol. Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet anschließend in 5 µl 100 % Formamid für 30 min bei 37 °C gelöst. Nach Zugabe von 5 µl Mastermix erfolgte die Denaturierung des nun vollständigen Hybridisierungsansatzes

für 5 min bei 95 °C und eine unmittelbare Inkubation für 15 min bei 37 °C. Letzteres sogenanntes Preannealing gab der zugesetzten Kompletions-DNA Gelegenheit, die repetitiven Sequenzen der markierten Sonde vor der eigentlichen Hybridisierung abzusättigen. Der Ansatz konnte nun auf den denaturierten Objektträger pipettiert werden, mit einem Deckglas blasenfrei abgedeckt und die Ränder mit Rubber Cement versiegelt werden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

Waschschritte nach der Hybridisierung

Die während der Hybridisierung nicht oder nur unspezifisch gebundenen Sondenmoleküle wurden durch anschließende Waschschritte variabler Stringenz entfernt, um unspezifische Signale und mögliche Hintergrundprobleme auf dem Objektträger zu verringern. Alle Waschschritte erfolgten in einem Schüttelwasserbad in den auf die angegebenen Temperaturen vorgewärmten Waschlösungs-Küvetten unter Vermeidung des Austrocknens zwischen den einzelnen Waschschritten.

Waschlösung I:	50 % Formamid in 2 x SSC pH 7,0 47 °C	Waschlösung II:	2 x SSC 47 °C
Waschlösung III:	0,1 x SSC 65 °C	Waschlösung IV:	4 x SSC 0,1 % Tween [®] 20 47 °C

Waschschritte in zeitlicher Abfolge: 3 x 5 min Waschlösung I, 5 x 2 min Waschlösung II, 3 x 5 min Waschlösung III, 1 x 5 min Waschlösung IV.

Fluoreszenzmarkierung

Blocking-Lösung:	5 % BSA in 4 x SSC, sterilfiltriert
FITC-Avidin-Lösung:	Fluorescein Avidin D (5 mg/ml) 1:200 verdünnt in Blocking-Lösung
BAAD-Lösung:	BAAD (0,5 mg/ml) 1:100 verdünnt in Blocking-Lösung

Biotin kann durch spezifische Bindung von FITC-gekoppeltem Avidin D detektiert und das Signal mittels eines biotinylierten Antikörpers gegen Avidin D (BAAD) und erneute Inkubation mit FITC-Avidin D amplifiziert werden. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer unter Lichtabschluss. Nach Abschluss der Waschschritte wurden die Objektträger mit 500 µl Blocking-Lösung benetzt, für 10 min bei 37 °C in-

kubiert, die Blocking-Lösung verworfen und 100 µl der FITC-Avidin-Lösung aufgetragen. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C wurden die Objektträger 3 x 5 min in Waschlösung II (s. o.) geschüttelt. Es folgten ein erneuter Blocking-Schritt und eine Inkubation mit 100 µl BAAD-Lösung bei 37 °C. Nach 30 min wurden die Objektträger wie oben gespült und ein weiterer Blocking-Schritt, gefolgt von 30 min Inkubation mit FITC-Avidin-Lösung und abschließendem Waschschrift, durchgeführt.

FISH-Analyse mit dem *TelVysion*[®] 9p SG Probe/Hybridization Set

Kommerzielle FISH-Sonden der Firma Abbott Laboratories (→2.2.3) sind primär fluoreszenzmarkiert (FITC) und mit kompetitiver DNA versetzt. Im Set enthalten ist auch der Hybridisierungspuffer (Lösung aus Dextransulfat und Formamid in SSC; pH 7,0). Für die *in-situ*-Hybridisierung wurde der Hybridisierungsansatz, bestehend aus 1 µl Sonde, 7 µl Puffer und 2 µl H₂O, bei 70 °C für 5 min im Wasserbad denaturiert und sofort auf einen denaturierten Objektträger (s. o.) pipettiert. Beim Waschen der Präparate nach Inkubation über Nacht konnte wegen der hohen spezifischen Bindung der vorgefertigten Sonden auf ein verkürztes, Formamid-freies Protokoll zurückgegriffen werden. Dazu wurden die Objektträger zunächst in auf 73 °C erhitztem 0,4 x SSC-Puffer für 2 min geschüttelt, anschließend in eine 2 x SSC/0,2 % *Tween*[®] 20 Waschlösung überführt und darin für 1 min bei RT gespült.

Gegenfärbung der Chromosomen mit Propidiumiodid und DAPI

Färbelösung: 1 mg/ml Propidiumiodid
0,2 mg/ml DAPI
in *Vectashield*[®] *Mounting Medium*

Pro Objektträger wurden 30 µl der Färbelösung aufgetragen, ein Deckglas blasenfrei aufgelegt und mit handelsüblichem Nagellack umrandet.

Auswertung der Präparate am Fluoreszenzmikroskop

Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (*Zeiss Axioplan 2*) analysiert. Dieses ist mit einem Fluorescein-Propidiumiodid-Kombinationsfiltersystem ausgestattet, welches die direkte Betrachtung der Fluoreszenzsignale auf den Metaphasechromosomen erlaubt. Geeignete Metaphasen wurden mittels integrierter CCD-Kamera bei 160-facher Vergrößerung unter Immersionsöl digitalisiert und im MetaSystems-Dokumentationssystem *ISIS V5.0* gespeichert.

3 Ergebnisse

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die molekulare Eingrenzung der chromosomalen Bruchpunktregionen einer Translokation $t(6;9)(p12;p24)$ mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bei einem Patienten mit B-CLL im Hinblick auf die mögliche Identifizierung von Kandidatengen, die mit der Ausprägung der vorliegenden phänotypischen Störung korrelieren.

3.1 *In-silico*-Analyse der zytogenetisch ermittelten Bruchpunktregionen

Ausgangspunkt für die molekulare Charakterisierung der zytogenetisch definierten Bruchpunktregionen auf 6p12 und 9p24 war die Identifizierung und Selektion spezifischer BAC-Klone mit Hilfe des in 2.3.1 vorgestellten Genom-Browsers. Zunächst wurden nur wenige über die 6p12- (ca. 12 Mb) und 9p24-Region (ca. 9 Mb) verteilte Klone zufällig ausgewählt, um durch FISH-Analysen deren Lokalisation in Relation zu den Bruchpunkten zu bestimmen (proximal bzw. distal). Über diese erste Eingrenzung der Bruchstellen konnte nun analog eine kleinere Region der *in-silico*-Analyse unterzogen werden, um weitere geeignete Klone zu bestellen. Diese Strategie wurde schrittweise bis zur Identifizierung Bruchpunkt-überspannender Klone für 6p12 und 9p24 fortgesetzt. Wegen der in 1.2.3 erläuterten klinischen Relevanz wurden zur genauen Kartierung von JAK2 in Relation zum 9p24-Bruchpunkt zwei spezifische BAC-Klone selektiert, die das Gen jeweils am 5'-Ende (*RP11-3H3*) und 3'-Ende (*RP11-28A9*) flankieren (Reiter et al. 2005). Alle 27 eingesetzten BAC-Klone sind in Tab. 3 aufgelistet und molekular charakterisiert.

3.2 Molekularzytogenetische Kartierung der genomischen Bruchpunktregionen 6p12 und 9p24

3.2.1 FISH-Analyse des Subtelomerbereichs 9p

Aufgrund der physikalischen Nähe der 9p24-Bruchpunktregion zum Telomer wurde unter Zuhilfenahme einer spezifischen FISH-Sonde für das Telomer 9p (→2.2.3) die Position des Locus *305J7-T7* (GenBank AF170276; Lese et al. 1999) auf Aberrationen untersucht. Dieser kartiert innerhalb einer maximalen Distanz von 190 kb zum Telomer 9p (Abb. 6) und ist in Relation zum eigentlichen Telomer und den telomerassoziierten

Wiederholungen (TAR) die am weitesten distal gelegene spezifische Sequenz, die bislang für den Subtelomerbereich von 9p bekannt ist.

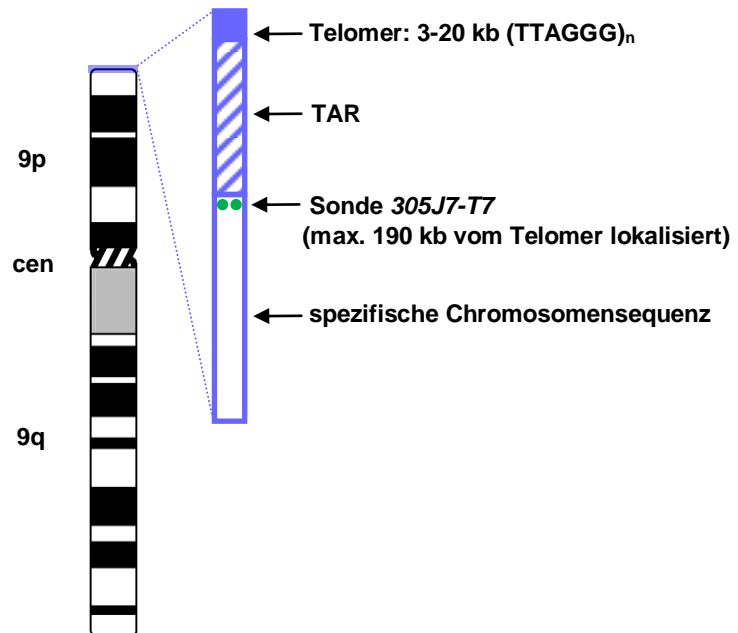


Abb. 6: Kartierung der subtelomerischen FISH-Sonde 305J7-T7.

Links: Ideogramm von Chromosom 9. Rechts: Schematische Ausschnittsvergrößerung des Telomerbereichs mit physikalischer Kartierung der eingesetzten FISH-Sonde (grüne Punkte). TAR=telomerassoziierte Wiederholungen.

Nachstehende Abbildungen illustrieren die Ergebnisse der FISH-Analyse (Abb. 7).

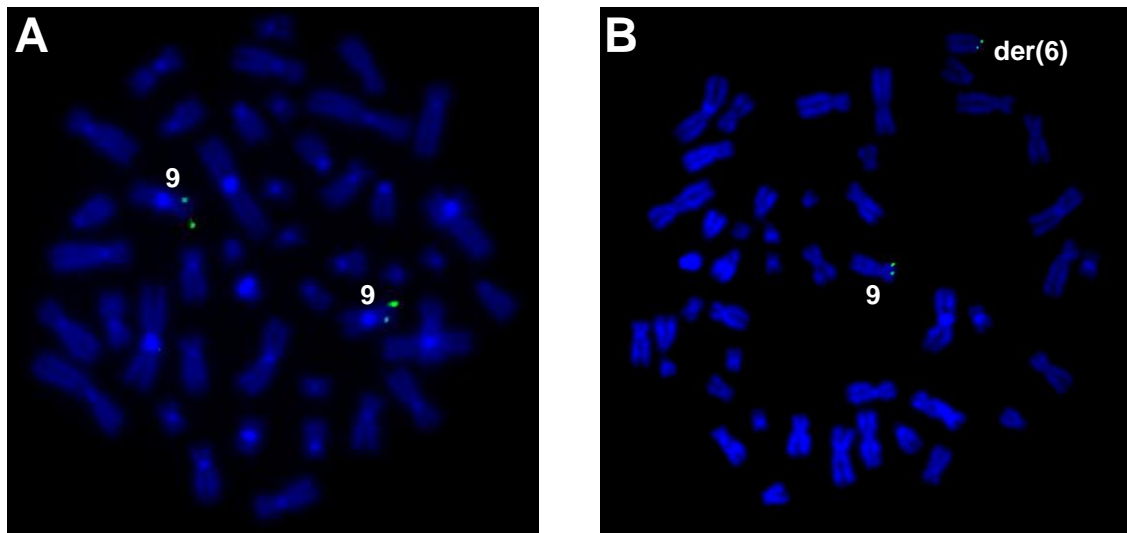


Abb. 7: FISH-Analyse mit der subtelomerischen Sonde 305J7-T7.

(A) Kontrollversuch auf Metaphasechromosomen eines klinisch unauffälligen Probanden. Die p-Telomere beider homologer Chromosomen 9 zeigen das erwartete spezifische Signal. (B) Mit den Patientenchromosomen als Zielnukleinsäure hybridisiert die Sonde auf Chromosom 9 sowie dem derivativen Chromosom der(6) und liegt daher distal des Bruchpunktes.

Nach Auswertung von 50 Metaphasen zeigt sich der strukturelle Subtelomerbereich 9p im Rahmen des Auflösungsvermögens dieser Methode intakt (keine Deletionen, Duplikationen, Translokationen). Darüber hinaus lässt sich feststellen, dass der Locus *305J7-T7* bei dem Patienten auf das derivative Chromosom 6 transloziert ist, deshalb musste der Translokationsbruchpunkt in 9p24 auf genomischer Ebene weiter proximal in Richtung Zentromer gesucht werden.

3.2.2 Molekulare Charakterisierung 6p12-/9p24-spezifischer BAC-Klone

In diesem Abschnitt sind die zur Kartierung der Translokationsbruchpunkte eingesetzten 27 BACs nebst molekularer Charakterisierung aufgelistet (Tab. 3).

FISH-Analysen

Um physikalische Karten der Bruchpunktregionen zu erhalten, wurde die zytogenetische Zuordnung aller BAC-Klone zu 6p12 und 9p24 durch FISH-Analysen auf Metaphasechromosomen von klinisch und zytogenetisch unauffälligen Probanden überprüft. Die in den Datenbanken angegebene chromosomale Zuordnung konnte bei allen 27 getesteten Klonen bestätigt werden. Die Identifikation der Metaphasechromosomen in der Fluoreszenzmikroskopie ist anhand der Größe, der Position des Zentromers und des Bandenmusters der DAPI/Propidiumiodid-Färbung möglich. Abb. 8 zeigt exemplarisch die Auswertungen der Klone *RP11-399A15* (6p12) und *RP11-147I11* (9p24).

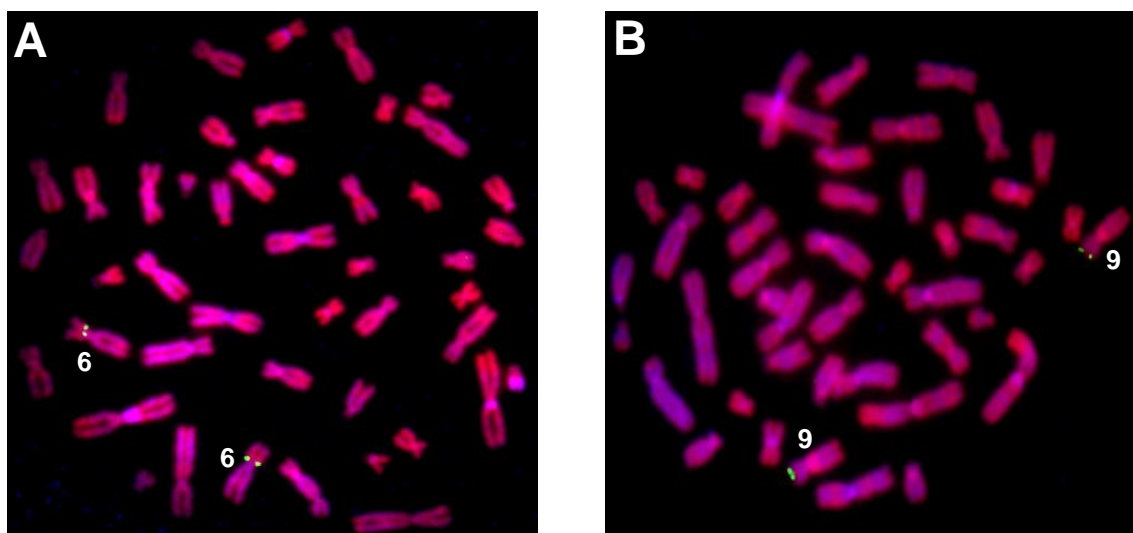


Abb. 8: Chromosomale Zuordnung der BAC-Klone mittels FISH-Analyse.

Exemplarische Darstellung von (A) *RP11-147I11* und (B) *RP11-399A15*. Das Hybridisierungssignal der eingesetzten Sonde auf den jeweiligen homologen Chromosomen 6 bzw. 9 reflektiert die chromosomale Kartierung des BAC-Klons (vgl. Tab. 3).

PFGE-Analysen

Um die molekulare Größe der Klon-Inserts zu bestimmen, wurden diese mit der Restriktionsendonuklease *NotI* aus dem Vektor geschnitten (→2.4.6) und die Fragmente mittels PFGE (→2.4.7) aufgetrennt. Durch die Spaltung kam bei jedem BAC-Klon der jeweilige Vektor als 9 kb (pBACe3.6) bzw. 7 kb (pBeloBAC1) großes Fragment im Gel zur Darstellung (→2.2.2). Alle weiteren Fragmente wurden je nach Vorhandensein von *NotI*-Erkennungssequenzen im spezifischen Insert mit den nach Datenbankrecherchen zu erwarteten Fragmentlängen verglichen. In 5 Fällen wick dabei das experimentelle Ergebnis von den Datenbankeinträgen ab (vgl. Tab. 3). Eine exemplarische Darstellung der PFGE-Ergebnisse erfolgt in Abb. 9.

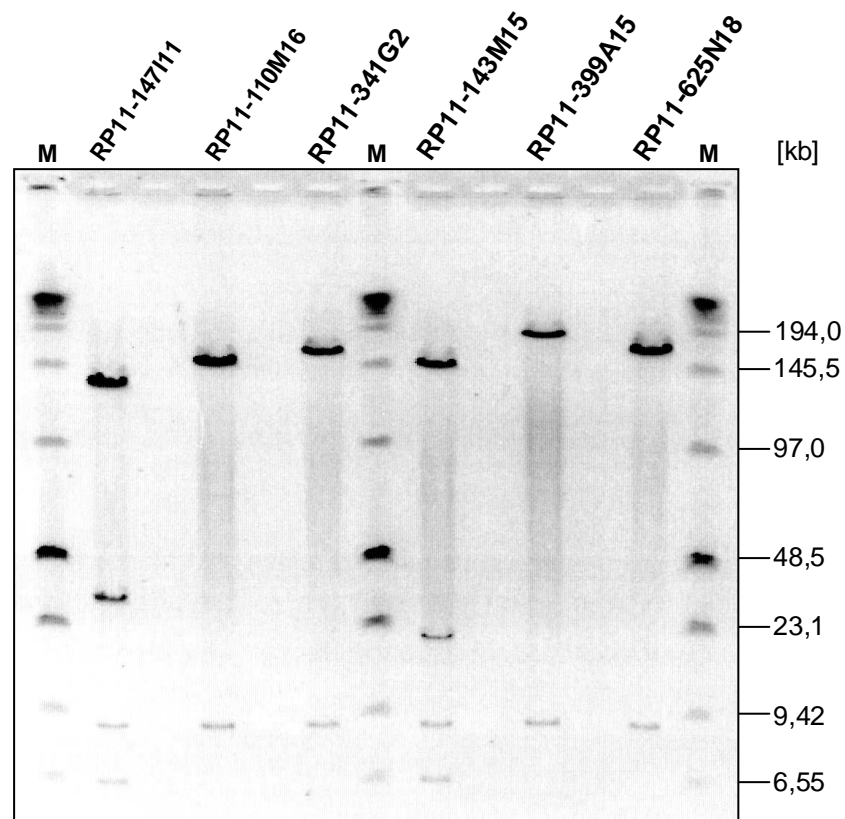


Abb. 9: PFGE nach *NotI*-Restriktion von 6 BAC-Klonen der RPCI-Bibliothek.

In allen Spuren ist die ausgeschnittene Vektorbande von ca. 9 kb zu erkennen. Bei *RP11-147I1* und *RP11-143M15* stellt sich darunter noch ein spezifisches Fragment von 6,6 kb dar (vgl. Tab. 3). Als Marker (M) diente der *Low Range PFG Marker* (New England Biolabs).

Tab. 3: Molekulare Charakterisierung der zur Bruchpunktkartierung selektierten BAC-Klone für die untersuchten Chromosomenregionen 6p12 und 9p24.

Neben molekularer Größe und Restriktionsmuster (NotI) sind zahlreiche Kartierungsdaten angegeben. Alle wesentlichen Daten wurden über eigene Experimente validiert (grau unterlegt). SC: Sanger Center, NCI: National Cancer Institute, FHCRC: Fred Hutchinson Cancer Research Center.

Ifd. Nummer	BAC-Klon (internationaler Name)	Größe in kb (Datenbank)	NotI-Restriktionsmuster	PFGE-Bestätigung	Kartierung					
					Chromosom (Datenbank)	Basenposition (UCSC Genome Browser)	Kartierungsmethode (Provider)	eigene FISH-Daten	vollständige Sequenz publiziert	ansequenziert
1	RP11-546O15	182,982	∅ Schnittstellen	ja	6p12.2–21.1	45777368–45960349	Sequenz/FISH (SC)	6p12	ja	nein
2	RP11-23E24	175,410	∅ Schnittstellen	ja	6p12.3d	48326607–48502016	Sequenz/FISH (NCI)	6p12	ja	nein
3	RP11-413D16	152,946	∅ Schnittstellen	ja	6p12.3b	49920753–50073698	Sequenz/FISH (NCI)	6p12	ja	nein
4	RP11-392A23	204,823	∅ Schnittstellen	ja	6p12	52696852–52901674	Sequenz/FISH (FHCRC)	6p12	ja	nein
5	RP11-7H16	171,960	150,774 kb	ja	6p12	53474207–53646166	BAC-Ends/FISH (FHCRC)	6p12	nein	nein
			21,186 kb							
6	RP11-362K18	162,664	∅ Schnittstellen	ja	6p12.1d	54092188–54254851	Sequenz/FISH (NCI)	6p12	ja	nein
7	RP11-625N18	164,256	∅ Schnittstellen	ja	6p12.1	54860994–55025249	BAC-Ends	6p12	nein	nein
8	CTD-2053L14	148,165	∅ Schnittstellen	ja	6p12.1	54940741–55088905	BAC-Ends	6p12	nein	ja
9	RP11-399A15	159,698	∅ Schnittstellen	~175 kb	6p12.1	55003063–55162760	Sequenz	6p12	ja	ja
10	CTD-2378K7	104,822	∅ Schnittstellen	ja	6p12.1	55088907–55193737	BAC-Ends	6p12	nein	ja
11	RP11-91E17	154,121	∅ Schnittstellen	ja	6p11.2–12	55127631–55281751	BAC-Ends/FISH (FHCRC)	6p12	nein	nein
12	RP11-146B10	∅ validen Angaben	∅ Schnittstellen	~170 kb	6p12.1	55416420–?	BAC-End/FISH (FHCRC)	6p12	nein	nein
13	RP11-111P16	171,620	∅ Schnittstellen	ja	6p12	55544177–55715796	BAC-Ends/FISH (FHCRC)	6p12	nein	nein
14	RP11-120K22	173,872	∅ Schnittstellen	ja	6p12.1c	55698507–55872378	Sequenz/FISH (NCI)	6p12	ja	nein
15	RP11-89D6	∅ validen Angaben	∅ Schnittstellen	~170 kb	6p11.1–6q11	57189193–?	BAC-End/FISH (FHCRC)	6p12	nein	nein
16	RP11-31F19	144,927	∅ Schnittstellen	~160 kb	9p24.1–24.3	537217–682143	Sequenz/FISH (SC)	9p24	ja	nein

17	RP11-130C19	197,099	∅ Schnittstellen	ja	9p24.1–24.3	615148–812246	Sequenz/FISH (SC)	9p24	ja	nein
18	RP11-143M15	179,006	147,444 kb	ja	9p23–24.3	812147–991152	Sequenz/FISH (SC)	9p24	ja	nein
			19,403 kb							
			6,675 kb							
			4,362 kb							
19	RP11-580E7	167,489	1,122 kb	ja	9p24.3	833045–1000533	BAC-Ends	9p24	nein	nein
			126,546 kb							
			28,784 kb							
			6,675 kb							
20	CTD-2208P21	144,838	4,362 kb	ja	9p24.3	879474–1024311	BAC-Ends	9p24	nein	ja
			1,122 kb							
			80,117 kb							
			52,562 kb							
21	RP11-147I11	172,871	6,675 kb	ja	9p24.3	928280–1101150	Sequenz	9p24	ja	ja
			31,311 kb							
			129,401 kb							
			4,362 kb							
22	RP11-110M16	148,091	∅ Schnittstellen	ja	9p24.3	1029428–1177518	BAC-Ends	9p24	nein	ja
23	RP11-341G2	120,698	∅ Schnittstellen	~150 kb	9p24.1–24.3	1121123–1241689	Sequenz/FISH (SC)	9p24	ja	nein
24	RP11-125B21	168,366	∅ Schnittstellen	ja	9p24.1–24.3	2296268–2464633	Sequenz/FISH (SC)	9p24	ja	nein
25	RP11-32F11	162,237	∅ Schnittstellen	ja	9p24.1–24.3	3104772–3267008	Sequenz/FISH (SC)	9p24	ja	nein

26	RP11-3H3	146,400	∅ Schnittstellen	ja	9p24.1	4770628–4917027	BAC-Ends	9p24	nein	nein
27	RP11-28A9	175,323	79,881 kb	ja	9.24.1	5246930–5422252	BAC-Ends	9p24	nein	nein
			47,379 kb							
			35,003 kb							
			12,734 kb							
			0,163 kb							
			0,163 kb							

3.2.3 FISH-Analysen zur Identifizierung Bruchpunkt-überspannender BAC-Klone

Ein wesentlicher Schritt der molekularen Bruchpunktkartierung ist die Identifizierung Bruchpunkt-überspannender Klone. Insgesamt 15 BAC-Klone spezifisch für 6p12 und 12 BACs für 9p24 dienten als Sonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung auf Metaphasechromosomen des Patienten. Die Hybridisierungssignale und deren Verteilung auf die an der Translokation beteiligten derivativen Chromosomen 6 und 9 spiegeln die Lage der Klone zum Bruchpunkt wider. Die chromosomale Zuordnung wird durch ein Signal auf dem jeweiligen „normalen“ homologen Chromosom bestätigt. Hybridisiert beispielsweise ein 6p12-spezifischer Klon zusätzlich auf dem derivativen Chromosom 9, so ist die Ziel-Sequenz des Patienten an diesem Locus transloziert und der Bruchpunkt findet sich weiter Richtung Zentromer auf Chromosom 6.

Eingrenzung des 6p12-Bruchpunktes

FISH-Analysen mit den Klonen *RP11-546O15*, *RP11-23E24*, *RP11-413D16*, *RP11-392A23*, *RP11-7H16*, *RP11-362K18*, *RP11-625N18* und *CTD-2053L14* zeigten Hybridisierungssignale auf Chromosom 6 sowie dem derivativen Chromosom 9 der Translokation. Die DNA-Sequenz dieser BACs kartiert damit distal des 6p12-Bruchpunktes in Richtung Telomer (Abb. 11).

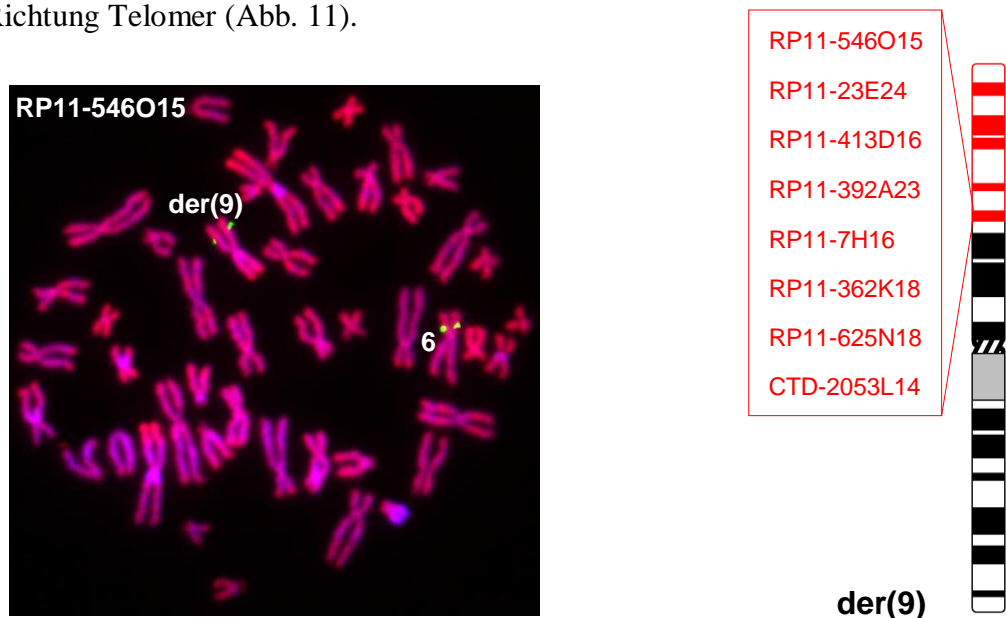


Abb. 11: FISH-Analyse mit BACs, die distal des 6p12-Bruchpunktes kartieren.

Rechts: Schematische Darstellung der hybridisierten BAC-Sequenzen auf dem derivativen Chromosom 9 der untersuchten Translokation $t(6;9)(p12;p24)$. Rot dargestellt ist der hierhin translozierte Anteil von Chromosom 6. Links: Das fluoreszenzmikroskopische Bild nach Hybridisierung (hier exemplarisch Klon *RP11-546O15*) zeigt Signale auf Chromosom 6 und *der(9)*.

Die Sequenz der Klone *CTD-2378K7*, *RP11-91E17*, *RP11-146B10*, *RP11-111P16*, *RP11-120K22* und *RP11-89D6* ist dagegen auf dem derivativen Chromosom 6 verblieben und kartiert folglich proximal des Bruchpunktes in Richtung Zentromer (Abb. 12).

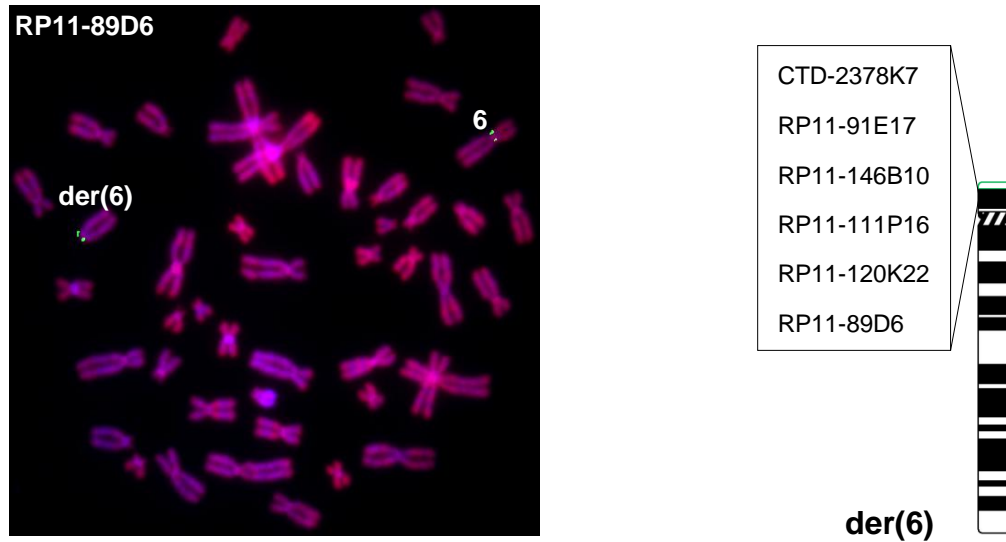


Abb. 12: FISH-Analyse mit BACs, die proximal des 6p12-Bruchpunktes kartieren.

Rechts: Schematische Darstellung der hybridisierten BAC-Sequenzen auf dem derivativen Chromosom 6 der untersuchten Translokation $t(6;9)(p12;p24)$. Grün dargestellt ist der hierhin translozierte Anteil von Chromosom 9. Links: Das fluoreszenzmikroskopische Bild nach Hybridisierung (hier exemplarisch Klon *RP11-89D6*) zeigt Signale auf Chromosom 6 und *der(6)*.

RP11-399A15 konnte durch gesplittete Signale auf den derivativen Chromosomen *der(6)* und *der(9)* als Bruchpunkt-überspannend identifiziert werden (Abb. 13).

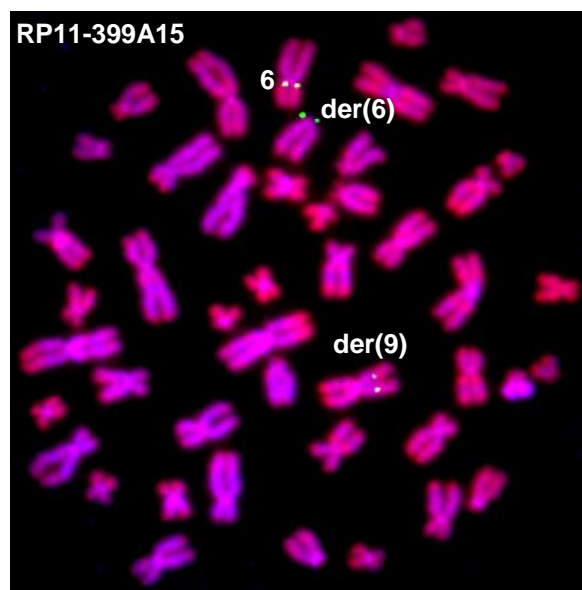


Abb. 13: FISH-Bild des den 6p12.1-Bruchpunkt überspannenden BAC-Klons *RP11-399A15*.

Zu erkennen sind die gesplitteten Hybridisierungssignale auf beiden derivativen Chromosomen.

Entsprechend der experimentell ermittelten Größe des Inserts von *RP11-399A15* (vgl. Tab. 3) lässt sich der 6p12-Bruchpunkt somit auf einen Bereich von ca. 175 kb eingrenzen. Durch Kombination der FISH-Daten mit denen der molekularen Charakterisierung wurde eine resultierende physikalische Karte der genomischen Bruchpunktregion erstellt (Abb. 14). Diese illustriert die Lage der untersuchten BAC-Klone zueinander, sowie deren Position relativ zu den Translokationsbruchpunkten. *RP11-625N18*, *CTD-2035L14*, *RP11-399A15*, *CTD-2378K7* sowie *RP11-91E17* bilden dabei ein Contig überlappender Klone in einem Bereich von 420 kb um die Bruchpunktregion innerhalb der Chromosomenbande 6p12.1. Außerdem wird ersichtlich, dass das humane Gen *RUNX2* etwa 10 Mb distal der Bruchstelle lokalisiert ist.

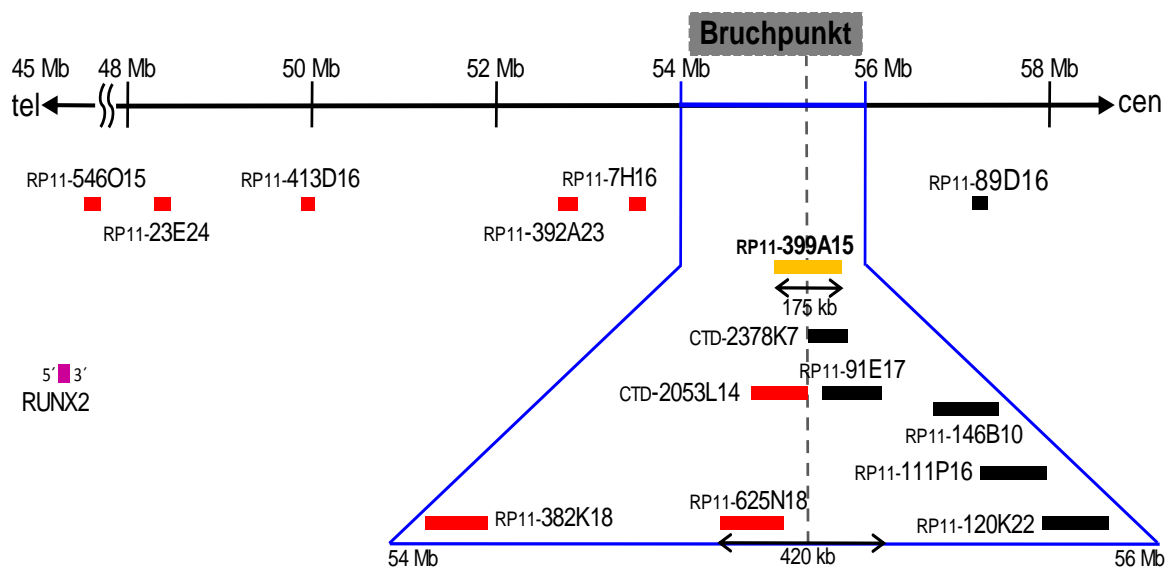


Abb. 14: Physikalische Karte des 6p12.1-Bruchpunktes.

Die Ergebnisse der FISH-Analysen werden durch die unterschiedliche Farbgestaltung wiedergegeben. **Rot:** Klone distal des Bruchpunktes. **Schwarz:** Klone proximal des Bruchpunktes. **Gelb:** Bruchpunkt-überspannender Klon *RP11-399A15*. Die Position des Bruchpunktes ist als vertikale gestrichelte Linie angezeigt. Ein 420 kb umfassendes Contig überlappender Klone um den Bruchpunkt befindet sich innerhalb der blau umrandeten Vergrößerungszone im Bereich der Basenpositionen 54 bis 56 Mb auf Chromosom 6. Die Position von *RUNX2* (violetter Balken) zeigt das Lageverhältnis zum Bruchpunkt an.

Eingrenzung des 9p24-Bruchpunktes

Die Vorgehensweise gestaltete sich analog zu 6p12. FISH-Analysen mit den Klonen *RP11-31F19*, *RP11-130C19*, *RP11-143M15*, *RP11-580E7* und *CTD-2208P21* zeigten Hybridisierungssignale auf Chromosom 9 sowie dem derivativen Chromosom 6 der Translokation. Die DNA-Sequenz dieser BACs kartiert damit distal des 9p24-Bruchpunktes in Richtung Telomer (Abb. 15).

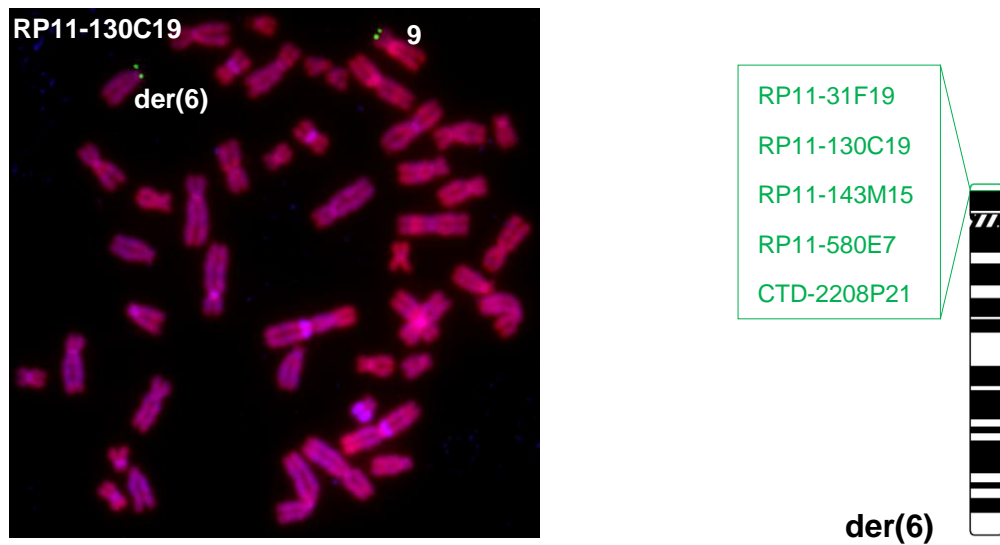


Abb. 15: FISH-Analyse mit BACs, die distal des 9p24-Bruchpunktes kartieren.

Rechts: Schematische Darstellung der hybridisierten BAC-Sequenzen auf dem derivativen Chromosom 6 der untersuchten Translokation $t(6;9)(p12;p24)$. Grün dargestellt ist der hierhin translozierte Anteil von Chromosom 9. Links: Das fluoreszenzmikroskopische Bild nach Hybridisierung (hier exemplarisch Klon *RP11-130C19*) zeigt Signale auf Chromosom 9 und *der(6)*.

Die Sequenz der Klone *RP11-110M16*, *RP11-341G2*, *RP11-125B21*, *RP11-32F11*, *RP11-3H3* und *RP11-28A9* ist dagegen auf dem derivativen Chromosom 9 verblieben und kartiert folglich proximal des Bruchpunktes in Richtung Zentromer (Abb. 16).

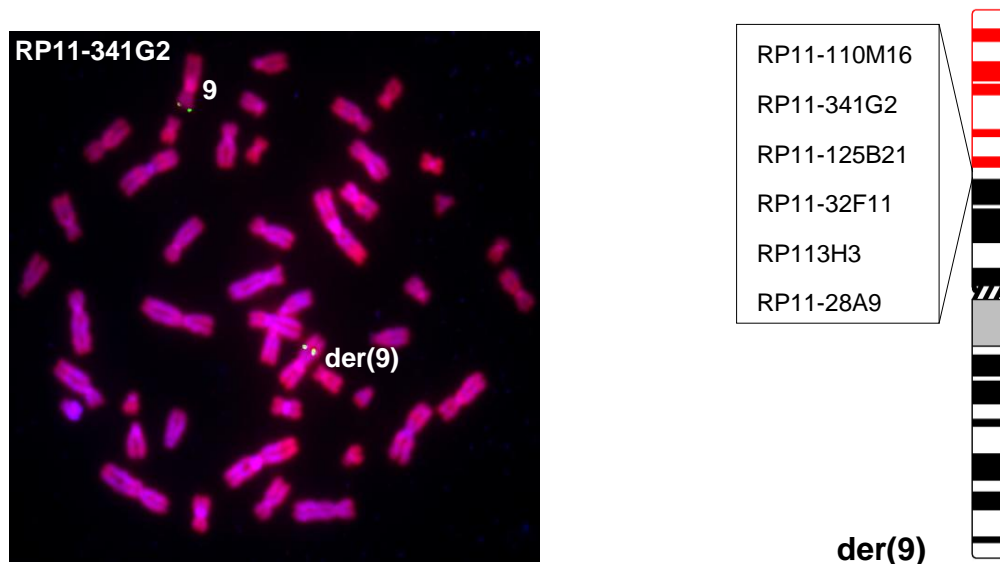


Abb. 16: FISH-Analyse mit BACs, die proximal des 9p24-Bruchpunktes kartieren.

Rechts: Schematische Darstellung der hybridisierten BAC-Sequenzen auf dem derivativen Chromosom 9 der untersuchten Translokation $t(6;9)(p12;p24)$. Rot dargestellt ist der hierhin translozierte Anteil von Chromosom 6. Links: Das fluoreszenzmikroskopische Bild nach Hybridisierung (hier exemplarisch Klon *RP11-341G2*) zeigt Signale auf Chromosom 9 und *der(9)*.

RP11-147111 konnte durch gesplittete Signale auf den derivativen Chromosomen der(6) und der(9) als Bruchpunkt-überspannend identifiziert werden (Abb. 17).

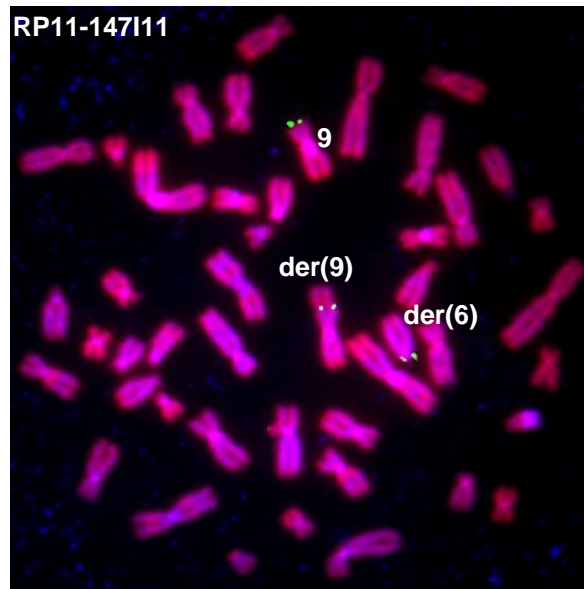


Abb. 17: FISH-Bild des den 9p24.3-Bruchpunkt überspannenden BAC-Klons *RP11-147111*.

Zu erkennen sind die gesplitteten Hybridisierungssignale auf beiden derivativen Chromosomen.

Entsprechend der experimentell ermittelten Größe des Klon-Inserts (vgl. Tab. 3) lässt sich der 9p24-Bruchpunkt somit auf einen Bereich von ca. 173 kb eingrenzen. Abb. 18 stellt die physikalische Karte der Bruchpunktregion dar. *RP11-143M15*, *RP11-580E7*, *CTD-2208P21*, *RP11-147111*, *RP11-110M16* sowie *RP11-341G2* bilden dabei ein Contig überlappender Klone in einem Bereich von 430 kb um die Bruchpunktregion innerhalb der Chromosomenbande 9p24.3. Außerdem wird ersichtlich, dass das humane Gen *JAK2* etwa 4 Mb proximal der Bruchstelle lokalisiert ist.

In Zusammenschau der bis hierhin dargestellten FISH-Ergebnisse kann der ISCN-Karyotyp nach Identifizierung Bruchpunkt-überspannender BAC-Klone wie folgt ergänzt werden: 46,XY.ish t(6;9)(p12.1;p24.3)(*RP11-399A15sp*;*RP11-147111sp*).

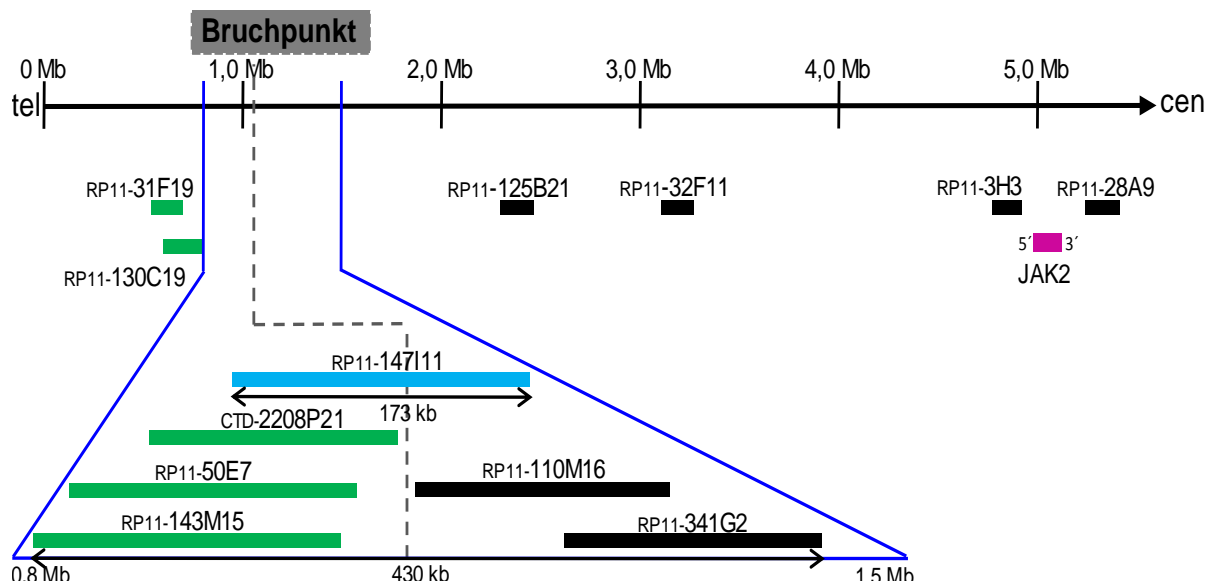


Abb. 18: Physikalische Karte des 9p24.3-Bruchpunktes.

Die Ergebnisse der FISH-Analysen werden durch die unterschiedliche Farbgestaltung wiedergegeben. **Grün:** Klone distal des Bruchpunktes. **Schwarz:** Klone proximal des Bruchpunktes. **Hellblau:** Bruchpunkt-überspannender Klon *RP11-147I11*. Die Position des Bruchpunktes ist als vertikale gestrichelte Linie angezeigt. Ein 430 kb umfassendes Contig überlappender Klone um den Bruchpunkt befindet sich innerhalb der blau umrandeten Vergrößerungszone im Bereich der Basenpositionen 0,8 bis 1,5 Mb auf Chromosom 9. Die Position von *JAK2* (violetter Balken) zeigt das Lageverhältnis zum Bruchpunkt an.

3.2.4 Feinkartierung mittels *long range* PCR generierter FISH-Sonden

Nachdem die Translokationsbruchpunkte auf ein chromosomales Intervall von 175 kb (6p12.1) bzw. 173 kb (9p24.3) kartiert werden konnten, wurde im nächsten Schritt angestrebt, die Bruchpunktregionen noch weiter einzuschränken. Diese Feinkartierung gelang durch FISH-Analysen mittels LRPCR-generierter Subfragmente (→2.4.4) aus den die Bruchpunkte überspannenden BAC-Klonen *RP11-399A15* und *RP11-147I11*. Für 6p12.1 hatten die bisherigen FISH-Analysen ergeben, dass der zu erwartende Bruchpunkt innerhalb der genomischen Sequenz zwischen den benachbarten Klonen *CTD-2053L14* (kartiert distal des Bruchpunktes) und *CTD-2378K7* (kartiert proximal des Bruchpunktes) liegen muss, die mit *RP11-399A15* überlappen (Abb. 19). Gleiche Überlegungen wurden für 9p24.3 angestellt, wo der definitive Bruchpunkt zwischen den benachbarten Klonen *CTD-2208P21* (kartiert distal des Bruchpunktes) und *RP11-110M16* (kartiert proximal des Bruchpunktes), die mit *RP11-147I11* überlappen, zu finden sein wird (Abb. 20).

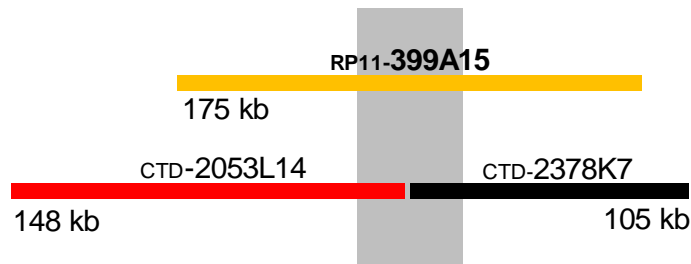


Abb. 19: Partielle schematische Darstellung der zu erwartenden Bruchpunktregion 6p12.1 zwischen den BAC-Klonen *CTD-2053L14* und *CTD-2378K7*.

Die BACs sind als farbige Balken (**rot**: FISH-Kartierung distal des Bruchpunktes, **schwarz**: proximal des Bruchpunktes, **gelb**: Bruchpunkt-überspannend) mit ihrem Namen darüber und der Größe darunter eingezeichnet. Innerhalb der grauen Box sollte der Bruchpunkt durch weiterführende FISH-Analysen mit LRPCR-Subfragmenten weiter eingegrenzt werden.

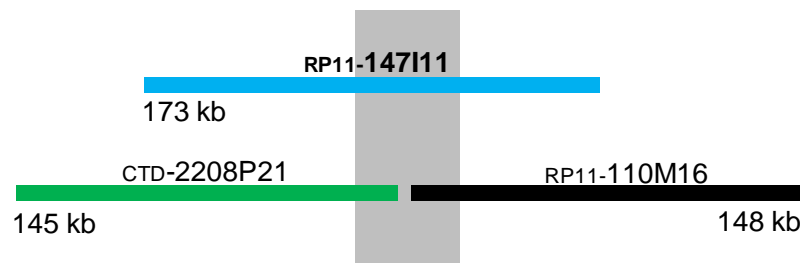


Abb. 20: Partielle schematische Darstellung der zu erwartenden Bruchpunktregion 9p24.3 zwischen den BAC-Klonen *CTD-2208P21* und *RP110M16*.

Die BACs sind als farbige Balken (**grün**: FISH-Kartierung distal des Bruchpunktes, **schwarz**: proximal des Bruchpunktes, **hellblau**: Bruchpunkt-überspannend) mit ihrem Namen darüber und der Größe darunter eingezeichnet. Innerhalb der grauen Box sollte der Bruchpunkt durch weiterführende FISH-Analysen mit LRPCR-Subfragmenten weiter eingegrenzt werden.

Da die DNA-Sequenz der Klone bekannt und hinreichend bestätigt ist, konnten durch die Wahl geeigneter Primer (→2.2.4) die in Tab. 4 dokumentierten spezifischen PCR-Produkte aus den kritischen Regionen bekannter molekularer Größe (11 – 12 kb) amplifiziert und nach Überprüfung von erwarteter Größe (Abb. 21) und zytogenetischer Kartierung (Abb. 22) auf Patientenmaterial eingesetzt werden.

Tab. 4: Molekulare Charakterisierung der zur FISH-Analyse eingesetzten LRPCR-Produkte.

LRPCR-Produkt	molekulare Größe in bp (vgl. Abb. 21)	Kartierung	
		chromosomal	Basenposition (UCSC Genome Browser)
399A15-A (6A)	10 978	6p12.1	55087777–55098754
147I11-A (9A)	12 301	9p24.3	973449–985749
147I11-B (9B)	11 234	9p24.3	999678–1010912
147I11-C (9C)	12 331	9p24.3	1019201–1031531

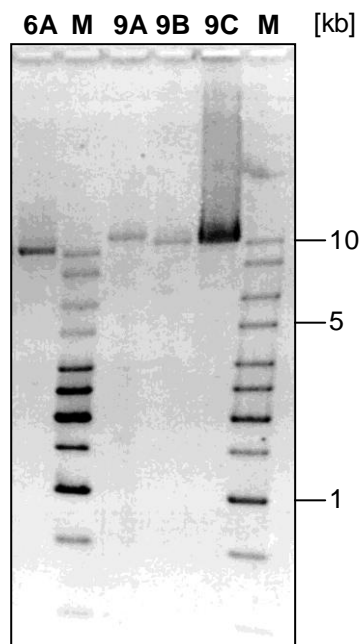


Abb. 21: Agarosegel-Elektrophorese mit LRPCR-Produkten zur molekularen Größenbestimmung.

Die spezifischen Amplifikate sind oberhalb der Gelspuren mit ihrem Kurznamen (vgl. Tab. 4) bezeichnet. Nach Größenvergleich mit Datenbankeinträgen wurden sie aus dem Gel ausgeschnitten und für die Verwendung in der FISH-Analyse isoliert. Als Marker (M) diente eine 1-kb-DNA-Leiter.

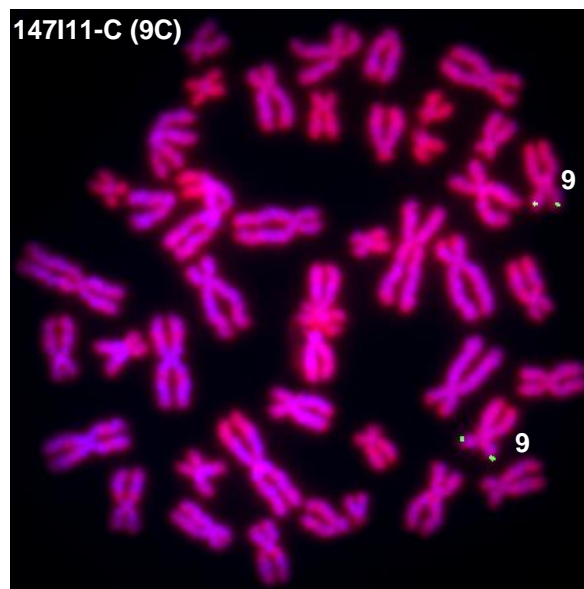


Abb. 22: Exemplarische Darstellung der chromosomalen Zuordnung von LRPCR-Produkt 147111-C (9C) auf 9p24 mittels FISH-Analyse.

Die Chromosomen stammen von einer klinisch unauffälligen Kontrollperson.

Die Ergebnisse der FISH-Analysen identifizieren das aus der Sequenz von *RP11-399A15* abgeleitete Fragment *399A15-A (6A)* als Bruchpunkt-überspannend (Abb. 23).

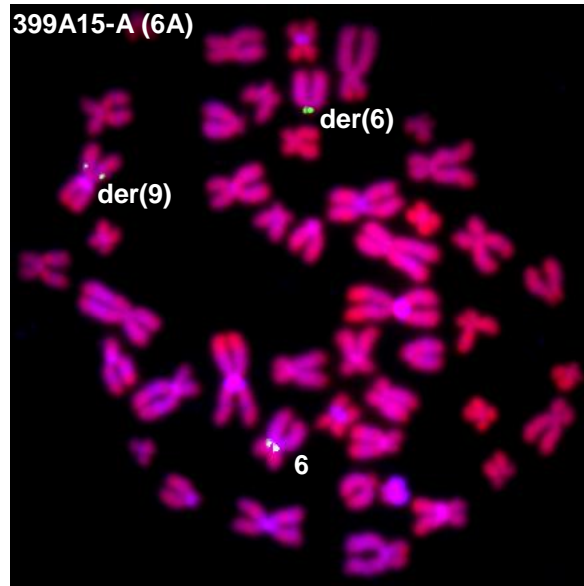


Abb. 23: Identifizierung von *399A15-A (6A)* als 6p12.1-Bruchpunkt-überspannendes LRPCR-Fragment.

Das fluoreszenzmikroskopische Bild zeigt (gesplittete) Signale auf dem normalen Chromosom 6 sowie den beiden derivativen Chromosomen *der(6)* und *der(9)* der untersuchten Translokation.

Die 6p12.1-Bruchpunktregion kann somit auf einen Bereich von 11 kb (Basenpaarposition 55.087.777 – 55.098.754) eingeschränkt werden (Abb.24).

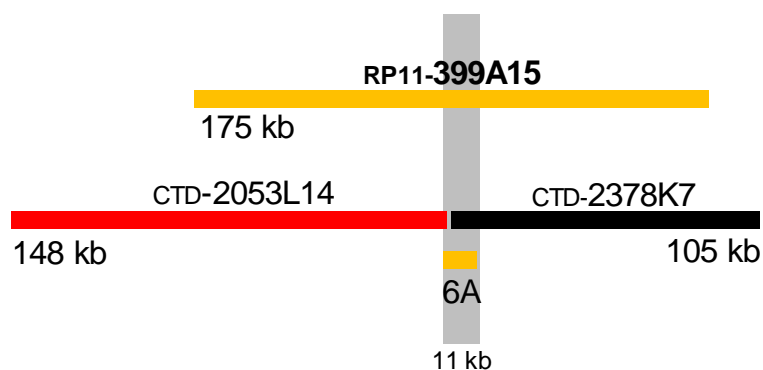


Abb. 24: Physikalische Feinkartierung des 6p12.1-Bruchpunktes.

Die BACs sowie das LRPCR-Fragment *399A15-A (6A)* sind als farbige Balken (**rot**: FISH-Kartierung distal des Bruchpunktes, **schwarz**: proximal des Bruchpunktes, **gelb**: Bruchpunkt-überspannend) eingezeichnet. *6A* (molekulare Größe ca. 10,978 kb) überspannt den Bruchpunkt und grenzt ihn daher auf etwa 11 kb ein (graue Box).

Alle für 9p24.3 getesteten Fragmente wurden durch die FISH-Analysen distal des 9p24.3-Bruchpunktes positioniert (Abb. 25). Ein Bruchpunkt-überspannendes Fragment konnte nicht identifiziert werden.

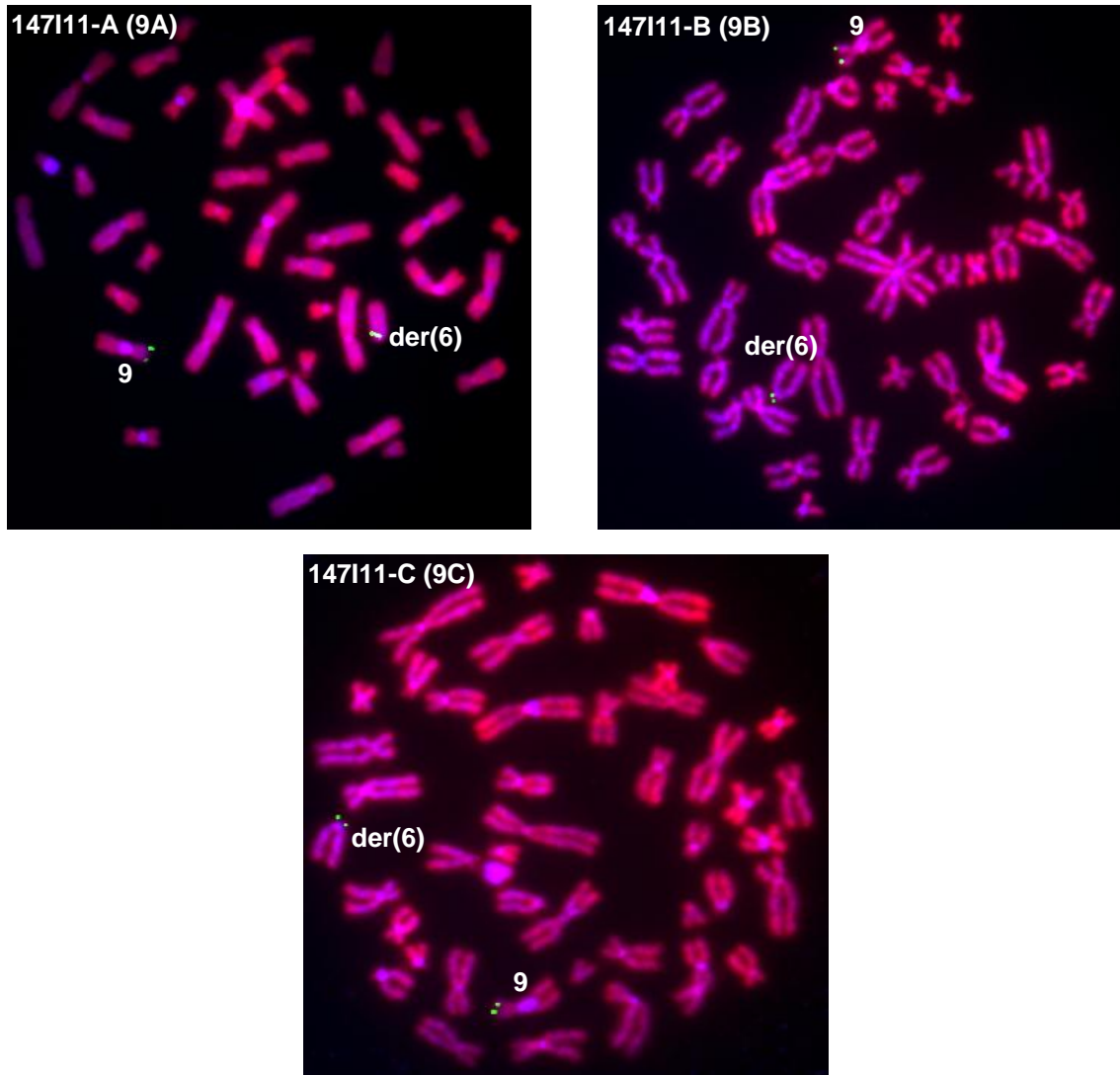


Abb. 25: FISH-Analyse mit den 9p24.3 spezifischen LRPCR-Produkten 9A, 9B und 9C.

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder illustrieren durch die Verteilung der Hybridisierungssignale auf dem normalen Chromosom 9 und dem derivaten Chromosom der(6), dass diese Sequenzen alle distal des Bruchpunktes kartieren.

3.2.5 Identifizierung und FISH-Kartierung eines DMRT2-spezifischen cDNA-Klons

Durch die Überlappung des von *RP11-147111* abgeleiteten LRPCR-Produktes *147111-C* (9C) (FISH-Kartierung distal des Bruchpunktes) mit dem BAC-Klon *RP11-110M16* (FISH-Kartierung proximal des Bruchpunktes) wird die 9p24.3-Bruchpunktregion ohne Identifizierung eines den Bruchpunkt überspannenden Fragmentes auf einen genom-

schen Bereich von etwa 10 kb eingengt, dessen proximales Ende an das 5'-Ende des Gens DMRT2 (*doublesex and mab-3 related transcription factor*) grenzt (Abb. 26).

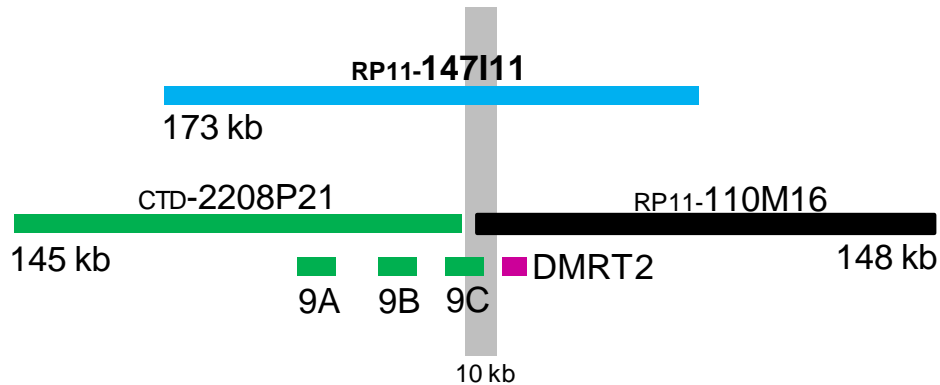


Abb. 26: Physikalische Feinkartierung des 9p24.3-Bruchpunktes.

Die BACs sowie die LRPCR-Fragmente *14711-A (9A)*, *14611-B (9B)* und *14711-C (9C)* sind als farbige Balken (**grün**: FISH-Kartierung distal des Bruchpunktes, **schwarz**: proximal des Bruchpunktes, **hellblau**: Bruchpunkt-überspannend) eingezeichnet. Das humane Gen DMRT2 (violetter Balken von rechts nach links in 5'-3'-Orientierung) demarkiert das proximale Ende der auf etwa 10 kb (graue Box) eingegrenzten Bruchpunktregion.

Um experimentelle Daten über die Lage von DMRT2 relativ zum 9p24.3-Bruchpunkt zu erhalten, wurde mittels Datenbankrecherche der für DMRT2 codierende cDNA-Klon *IRAKp961C1849Q* (molekulare Größe: 2,398 kb) selektiert und einer FISH-Analyse unterzogen (Abb. 27).

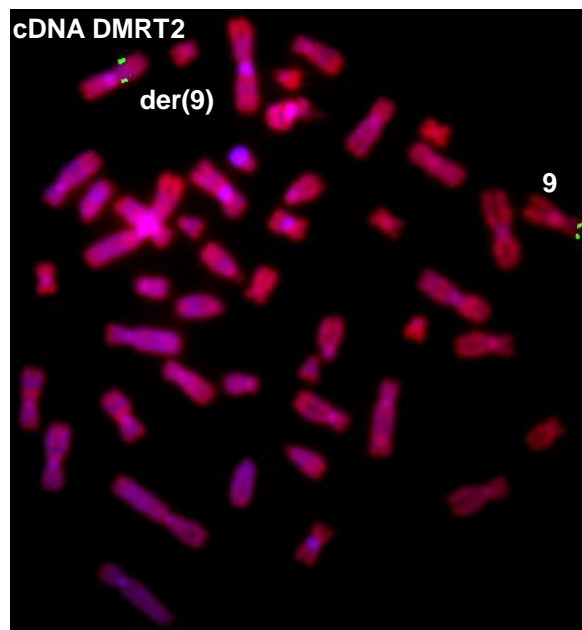


Abb. 27: FISH-Analyse mit einem cDNA-Klon für DMRT2.

Das fluoreszenzmikroskopische Bilder illustriert durch die Verteilung der Hybridisierungssignale auf dem normalen Chromosom 9 und dem derivaten Chromosom der(9), dass DMRT2 proximal des Bruchpunktes kartiert und bei diesem Patienten nicht deletiert ist.

Die Sequenz des untersuchten cDNA-Klons ist proximal des Bruchpunktes lokalisiert und deckt nach BLAST-Analysen einen Bereich von 7,192 kb auf genomischer Ebene ab.

Mit diesem experimentellen Ansatz gelang es, die Lokalisation des 9p24.3-Bruchpunkt in einem etwa 8 kb großen Bereich zwischen dem distalen Ende des LRPCR-Fragmentes *147III-C (9C)* und dem 5'-Ende von *DMRT2* zu bestätigen (Abb. 28, 29) und gleichzeitig eine das komplette Gen umfassende Deletion auszuschließen.

3.2.6 Resultierende Klon-Contigs der eingegrenzten Kandidatenregionen

Alle Ergebnisse der molekularzytogenetischen (Fein-)kartierung der Translokationsbruchpunkte sind in Abb. 28 synoptisch dargestellt. Die Klon-Contigs der Bruchpunktregionen waren Ausgangspunkt für eine weiterführende *in-silico*-Analyse dieser genomischen Abschnitte. Hauptsächlich sollten darin enthaltene Gene/Transkripte erfasst werden (→3.3), um schließlich deren Status als Kandidatengen für die Pathogenese der B-CLL zu diskutieren. Zusammenfassend weisen die FISH-Analysen darauf hin, dass es bei dem Studienpatienten – die derzeitigen Datenbankeinträge berücksichtigend – durch die chromosomale Aberration nicht zu einer Unterbrechung bekannter Gene gekommen ist. Im Rahmen des räumlichen Auflösungsvermögens der Metaphase-FISH fand sich darüber hinaus kein Hinweis für ein Vorliegen weiterer komplexer chromosomaler Umstrukturierungen oder submikroskopischer Deletionen in unmittelbarer Umgebung der beiden Bruchpunkte.

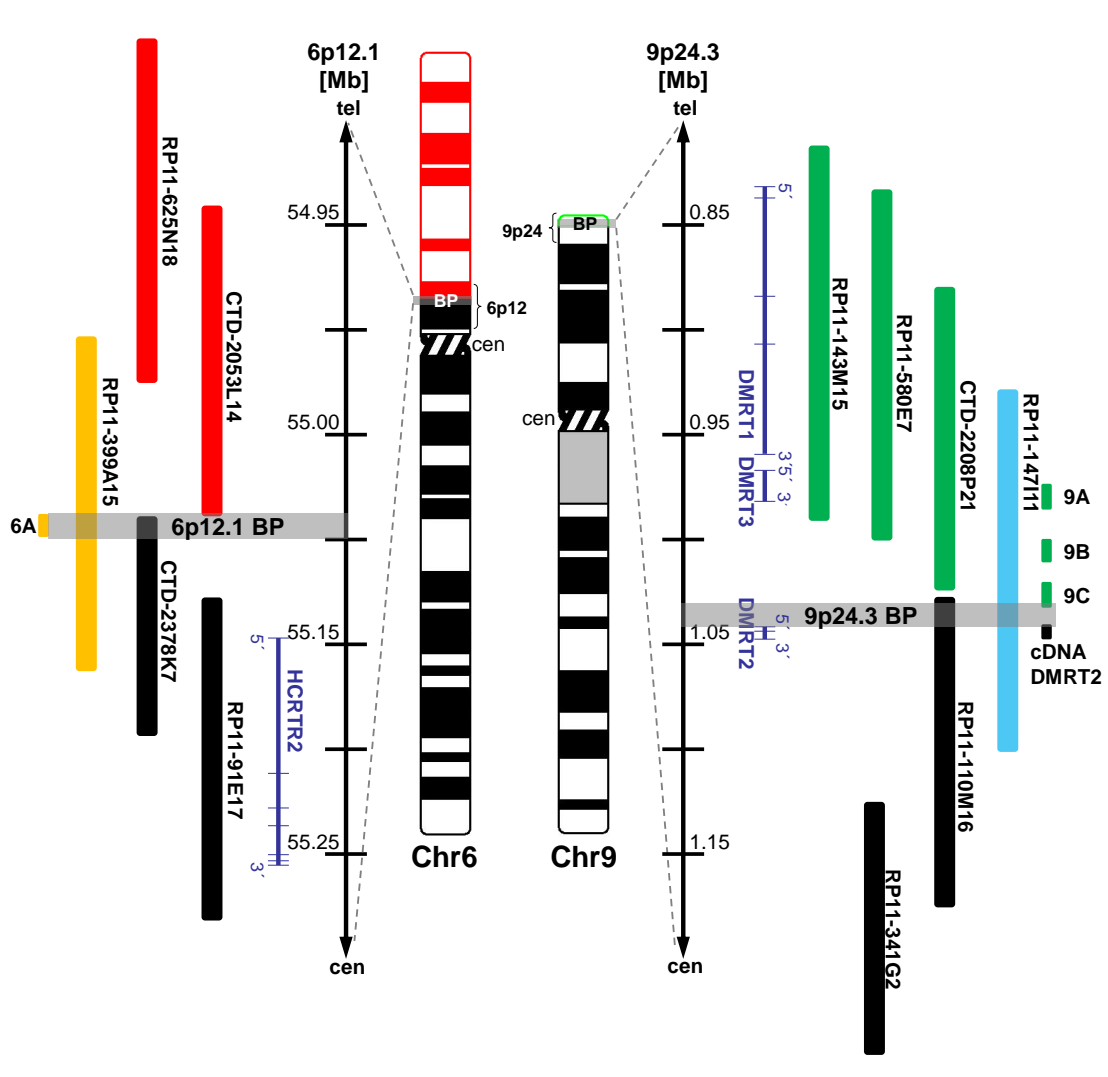


Abb. 28: Synopsis der physikalischen Bruchpunktkarten 6p12.1 und 9p24.3 nach FISH-Analysen.

Die mittig eingezeichneten Ideogramme der Chromosomen Chr(6) und Chr(9) illustrieren die balancierte Translokation $t(6;9)(p12;p24)$. Rot gekennzeichnete Banden (6p12→pter) sind lichtmikroskopisch auf der(9), die grüne Bande (9p24) auf der(6) transloziert. Jeweils rechts und links finden sich Ausschnittvergrößerungen der zytogenetischen Bruchpunktregionen (BP), die durch FISH-Analysen molekular eingegrenzt wurden (graue Boxen). Die Klon-Contigs (BACs, LRPCR-Fragmente 6A, 9A, 9B und 9Cs, *DMRT2* cDNA) sind als teils überlappende, vertikale Balken dargestellt. Die Farbgebung spiegelt analog zu den vorherigen Abbildungen die Ergebnisse der FISH-Analysen wider (**rot** bzw. **grün**: Kartierung distal des Bruchpunktes, **schwarz**: Kartierung proximal des Bruchpunktes, **gelb** bzw. **hellblau**: Bruchpunkt-überspannend). Bekannte humane Gene dieser Regionen sind in blauer Farbe (Exons mit Querstrichen angedeutet) in 5'-3'-Orientierung eingezeichnet.

3.3 *In-silico*-Transkriptkarte der Kandidatenregion

Für die durch FISH-Analysen auf 11 kb eingengte Kandidatenregion innerhalb der Chromosomenbande 6p12.1 fanden sich nach *in-silico*-Recherche mit den in 2.3.1 beschriebenen Methoden keinerlei putative Transkripte, ESTs, mRNAs, miRNAs, Genvorhersagen oder CpG-Inseln. *HCRTR2* (*hypocretin receptor 2*) kartiert als nächstgele-

genes bekanntes Gen etwa 48 kb entfernt (vgl. Abb. 28). Für die Kandidatenregion auf Chromosom 9p24.3 ergibt sich folgendes Ergebnis: Neben dem maximal 8 kb entfernten Gen *DMRT2* (vgl. Abb. 26, 28) konnten die computergestützten Untersuchungen der genomischen Ebene zwei CpG-Inseln, eine mRNA, zahlreiche ESTs, ein EST-Cluster (Unigene Hs. 171043), eine Genscan-Genvorhersage und ein manuell annotiertes Havana-Transkript zuordnen (Abb. 29).

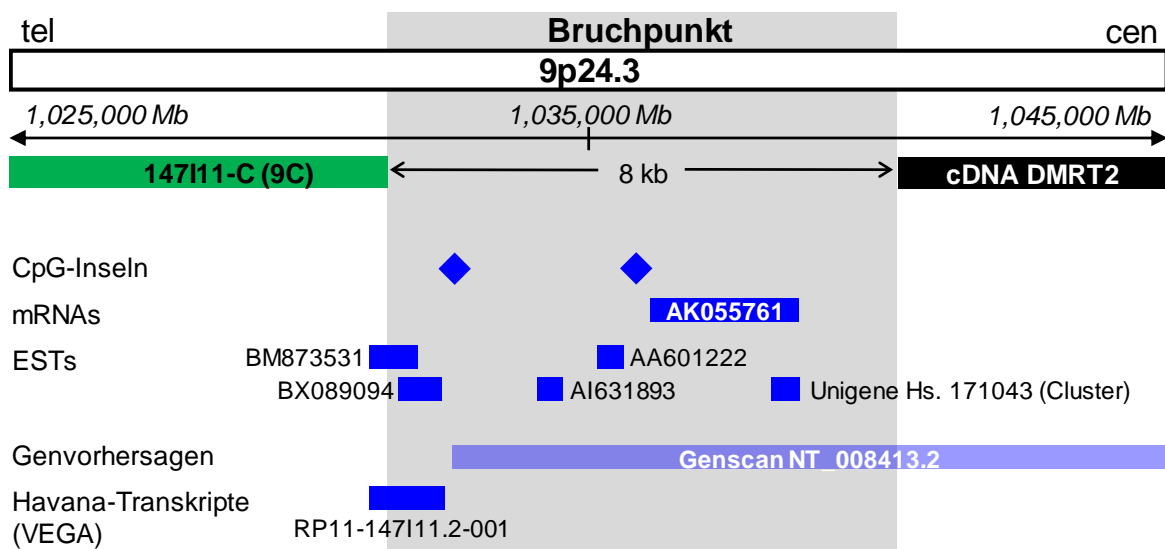


Abb. 29: In-silico-Transkriptomkarte der 9p24.3-Bruchpunktregion.

Oben ist die Chromosomenbande 9p24.3 schematisch eingezeichnet, darunter die aus der Datenbank entnommene Basenposition innerhalb des Chromosoms 9. Der grüne und schwarze Balken reflektieren hier die Ergebnisse der FISH-Analyse, wobei das LRPCR-Fragment 9C distal und der *DMRT2* cDNA-Klon proximal des Bruchpunktes kartiert. Die resultierende Bruchpunktregion (graue Box) umfasst einen Bereich von etwa 8 kb (schwarze Pfeile) auf genomischer Ebene. Im unteren Teil der Abbildung kommt die Anordnung und relative Größe von (putativen) Transkripten in dieser Kandidatenregion zur Darstellung. Die Bezeichnung von mRNAs und ESTs entspricht dem GenBank-Eintrag des NCBI.

4 Diskussion

Phänotypische Auffälligkeiten und Krankheitsmanifestationen bei Patienten mit konstitutionellen balancierten Translokationen können ein Hinweis auf eine Unterbrechung der kodierenden Sequenz von Genen im Bereich der Chromosomenbruchstellen sein (Yoshiura et al. 1998, Ikegawa et al. 1999, Praphanphoj et al. 2000). Die Pathogenese der Krankheit würde in diesem Fall entweder durch eine Haploinsuffizienz eines oder mehrerer Gene oder aufgrund eines Funktionsgewinns durch die Fusion zweier Loci beeinflusst. Letzteres ist ein häufiges Phänomen in der Tumorgenetik (Reiter et al. 2005). Denkbar ist auch eine Unterbrechung von regulatorischen Einheiten oder die Trennung eines Gens von diesen Regionen, was in beiden Fällen zu einer Alteration der Genexpression führen würde.

In dieser Arbeit wurden die chromosomalen Bruchpunkte einer konstitutionellen, lichtmikroskopisch balancierten Translokation $t(6;9)(p12;p24)$ bei einem Patienten mit chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie durch FISH-Analysen molekular charakterisiert. Diese Analyse einer Phänotyp-Genotyp-Beziehung stellt ein Beispiel für eine Positionskartierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen dar.

4.1 Eingrenzung von Kandidatenregionen

4.1.1 Bedeutung einer konstitutionellen Translokation

Die größten Fortschritte im Verständnis der molekularen Veränderungen bei der B-CLL wurden durch die Analyse pathologischer Karyotypen erzielt, die aufgrund der chromosomalen Instabilität des proliferierenden Tumorklons entstanden (Jallepalli und Lengauer 2001). Ein Problem bei der Mutationsanalyse putativer Kandidatengene in diesen Regionen ist die Kontamination der B-CLL-Proben durch normale, nicht-klonale Zellen. Vor diesem Hintergrund erscheint die molekulargenetische Analyse bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Patienten relevant, da mehrfache Untersuchungen der Metaphase-Chromosomen vor und nach zytostatischer Therapie mittels konventioneller Bänderungstechniken beweisen konnten, dass die diagnostizierte Translokation konstitutionellen Charakters, d. h. in jeder Zelle nachzuweisen ist.

4.1.2 Charakterisierung des Subtelomerbereichs 9p

Es ist bekannt, dass die telomerischen Regionen menschlicher Chromosomen die höchste Gendichte des Genoms aufweisen (Saccone et al. 1992). Des Weiteren wurde beobachtet, dass mit hämatologischen Neoplasien assoziierte Chromosomenaberrationen auch den Telomerbereich betreffen können (Tosi et al. 1999). Über die konventionelle Chromosomenbänderung lassen sich meist nur ungenaue Aussagen über die Integrität der subtelomerischen Areale treffen. Da der Bruchpunkt nach den Ergebnissen der G-Bänderung auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 in 9p24, also der am weitesten distalen Bande zu vermuten war, stellte sich die Frage, ob mit der Translokation numerische oder strukturelle Aberrationen im Telomerbereich 9p einhergehen. Eine FISH-Analyse dieser Region mit Hilfe einer subtelomerischen Sonde (→3.2.1) offenbarte jedoch keine derartigen Veränderungen.

4.1.3 Physikalische (Fein-)kartierung der Translokationsbruchpunkte

FISH-Analysen mit BAC-Klonen können heutzutage gezielt eingesetzt werden, um die Bruchstellen struktureller Chromosomenaberrationen (Translokationen, Inversionen) durch die Identifizierung von Klonen, welche ein sogenanntes gesplittetes Signal auf den derivativen Chromosomen zeigen, einzugrenzen (Kurotaki et al. 2002, Hill et al. 2003, Pichon et al. 2004). Das Klonieren von Subfragmenten der Bruchpunkt-überspannenden BAC-Klone ist ein molekularbiologisches Verfahren, um die Bruchregion struktureller Chromosomenaberrationen mittels FISH-Analysen weiter einzugrenzen und somit das Contig der Kandidatenregion zu verfeinern. Für die Feinkartierung wurde hier als Verfahren die *long range* Polymerasekettenreaktion (LRPCR) angewandt, die gegenüber der Klonierung auf Zellbasis (Transformation rekombinanter DNA) den Vorteil der gleichzeitigen Isolierung und Amplifizierung der gewünschten spezifischen Subfragmente bei einer maximalen Produktgröße von 10 – 15 kb bietet. Der Einsatz derart kleiner LRPCR-generierter Nukleinsäurefragmente in FISH-Kartierungsexperimenten ist bislang von wenigen Arbeitsgruppen verfolgt worden, die sich intensiv auf dem Gebiet der Molekularzytogenetik betätigen (Mansouri et al. 2006, Yue et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass sich die Etablierung dieses Verfahrens immer dort empfiehlt, wo eine zytogenetische Feinkartierung Grundlage für die positionsspezifische Identifizierung von Krankheitsgenen sein soll.

Der Translokationsbruchpunkt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 kann in einem ca. 11 kb großen Bereich innerhalb der Bande 6p12.1 gefunden werden, der sich mangels zuzuordnender Transkripte als „Genwüste“ darstellt. Insofern ist es unwahrscheinlich, dass es durch die Translokation zu einem Fusionstranskript gekommen ist (vgl. Abb. 30). Für die Bruchstelle auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 gelang die Kartierung innerhalb eines transkriptreichen Bereichs von 8 kb stromaufwärts des humanen Gens DMRT2 in der Bande 9p24.3.

4.1.4 Balanciertheit der Translokation

Die Ergebnisse der FISH-Analysen deuten darauf hin, dass die untersuchte konstitutionelle Translokation auf der Ebene fluoreszenzmikroskopischer Auflösung balanciert, d. h. ohne Zugewinn oder Verlust von Erbsubstanz einhergegangen ist. Damit korreliert die durch die Bruchstellen entstandene Umstrukturierung des beteiligten chromosomalen Materials mit dem Phänotyp des Patienten. Scheinbar balancierte Translokationen weisen aber häufig Mikrodeletionen im direkten Bereich der Bruchpunkte auf (Kumar et al. 1998, Wirth et al. 1999), die sich erst durch eine Sequenzierung offenbaren. Die Korrelation von Phänotyp und eingegrenzter genomischer Kandidatenregion ginge in diesem Fall jedoch nicht verloren, lediglich der putativ schädigende Mechanismus wäre ein anderer. Darüber hinaus wurde allerdings auch von Fällen berichtet, bei denen sich zusätzliche kryptische Deletionen oder Duplikationen in einiger Entfernung zum Bruchpunkt einer balancierten Translokation identifizieren ließen (Fantès et al 2003, Yue et al. 2005). Neuerdings zeigen genomweite Analysen mittels vergleichender Genomhybridisierung (CGH) auf hochauflösenden Microarrays überlappender BAC-Klone (Ishkanian et al. 2004) oder Oligonucleotide (Selzer et al. 2005), dass scheinbar balancierte Strukturanomalien sogar öfter als statistisch erwartet mit komplexen genomischen Imbalancen einhergehen. In einer molekularbiologischen Studie konnten Gribble et al. (2005) diese Beobachtung bei sechs von zehn der untersuchten Patienten mit zytogenetisch balancierten *de-novo*-Translokationen und klinisch auffälligem Phänotyp machen. Bei drei der Patienten waren die zusätzlichen genomischen Imbalancen dabei nicht innerhalb oder in der Nähe der Bruchpunktregionen, sondern auf anderen Chromosomen zu finden. Diese Befunde stützen die zunehmende Erkenntnis, dass eine Vielzahl genetisch bedingter Krankheiten als sogenannte „genomische Erkrankungen“ das Ergebnis einer komplexen Veränderung der genomumfassenden Architektur sind (Stankiewicz

und Lupski 2002). Dabei führen rekurrente Rekombinationsprozesse zwischen Regionen spezifischer, nicht-codierender DNA-Wiederholungseinheiten („low-copy-repeats“) zu einer Vielzahl chromosomaler Veränderungen und können durch die damit einhergehende Schädigung von Genmaterial den Phänotyp beeinflussen.

4.2 Kandidatengene

In-silico-Analysen zur Erfassung aller Transkripte, die innerhalb der eingegrenzten Kandidatenregionen 6p12.1 und 9p24.3 publiziert wurden, konnten kein durch das Bruchereignis direkt betroffenes, bereits bekanntes Gen identifizieren. Es ist aber möglich, dass der Translokationsprozess einen Einfluss auf die Expression von physikalisch nahegelegenen (z. B. DMRT2) oder sogar weiter distanzierten Genen (Positionseffekte) hat. Innerhalb der subtelomerischen Chromosomenbande 9p24 sind einige Gene lokalisiert, die in Transkriptionsprozesse, Zellzykluskontrolle und Tumorigenese involviert sind (→4.2.4). Beim primär mediastinalen B-Zell-Lymphom gilt 9p24 als kritische Region im Rahmen der Tumorentstehung und ist bei dieser hochmalignen Entität der Non-Hodgkin-Lymphome vom Telomer bis 6,6 Mb zentromerwärts häufig chromosomalen Imbalancen (Amplifikationen) ausgesetzt ist (Wessendorf et al. 2007). Mittels Microarray-CGH konnten die Autoren eine minimale Konsensus-Region um JAK2 und PDL2 (*programmed death ligand 2*) determinieren.

4.2.1 JAK2/RUNX2

Die bereits in der Einleitung diskutierten Kandidatengene JAK2 und RUNX2 kartieren nach molekularer Zytogenetik zu weit von den Bruchstellen entfernt, um durch die Translokation direkt oder durch einen Positionseffekt (s. u.) beeinflusst worden zu sein (Abb. 14, 18). Ein Zusammenhang zur Pathogenese der B-CLL im vorliegenden Fall ist somit unwahrscheinlich.

4.2.2 DMRT2

Unter den in Bruchpunktnähe identifizierten Transkripten erscheint das für einen Transkriptionsfaktor kodierende Gen DMRT2 in mehrfacher Hinsicht relevant:

a) Der 9p24.3-Bruchpunkt im vorliegenden Fall liegt maximal 8 kb proximal des 5'-Endes von DMRT2. Somit könnte die Expression auch durch Zerstörung oder Trennung von der Promotorregion beeinflusst sein. Die putative Promotorregion von DMRT2 wur-

de von Ottolenghi et al. (2000) innerhalb 4 kb stromaufwärts vom 5'-Ende postuliert und liegt damit innerhalb der eingegrenzten Bruchpunktregion. Durch Primer-Walking identifizierten die Autoren ein EST-Cluster (Unigene Hs. 171043; dargestellt in Abb. 29). Dass es sich hierbei um den Promotor handeln könnte, wird durch ihre Feststellungen gestützt, dass dieses *upstream*-Cluster physikalisch unabhängig von DMRT2 ist, in derselben Orientierung transkribiert wird, das Expressionsprofil sehr ähnlich erscheint und letztendlich keine offenen Leseraster oder Homologien mit Datenbanksequenzen gefunden werden konnten. Abb. 30 stellt schematisch dar, wie es durch die Translokation auf molekularer Ebene zu einer Separierung von DMRT2 von dessen putativem Promotor gekommen sein könnte.

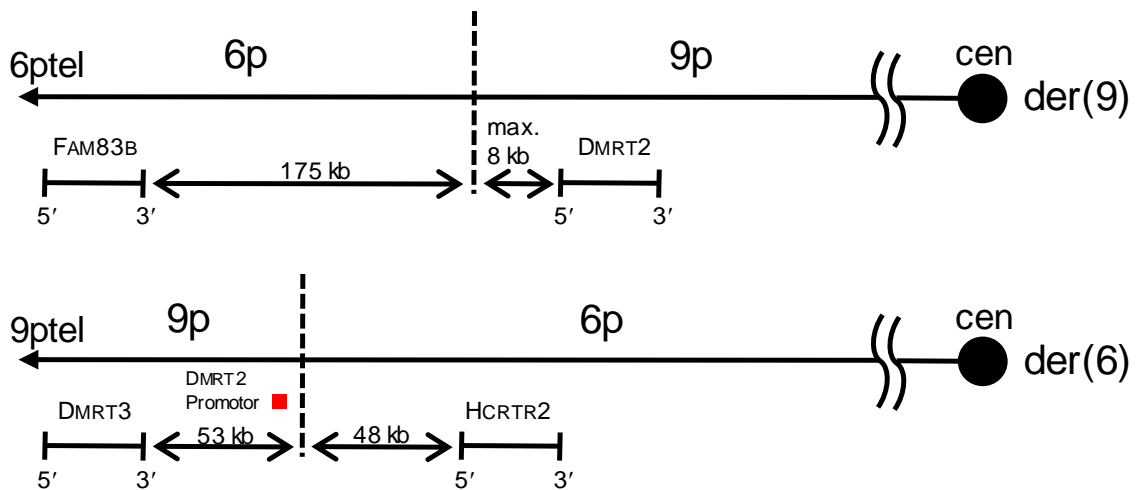


Abb. 30: Schematische Darstellung der derivativen Chromosomen der Translokation t(6;9)(p12.1;p24.3).

Die vertikale gestrichelte Linie markiert die Bruchpunkte, an denen es zur Fusion des jeweils translozierten Chromosomenteils gekommen ist. DMRT2 kartiert maximal 8 kb vom Bruchpunkt entfernt und könnte durch die Translokation vom Promotor getrennt worden sein (rotes Quadrat). Es sind die relativ zur Bruchpunktregion jeweils nächstgelegenen bekannten Gene (vgl. Tab. 5) als schwarze Striche eingezeichnet, jeweils mit Namen (oberhalb), Orientierung (unterhalb) und physikalischer Entfernung zum Bruchpunkt (Zahlen oberhalb der schwarzen Doppelpfeile). Die Bildung eines Fusionstranskriptes ist unwahrscheinlich, da *in-silico*-Analysen jeweils 175 kb distal und 48 kb proximal des 6p12-Bruchpunktes keine Transkripte auffinden konnten.

b) DMRT2 wird in der normalen CD34-Antigen positiven hämatopoetischen Stammzelle exprimiert (Gomes et al. 2001). Möglicherweise ist es als Transkriptionsfaktor in die Signaltransduktion innerhalb des Zellzyklus eingebunden (s. u.) und spielt somit eine Rolle bei Apoptosevorgängen, die bei der B-CLL gestört sind.

c) Stammzell-Transkriptionsfaktoren haben über die Vermittlung von Signaltransduktionsmechanismen eine kritische Funktion bei der Aufrechterhaltung der sensiblen Balance zwischen Proliferation und Differenzierung. Eine Störung ihrer Funktion durch direkte Mutation oder indirekte Veränderung der Expression kann zur Leukämogenese führen (Gomes et al. 2002).

DMRT2 wurde erstmals von Raymond et al. (1999) publiziert, nachdem es per Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung auf Chromosom 9p24.3 kartiert worden war. Das Transkript weist ebenso wie die weitgehend homologen Transkripte DMRT1 und DMRT3 (Kartierung 9p24.3) eine konservierte Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne (DM-Domäne) auf (Ottolenghi et al. 2000). Während frühe Untersuchungen die physiologische Rolle der DMRT-Genfamilie alleine in der Geschlechtsdeterminierung sahen (Muroya et al. 2000), scheint zumindest DMRT2 auch eine essenzielle Funktion innerhalb der embryonalen Somitenentwicklung einzunehmen (Seo et al. 2006). Der eigentliche Wirkmechanismus von DMRT2 als Transkriptionsfaktor ist allerdings nur unzureichend verstanden, v. a. gibt es keinerlei weiterführende Untersuchungen bzgl. seiner nachgewiesenen Expression in der humanen hämatopoetischen Stammzelle. DMRT1 wurde neuerdings durch zytogenetische Untersuchungen und Expressionsanalysen an spermatozytischen Seminomen als Kandidatengen identifiziert (Looijenga et al. 2006). Dies könnte ein Hinweis für eine Bedeutung der DMRT-Genfamilie in der Tumorigenese sein. Meng et al. (1999) fanden heraus, dass eine Überexpression des *terra*-Gens beim Zebrafisch, welches auch eine konservierte DM-Domäne enthält, den apoptotischen Zelluntergang *in vitro* und *in vivo* induziert. Ein Kennzeichen der chronischen lymphatischen Leukämie wiederum ist die Akkumulation reifer B-Zellen, die sich dem programmierten Zelltod entziehen konnten (Caligaris-Cappio und Hamblin 1999). Möglicherweise spielt DMRT2 auf diese Weise eine bedeutende Rolle im Zellzyklus der B-Zellen und weiterführende Analysen sollten dessen putative Bedeutung bei der Leukämogenese dahingehend untersuchen.

4.2.3 Weitere Transkripte innerhalb der Kandidatenregion 9p24.3 und die besondere Rolle der miRNAs

In Abb. 29 wurden per *in-silico*-Analyse identifizierte Transkripte innerhalb der eingegrenzten Kandidatenregion 9p24.3 dargestellt. Über die übergeordnete physiologische Funktion sowie das genaue Expressionsmuster treffen die Datenbanken keine Aussage. Die Anordnung von CpG-Inseln, ESTs sowie Genvorhersagen sagt aber das Vorliegen

codierender Sequenz in diesem Bereich voraus, die durch die Translokation unterbrochen ist.

Mithilfe einer Datenbankanalyse wurden die eingegrenzten Bruchpunktregionen speziell auch auf das Vorhandensein von Sequenzen untersucht, die als Matrize für sogenannte miRNAs dienen. Diese kurzen hochkonservierten RNA-Moleküle scheinen eine wichtige Komponente der Genexpression zu sein, indem sie als Antisense-Regulatoren an komplementäre Sequenzen der mRNA eines Zielgens binden und dadurch die Translation temporär und gewebespezifisch hemmen (Ambros 2004). In jüngster Zeit wird den miRNAs bei der humanen Tumorigenese und v. a. auch bei der Pathogenese der B-CLL eine bedeutsame Rolle zugeschrieben (Calin et al. 2004). So fanden die Autoren heraus, dass die Expression der auf Chromosom 13q14.3 lokalisierten miRNAs *miR-15a* und *miR-16-1* in etwa 65 % der B-CLL-Fälle durch Deletionen oder Translokationen herunter reguliert ist. Dieser Befund korreliert invers mit einer Überexpression von *BCL2* (*B cell lymphoma 2*) in den malignen Zellen. Mittlerweile wurde an kultivierten Zellen herausgefunden, dass die Expression von *BCL2* posttranslational durch den *miR-15a/miR-16-1*-Komplex herunter reguliert wird (Cimmino et al. 2005). Da *BCL2* wiederum als ein zentraler Inhibitor der Apoptose beschrieben ist (Cory und Adams 2002), wurde hiermit ein bedeutsamer Pathway der Apoptoseregulation entdeckt, in dem miRNA-Moleküle als gegen *BCL2* gerichtete Tumorsuppressorgene in die zelluläre Signaltransduktion eingreifen. Zwei weitere wichtige miRNAs scheinen *miR-29* und *miR-181* zu sein, die *TCL1* (*T-cell leukemia/lymphoma 1*) regulieren (Pekarsky et al. 2006). Das Protoonkogen *TCL1* ist ein Koaktivator des *AKT*-Onkogens, welches die Transduktion antiapoptotischer Signale triggert (Laine et al. 2000) und wird besonders bei den aggressiven Formen der B-CLL mit unmutiertem IgV_H -Status überexprimiert (Herling et al. 2006).

In den Kandidatenregionen der vorliegenden Translokation konnten keine miRNA-spezifischen Sequenzen detektiert werden, was aber das Vorhandensein eines miRNA-Zielgens in diesem Bereich nicht ausschließt.

4.2.4 Positionseffekte

Darnell (1982) postulierte, dass Transkriptionsfaktoren die zentrale Rolle bei der Regulation der normalen Entwicklung eukaryotischer Organismen spielen, da die Genregulation in Entwicklungsprozessen vor allem auf dem Level der Transkription erfolge. Der

Erkenntnisgewinn der letzten Jahre hat aber dazu beigetragen, die Expression von Genen heutzutage komplexer zu betrachten. Mögliche Auswirkungen auf die Expression der von den Bruchpunkten physikalisch entfernten Gene könnte demnach auch ein sogenannter Positionseffekt haben. Dieses Phänomen wird definiert als deletäre Alteration auf der Stufe der Expression eines Gens, verursacht durch Herauslösen des Gens aus seinem ursprünglichen chromosomalen Kontext, ohne dass eine das Gen betreffende Mutation oder Deletion festzustellen wäre (Kleinjan und van Heyningen 1998). Die Autoren haben mögliche Mechanismen vorgeschlagen, die zur Veränderung der Genexpression durch solch einen Positionseffekt führen könnten:

- a) Das Kandidatengen wird von seiner Promotor- bzw. Enhancer/Silencer-Region separiert. Dieser Mechanismus wurde im Zusammenhang mit dem Kandidatengen DMRT2 weiter oben diskutiert (vgl. Abb. 30).
- b) Das Kandidatengen gelangt durch Juxtaposition unter die Kontrolle des Promotors bzw. Enhancers/Silencers eines anderen Gens.
- c) Konkurrenz mit einem anderen Gen um einen Enhancer.
- d) Positionseffekt-Variegation, d. h. die Beeinflussung der Genexpression durch Verlagerung in eine differente Chromatinumgebung (Euchromatin→Heterochromatin).

Besonders die unter (d) aufgeführte Variegation, die erstmals bei *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde (Schultz 1936), wurde intensiv untersucht und mittlerweile eine Reihe von Fällen publiziert, die den Einfluss von Positionseffekten bei balancierten Chromosomenanomalien aufzeigen, die mit eindeutig definierten, monogenen Erkrankungen assoziiert sind. Dazu gehören z. B. die Aniridie (Fantès et al. 1995), das Rieger-Syndrom (Flomen et al. 1998) und die Holoprosenzephalie (Roessler et al. 1997). Die Bruchpunkte liegen dabei entweder in 3'- oder 5'-Position zu dem betroffenen Gen. Die längste bislang beschriebene physikalische Bruchpunktdistanz beträgt 1,3 Mb stromabwärts des SOX9-Genes bei der Campomelischen Dysplasie (Velagaleti et al. 2005). Hierbei handelt es sich um einen weiteren Mechanismus eines Positionseffektes, bei dem es durch die Unterbrechung eines distalen cis-regulatorischen Elementes wahrscheinlich zu einer signifikanten Beeinflussung der Genexpression mit der Folge einer quasi Haploinsuffizienz gekommen ist.

Vor dem Hintergrund dieser möglichen Positionseffekte sollen im Folgenden Kandidatengene diskutiert werden, die in einem Bereich von ca. 2 Megabasen um die Bruchstellen kartieren (Tab. 5, 6). Über die physiologische Funktion der meisten Transkripte ist bislang nur sehr wenig, teilweise überhaupt nichts bekannt und eine Assoziation zu dem hier untersuchten Phänotyp daher nur eingeschränkt möglich.

Tab. 5: Datenbankeinträge von bisher identifizierten Genen, die in einem Bereich von ca. 2 Mb um den Bruchpunkt auf Chromosom 6p12 lokalisiert sind.

Status: P=provisorische Geninformation, V=validated/gültig, R=reviewed/überprüft.

Gen-Symbol	Position/Klon	Status	Name/Beschreibung	Referenz
C6orf142	6p12.1/ RP11-362K18	P	chromosome 6 open reading frame 142	GenelD: 90523
TINAG	6p12.1	P	tubulointerstitial nephritis antigen (Membran-Glykoprotein)	OMIM *606749
FAM83B	6p12.1	V	family with sequence similarity 83, member B	GenelD: 222584
HCRTR2	6p12.1/ RP11-399A15	R	hypocretin (orexin) receptor 2 (G-Protein-gekoppelter Rezeptor für die Neuropeptide Orexin A/B → ZNS-Regulation der Nahrungsaufnahme)	OMIM *602393
GFRAL	6p12.1	V	GDNF family receptor alpha like	GenelD: 389400
HMGCLL1	6p12.1	V	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzym A lyase-like 1	GenelD: 54511
BMP5	6p12.1/ RP11-120K22	R	bone morphogenetic protein 5 (Signalmolekül der TGFβ-Superfamilie)	OMIM *112265
COL21A1	6p12.1	R	collagen type XXI alpha 1 (FACIT collagen family → Integrität extrazellulärer Matrix)	OMIM *610002

COL21A1 codiert für die Alpha-Kette von Kollagen XXI, welches für die Integrität der extrazellulären Matrix verantwortlich sein könnte (Chou und Li 2002). Microarray-Analysen zeigen seine Expression im Knochenmark (Su et al. 2004) und somit wäre eine Interaktion mit der hämatopoetischen Stammzelle bei der Pathogenese hämatologischer Neoplasien denkbar. BMP5 wird als Wachstums- und Differenzierungsfaktor bei der Progression verschiedener Tumoren variabel reguliert. Beim Prostatakarzinom konnte durch FISH-Analysen an Tumorgewebe eine Überexpression des Locus beobachtet werden (Doak et al. 2007). HCRTR2 ist auf dem bruchpunktüberspannenden Klon *RP11-399A15* lokalisiert, entsprechend der weiteren Eingrenzung des 6p12.1-Bruchpunktes kartiert es 48 kb entfernt (vgl. Abb. 30). Eine physiologische Funktion wird im Rahmen der zentralnervösen Regulation der Nahrungsaufnahme beschrieben (Sakurai et al.

1998) und es besteht die Assoziation eines Sequenzpolymorphismus mit dem familiären Cluster-Kopfschmerz (Rainero et al. 2004). Kaneta et al. (2003) entdeckten darüber hinaus, dass HCRTR2 in CML-Zellen hochgradig überexprimiert wird.

Im 2-Mb-Bereich um den 9p24.3-Bruchpunkt finden sich allein sechs Gene mit konservierten Transkriptionsfaktor-Domänen.

Tab. 6: Auflistung von bisher identifizierten Genen, die in einem Bereich von ca. 2 Mb um den Bruchpunkt auf Chromosom 9p24 lokalisiert sind.

Legende: s. o.

Gen-Symbol	Position/Klon	Status	Name/Beschreibung	Referenz
FLJ00038	9p24.3	V	CXYorf1-related protein	GeneID: 375690
FOXD4	9p24.3	P	forkhead box D4 (Transkriptionsfaktor)	OMIM *601092
CBWD1	9p24.3	V	COBW domain containing 1	OMIM *611078
DOCK8	9p24.3	V	dedicator of cytogenesis 8 (Tumorsupressorgen beim Bronchialkarzinom?)	GeneID: 81704
ANKRD15	9p24.3/ RP11-130C19	R	ankyrin repeat domain 15 (Tumorigenese Nierenzellkarzinom?)	OMIM *607704
DMRT1	9p24.3/ RP11-143M15	R	doublesex and mab3-related transcription factor 1 (Transkriptionsfaktor mit Zink-Finger-Domäne → konservierte Komponente der Geschlechtsdeterminierung bei Vertebraten)	OMIM *602424
DMRT3	9p.243/ RP11-143M15	P	doublesex and mab3-related transcription factor 3 (Genfamilie, s. o.)	GeneID: 58524
DMRT2	9p24.3/ RP11-147I11	P	doublesex and mab3-related transcription factor 2 (Genfamilie, s. o.)	OMIM *604935

FOXD4 gehört zur Familie der FOX-Transkriptionsfaktoren (*forkhead/winged helix box*), deren Domäne ursprünglich über eine Homologie zu einem Gen von *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde (Weigel und Jäckle 1990). Freyaldenhoven et al. (2002) detektierten zwei Transkripte des FOXD4-Gens in menschlichen Leukämie-Zelllinien und CD34-Progenitorzellen. Mit dem Wissen um die Bedeutung der FOX-Transkriptionsfaktoren in diversen biologischen Prozessen (Lai et al. 1993), aber auch bei der Karzinogenese (Li und Vogt 1993, Galili et al. 1993), sind sie demnach ebenso Kandidaten bei der Leukämogenese.

Die Transkriptionsfaktoren DMRT1, DMRT3 und vor allem DMRT2 wurden weiter oben ausführlich diskutiert.

Zwei Gene im unmittelbaren Bereich des 9p24.3-Bruchpunktes haben offensichtlich eine Tumorsupressorfunktion. Zum einen ist dies DOCK8, welches für ein Mitglied der DOCK (*dedicator of cytotogenesis*)-Proteinfamilie codiert (Ruusala und Aspenstrom 2004), die als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren Migration, Morphologie, Adhäsion und Wachstum von Epithelzellen regulieren (Cote und Vuori 2002). Takahashi et al. (2006) beschreiben eine homozygote Deletion und reduzierte Expression von DOCK8 in einer Lungen-, Magen- und Brustkrebszelllinie. Zum anderen scheint ANKRD15 (*ankyrin repeat domain 15*) als Tumorsupressorgen in die Tumorigenese des Nierenzellkarzinoms involviert zu sein (Sarkar et al. 2002). Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen – zu denen auch die B-CLL gehört – tragen wiederum ein signifikant erhöhtes Risiko, zusätzlich an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken (relatives Risiko=1,86 in einer Studie mit großer Fallzahl von Anderson et al. 1998). Unter den bislang beschriebenen Fällen (122 Patienten in 11 Studien; Übersicht bei Kunthur et al. 2006) finden sich auch Histologien einer chronisch lymphoiden Leukämie (Nishikubo et al. 1996, Kunthur et al. 2006). Frühere epidemiologische Arbeiten (Travis et al. 1991) sahen die Gründe für den Zweittumor nach primärem Lymphom vor allem in den Folgen der Zytostatika- und Strahlentherapie. Die Tatsache aber, dass Lymphom und Nierenzellkarzinom nicht nur nacheinander, sondern in 27 % der Fälle (Kunthur et al. 2006) auch koinzident auftraten, einige Patienten gar keine derartige Therapie erhielten und sich schließlich in der Literatur bislang kein Anhalt dafür findet, dass die Pathogenese von Nierenzellkarzinomen durch eine Radiochemotherapie gefördert wird, wirft die Frage nach einer gemeinsamen genetischen Prädisposition für beide Malignitäten auf. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit könnte dies z. B. eine Mutation im ANKRD15-Gen sein.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine mit B-CLL assoziierte Translokation t(6;9)(p12;p24) durch FISH-Analysen auf molekularer Ebene charakterisiert. Die hochauflösenden physikalischen Karten aus Bruchpunkt-überspannenden BAC-Klonen und deren *long range* PCR-Subfragmenten grenzen die Kandidatenregionen für beide Bruchstellen auf 11 kb (6p12.1) bzw. 8 kb (9p24.3) ein und schließen eine direkte, translokationsbedingte Unterbrechung der kodierenden Sequenz eines bislang bekannten Gens aus. Die Grenzen der Identifizierung von Krankheitsgenen über die reine Kartierungsanalyse chromoso-

maler Bruchstellen mittels molekularzytogenetischer Verfahren (FISH) bei Patienten mit auffälligem Phänotyp werden jedoch gesteckt durch

a) die Möglichkeit, dass die Chromosomenanomalie in Wirklichkeit nicht balanciert ist, sondern jenseits des Auflösungsvermögens der FISH Mikrodeletionen bzw. Duplikationen vorliegen (→4.1.4) und

b) den Zufall (Koinzidenz von Chromosomenanomalie und anomalem Phänotyp ohne kausalen Zusammenhang).

Es liegt nahe, dass die chronische lymphatische Leukämie nicht durch die Alteration eines singulären Gens hervorgerufen werden kann, sondern es durch ein heterogenes Zusammenspiel multipler Faktoren zu einer Störung des lymphatischen Zellzyklus kommt. In diesem Hinblick muss auch auf Möglichkeit epigenetischer Veränderungen hingewiesen werden, die bei der B-CLL in Form eines gestörten Methylierungsmusters der CpG-Inseln im Promotorbereich diverser Kandidatengene eine Rolle zu spielen scheinen (Yu 2006). Letztendlich muss die pathogenetische Rolle putativer Kandidatengene mit Hilfe funktioneller Analysen weiter untersucht werden.

Für die Kandidatenregion auf Chromosom 9p24.3 ließen sich einige bislang nicht näher untersuchte Transkripte identifizieren, deren Expression durch die Translokation direkt beeinflusst sein könnte. Dabei ist zu beachten, dass die durchgeführte *in-silico*-Analyse der experimentell ermittelten Bruchpunktregionen lediglich die in den öffentlich zugänglichen Datenbanken enthaltenen Informationen wiedergibt. Vor allem die Algorithmen von Programmen zum Auffinden von Transkripten innerhalb des Genoms sind nicht fehlerfrei und können zu falsch-positiven Ergebnissen führen, die der experimentellen Kontrolle nicht standhalten (Reymond et al. 2002). Danach versagen Genvorhersagen mitunter auch dort, wo kurze Exons und/oder Gene mit ungewöhnlich langen 5'- und/oder 3'-untranslatierten Regionen vorliegen.

Zur Validierung und Vervollständigung der präsentierten Transkriptkarten bietet sich das gezielte Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken – zunächst etwa aus hämatopoetischem oder lymphatischem Gewebe – mit den Klonen aus der Kandidatenregion als Sonden an. Des Weiteren sollten die mit den ESTs innerhalb der eingegrenzten Bruchpunktregion 9p24.3 korrespondierenden cDNAs in voller Länge sequenziert, ihre ge-

nomische Anordnung erneut überprüft und ggf. das Expressionsmuster bestimmt werden.

Eine weitere Eingrenzung der Bruchpunktregionen kann über Restriktionsanalysen mit selten schneidenden Enzymen des in Frage kommenden genomischen Bereichs beim Patienten erfolgen. Die anschließende Identifizierung aberranter Fragmente mittels Southern Blot würde die Bruchpunktregionen noch einmal einengen und einer Sequenzierung zugänglich machen. Über die letztendliche Sequenz der Bruchstellen ließe sich die absolute Balanciertheit der Translokation letztendlich beweisen oder widerlegen. Schneller und effektiver dafür nutzbar ist die vergleichende Genomhybridisierung (CGH) auf Microarrays, die durch ein umfassendes Screening des Genoms auch assoziierte chromosomale Rearrangements aufdecken kann und damit der häufigen Komplexität struktureller genomischer Erkrankungen gerecht wird (→4.1.4).

Für DMRT2 sollten wegen seiner unmittelbaren physikalischen Nähe zum 9p24.3-Bruchpunkt und der nachgewiesenen Expression in der hämatopoetischen Stammzelle weiterführende Expressionsanalysen in hämatopoetischem und lymphatischem Gewebe durchgeführt und mit der Expression beim vorliegenden Patienten und evtl. anderen an B-CLL erkrankten Patienten verglichen werden. Gleiches gilt für das Tumorsupressorgen ANKRD15. Hier bieten sich derartige funktionelle Analysen vor allem bei Patienten an, die in ihrer Anamnese ein Nierenzellkarzinom sowie eine lymphatische Neoplasie aufweisen (→4.2.4). Da die Beteiligung beider Gene über einen Positionseffekt zu erklären wäre, sollte die genomische Sequenz der Bruchpunktregionen auch auf das Vorhandensein putativer regulatorischer Elemente untersucht werden.

Diese Anätze ermöglichen die vorliegende Phänotyp-Genotyp-Beziehung im Hinblick auf die Identifizierung neuer pathogenetischer Faktoren für die chronische lymphatische Leukämie weiter zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Die molekularzytogenetische Bruchpunktkartierung mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bei Patienten mit balancierten Chromosomenanomalien ist ein potentes Instrument zur positionsspezifischen Identifizierung menschlicher Krankheitsgene. In vielen Fällen kartieren die Bruchpunkte innerhalb oder nahe eines putativen Kandidatengens und beeinflussen dessen Expression. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine derartige molekulare Charakterisierung bei einem 71-jährigen Patienten mit chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie und einer konstitutionellen, in der Literatur bislang nicht beschriebenen, balancierten Translokation $t(6;9)(p12;p24)$ durchgeführt. B-CLL ist eine häufige hämatologische Neoplasie und obwohl Alterationen verschiedener Loci bereits identifiziert und als Prognosefaktoren etabliert wurden, bleibt die Suche nach krankheitsverursachenden Genen eine Herausforderung. FISH-Analysen auf Metaphasenchromosomen des Patienten wurden mit 15 BAC-Klonen spezifisch für den kurzen Arm von Chromosom 6 (6p12) und 12 BACs für 9p24 realisiert. *RP11-399A15* (6p12.1) und *RP11-147I11* (9p24.3) konnten aufgrund gesplitteter Hybridisierungssignale auf beiden derivativen Chromosomen als Bruchpunkt-überspannende Klone identifiziert werden. Zur weiteren Eingrenzung beider Bruchpunkte wurden 4 Subfragmente dieser Klone mittels *long range* PCR generiert und in FISH-Analysen eingesetzt. Ein 11-kb-Fragment abgeleitet von *RP11-399A15* überspannt den 6p12.1-Bruchpunkt und ein 12-kb-Fragment von *RP11-147I11* sowie ein cDNA-Klon für den Transkriptionsfaktor DMRT2 kartieren den 9p24.3-Bruchpunkt innerhalb von 8 kb stromaufwärts vom 5'-Ende von DMRT2 in dessen putativer Promotorregion. Datenbankanalysen sehen kein bekanntes Gen durch die Translokation unterbrochen. Möglicherweise hat der Translokationsprozess Einfluss auf die Genexpression in Bruchpunktnähe (z. B. DMRT2) oder sogar in größerer Entfernung (Positionseffekt). JAK2, welches in die Tumorigenese hämatologischer Neoplasien involviert ist, kartiert mit etwa 4 Mb zu weit vom 9p24.3-Bruchpunkt entfernt, um ein kritisches Kandidatengens zu sein. Weitere potenzielle Kandidatengene sowie Genvorhersagen und ESTs konnten den Bruchpunktregionen und der unmittelbaren Umgebung zugeordnet werden und sollten funktionellen Analysen unterzogen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abeyasinghe SS, Stenson PD, Krawczak M, Cooper DN: Gross Rearrangement Breakpoint Database (GRaBD). *Hum Mutat* 23 (2004) 219–221
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (1990) 403–410
- Ambros V: The functions of animal microRNAs. *Nature* 431 (2004) 350–355
- Anderson CM, Puzstai L, Palmer JL, Cabanillas F, Ellerhorst JA: Coincident renal cell carcinoma and non-Hodgkin's lymphoma: the M. D. Anderson experience and review of the literature. *J Urol* 159 (1998) 714–716
- Ashurst JL, Chen CK, Gilbert JG, Jekosch K, Keenan S, Meidl P, Searle SM, Stalker J, Storey R, Trevanion S, Wilming L, Hubbard T: The Vertebrate Genome Annotation (Vega) database. *Nucleic Acids Res* 33(Database issue) (2005) D459–65
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y: Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281 (1998) 1674–1677
- Barnes WM: PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 2216–2220
- Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, Scherer SW: Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14 (1996) 353–356
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48 (1981) 198–206
- Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (1979) 1513–1523
- Blyth K, Cameron ER, Neil JC: The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 376–387
- Blyth K, Terry A, Mackay N, Vaillant F, Bell M, Cameron ER, Neil JC, Stewart M: Runx2: a novel oncogenic effector revealed by in vivo complementation and retroviral tagging. *Oncogene* 20 (2001) 295–302
- Bugge M, Bruun-Petersen G, Brøndum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G, Jensen PK, Kristoffersson U, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen KR, Rasmussen K, Tommerup N: Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man. *J Med Genet* 37 (2000) 858–865
- Burge C, Karlin S: Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* 268 (1997) 78–94
- Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ: B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 17 (1999) 399–408
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM: Human microRNA genes are frequently located at

- fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 2999–3004
- Carle GF, Frank M, Olson MV: Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 232 (1986) 65–68
- Casey R, Brennan P, Becker N, Boffetta P, Cocco P, Domingo-Domenech E, Foretova L, Nieters A, de Sanjosé S, Staines A, Vornanen M, Maynadie M: Influence of familial cancer history on lymphoid neoplasms risk validated in the large European case-control study epilymph. *Eur J Cancer* 42 (2006) 2570–2576
- Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R: Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 5695–5699
- Cheung VG et al; BAC Resource Consortium: Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature* 409 (2001) 953–958
- Chou MY, Li HC: Genomic organization and characterization of the human type XXI collagen (COL21A1) gene. *Genomics* 79 (2002) 395–401
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2005) 13944–13949
- Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L: An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod* 9 (1994) 1328–1332
- Collins FS, McKusick VA: Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA* 285 (2001) 540–544
- Collins FS: Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1 (1992) 3–6
- Cory S, Adams JM: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 647–656
- Cote JF, Vuori K: Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci* 115 (2002) 4901–4913
- Darnell JE: Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 297 (1982) 365–371
- Doak SH, Jenkins SA, Hurlle RA, Varma M, Hawizy A, Kynaston HG, Parry JM: Bone morphogenic factor gene dosage abnormalities in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 176 (2007) 161–165
- Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S: p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 85 (1995) 1580–1589
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343 (2000) 1910–1916
- Fantes J, Ragge NK, Lynch SA, McGill NI, Collin JR, Howard-Peebles PN, Hayward C, Vivian AJ, Williamson K, van Heyningen V, Fitzpatrick DR: Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* 33 (2003) 461–473

- Fantes J, Redeker B, Breen M, Boyle S, Brown J, Fletcher J, Jones S, Bickmore W, Fukushima Y, Mannens M et al.: Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Hum Mol Genet* 4 (1995) 415–422
- Flomen RH, Vatcheva R, Gorman PA, Baptista PR, Groet J, Barisić I, Ligutic I, Nizetić D: Construction and analysis of a sequence-ready map in 4q25: Rieger syndrome can be caused by haploinsufficiency of RIEG, but also by chromosome breaks approximately 90 kb upstream of this gene. *Genomics* 47 (1998) 409–413
- Francke U, Oliver N: Quantitative analysis of high resolution trypsin-Giemsa bands on human prometaphase chromosomes. *Hum Genet* 45 (1978) 137–165
- Freyaldenhoven BS, Fried C, Wielckens K: FOXD4a and FOXD4b, two new winged helix transcription factors, are expressed in human leukemia cell lines. *Gene* 294 (2002) 131–140
- Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R: p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 5413–5417
- Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJI, Emanuel BS, Rovera G, Barr FG: Fusion of a fork head domain to PAX-3 in the solid tumor alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* 5 (1993) 230–235
- Gardiner-Garden M, Frommer M: CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196 (1987) 261–282
- Gerhard DS et al.; MGC Project Team: The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Res* 14 (2004) 2121–2127
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI: Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken, 2006
- Gessler M, Simola KO, Bruns GA: Cloning of breakpoints of a chromosome translocation identifies the AN2 locus. *Science* 244 (1989) 1575–1578
- Goldman JM, Melo JV: Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 349 (2003) 1451–1464
- Gomes I, Sharma TT, Edassery S, Fulton N, Mar BG, Westbrook CA: Novel transcription factors in human CD34 antigen-positive hematopoietic cells. *Blood* 100 (2002) 107–119
- Gomes I, Sharma TT, Mahmud N, Kapp JD, Edassery S, Fulton N, Liang J, Hoffman R, Westbrook CA: Highly abundant genes in the transcriptome of human and baboon CD34 antigen-positive bone marrow cells. *Blood* 98 (2001) 93–99
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP: The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet* 42 (2005) 8–16
- Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, Wörmann B, Haase D, Bohlander SK: A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 44 (2005) 329–333

- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ: miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34 (Database issue) (2006) D140–144
- Griffiths-Jones S: The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32 (Database issue) (2004) D109–11
- Gunz FW, Gunz JP, Veale AM, Chapman CJ, Houston IB: Familial leukaemia: a study of 909 families. *Scand J Haematol* 15 (1975) 117–131
- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC: Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250 (1990) 1684–1689
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK: Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94 (1999) 1848–1854
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 10 (1999) 1419–1432
- Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, Jones D: TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 20 (2006) 280–285
- Hill AS, MacCallum PK, Young BD, Lillington DM: Molecular cloning of a constitutional t(7;22) translocation associated with risk of hematological malignancy. *Genes Chromosomes Cancer* 38 (2003) 260–264
- Ihle JN: Cytokine receptor signalling. *Nature* 377 (1995) 591–594
- Ikegawa S, Masuno M, Kumano Y, Okawa A, Isomura M, Koyama K, Okui K, Makita Y, Sasaki M, Kohdera U, Okuda M, Koyama H, Ohashi H, Tajiri H, Imaizumi K, Nakamura Y: Cloning of translocation breakpoints associated with Shwachman syndrome and identification of a candidate gene. *Clin Genet* 55 (1999) 466–472.
- International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 (2004) 931–945
- International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (2001) 860–921
- Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, Snijders A, Albertson DG, Pinkel D, Marra MA, Ling V, MacAulay C, Lam WL: A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 36 (2004) 299–303
- Jallepalli PV, Lengauer C: Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* 1 (2001) 109–117
- Kaneta Y, Kagami Y, Tsunoda T, Ohno R, Nakamura Y, Katagiri T: Genome-wide analysis of gene-expression profiles in chronic myeloid leukemia cells using a cDNA microarray. *Int J Oncol* 23 (2003) 681–691
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D: The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12 (2002) 996–1006
- Kim UJ, Birren BW, Slepak T, Mancino V, Boysen C, Kang HL, Simon MI, Shizuya H: Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34 (1996) 213–218

- Kleinjan DJ, van Heyningen V: Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet* 7 (1998) 1611–1618
- Knight SJ, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DL, Nguyen H, Hudson TJ, Riethman HC, Ledbetter DH, Flint J: An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 67 (2000) 320–332
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352 (2005) 1779–1790
- Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S: V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100 (2002) 1410–1416
- Kumar A, Becker LA, Depinet TW, Haren JM, Kurtz CL, Robin NH, Cassidy SB, Wolff DJ, Schwartz S: Molecular characterization and delineation of subtle deletions in de novo "balanced" chromosomal rearrangements. *Hum Genet* 103 (1998) 173–178
- Kunthur A, Wiernik PH, Dutcher JP: Renal parenchymal tumors and lymphoma in the same patient: case series and review of the literature. *Am J Hematol* 81 (2006) 271–280
- Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita HA, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura Ki K, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Nii-kawa N, Matsumoto N: Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nat Genet* 30 (2002) 365–366
- Lai E, Clark KL, Burley SK, Darnell JE: Hepatocyte nuclear factor 3/fork head or "winged helix" proteins: a family of transcription factors of diverse biological function. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 10421–10423
- Laine J, Künstle G, Obata T, Sha M, Noguchi M: The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell* 6 (2000) 395–407
- Lese CM, Fantes JA, Riethman HC, Ledbetter DH: Characterization of physical gap sizes at human telomeres. *Genome Res* 5 (1999) 225–232
- Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y: AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics* 23 (1994) 425–432
- Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland DG, Druker B, Deininger MW: The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106 (2005) 3377–3379
- Li J, Vogt PK: The retroviral oncogene qin belongs to the transcription factor family that includes the homeotic gene fork head. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 4490–4494
- Liang F, Holt I, Pertea G, Karamycheva S, Salzberg SL, Quackenbush J: Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nat Genet* 25 (2000) 239–240
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80 (1988) 224–234

- Looijenga LH, Hersmus R, Gillis AJ, Pfundt R, Stoop HJ, van Gurp RJ, Veltman J, Beverloo HB, van Drunen E, van Kessel AG, Pera RR, Schneider DT, Summersgill B, Shipley J, McIntyre A, van der Spek P, Schoenmakers E, Oosterhuis JW: Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene. *Cancer Res* 66 (2006) 290–302
- Mansouri MR, Carlsson B, Davey E, Nordenskjöld A, Wester T, Annerén G, Läckgren G, Dahl N: Molecular genetic analysis of a de novo balanced translocation t(6;17)(p21.31;q11.2) associated with hypospadias and anorectal malformation. *Hum Genet* 119 (2006) 162–168
- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D: The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 8 (1994) 1640–1645
- Meng A, Moore B, Tang H, Yuan B, Lin S: A Drosophila doublesex-related gene, terra, is involved in somitogenesis in vertebrates. *Development* 126 (1999) 1259–1268
- Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM: Inhibition of acute lymphoblastic leukemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379 (1996) 645–648
- Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS: Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107 (2006) 265–76
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR: Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89 (1997) 773–779
- Muroya K, Okuyama T, Goishi K, Ogiso Y, Fukuda S, Kameyama J, Sato H, Suzuki Y, Terasaki H, Gomyo H, Wakui K, Fukushima Y, Ogata T: Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000) 3094–3100
- Nishikubo CY, Kunkel LA, Figlin R, Belldgrun A, Rosen P, Elashoff R, Wang H, Territo MC: An association between renal cell carcinoma and lymphoid malignancies. A case series of eight patients. *Cancer* 78 (1996) 2421–2326
- Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C, Frengen E, Zeng C, Catanese JJ, de Jong PJ: A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome Res* 11 (2001) 483–496
- Ottolenghi C, Veitia R, Barbieri M, Fellous M, McElreavey K: The human doublesex-related gene, DMRT2, is homologous to a gene involved in somitogenesis and encodes a potential bicistronic transcript. *Genomics* 64 (2000) 179–186
- Ottolenghi C, Veitia R, Quintana-Murci L, Torchard D, Scapoli L, Souleyreau-Therville N, Beckmann J, Fellous M, McElreavey K: The region on 9p associated with 46,XY sex reversal contains several transcripts expressed in the urogenital system and a novel doublesex-related domain. *Genomics* 64 (2000) 170–178
- Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, Monpoux F, van Rompaey L, Baens M, van den Berghe H, Marynen P: Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 90 (1997) 2535–2540

- Pekarsky Y, Calin GA, Aqeilan R: Chronic lymphocytic leukemia: molecular genetics and animal models. *Curr Top Microbiol Immunol* 294 (2005) 51–70
- Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM: Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 66 (2006) 11590–11593
- Pichon B, Vankerckhove S, Bourrouillou G, Duprez L, Abramowicz MJ: A translocation break-point disrupts the ASPM gene in a patient with primary microcephaly. *Eur J Hum Genet* 12 (2004) 419–421
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J: Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) 9138–9142
- Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1986) 2934–2938
- Praphanphoj V, Goodman BK, Thomas GH, Niel KM, Toomes C, Dixon MJ, Geraghty MT: Molecular cytogenetic evaluation in a patient with a translocation (3;21) associated with blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome (BPES). *Genomics* 65 (2000) 67–69
- Pritchard MA, Baker E, Callen DF, Sutherland GR, Wilks AF: Two members of the JAK family of protein tyrosine kinases map to chromosomes 1p31.3 and 9p24. *Mamm Genome* 3 (1992) 36–38
- Rainero I, Gallone S, Valfrè W, Ferrero M, Angilella G, Rivoiro C, Rubino E, De Martino P, Savi L, Ferrone M, Pinessi L: A polymorphism of the hypocretin receptor 2 gene is associated with cluster headache. *Neurology* 63 (2004) 1286–1288
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ: ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 351 (2004) 893–901
- Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D: A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet* 8 (1999) 989–996
- Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, Berger U, Telford N, Aruliah S, Yin JA, Vanstraelen D, Barker HF, Taylor PC, O'Driscoll A, Benedetti F, Rudolph C, Kolb HJ, Hochhaus A, Hehlmann R, Chase A, Cross NC: The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res* 65 (2005) 2662–2667
- Reymond A, Camargo AA, Deutsch S, Stevenson BJ, Parmigiani RB, Ucla C, Bettoni F, Rossier C, Lyle R, Guipponi M, de Souza S, Iseli C, Jongeneel CV, Bucher P, Simpson AJ, Antonarakis SE: Nineteen additional unpredicted transcripts from human chromosome 21. *Genomics* 79 (2002) 824–832
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113 (1977) 237–251

- Roessler E, Ward DE, Gaudenz K, Belloni E, Scherer SW, Donnai D, Siegel-Bartelt J, Tsui LC, Muenke M: Cytogenetic rearrangements involving the loss of the Sonic Hedgehog gene at 7q36 cause holoprosencephaly. *Hum Genet* 100 (1997) 172–181
- Rotman G, Shiloh Y: ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet* 7 (1998) 1555–1563
- Rozen S, Skaletsky HJ: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds): *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, 2000, S. 365–386
- Ruusala A, Aspenstrom P: Isolation and characterisation of DOCK8, a member of the DOCK180-related regulators of cell morphology. *FEBS Lett* 572 (2004) 159–166
- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G: The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 4913–4917
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (1985) 1350–1354
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M: Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92 (1998) 573–585
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (1977) 5463–5467
- Sarkar S, Roy BC, Hatano N, Aoyagi T, Gohji K, Kiyama R: A novel ankyrin repeat-containing gene (Kank) located at 9p24 is a growth suppressor of renal cell carcinoma. *J Biol Chem* 277 (2002) 36585–36591
- Sawyers CL: Chronic myeloid leukaemia. *N Engl J Med* 340 (1999) 1330–1340
- Schultz J: Variegation in *Drosophila* and the Inert Chromosome Regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 22 (1936) 27–33
- Schwartz DC, Cantor CR: Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient electrophoresis. *Cell* 37 (1984) 65–75
- Selzer RR, Richmond TA, Pofahl NJ, Green RD, Eis PS, Nair P, Brothman AR, Stallings RL: Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 44 (2005) 305–319
- Seo KW, Wang Y, Kokubo H, Kettlewell JR, Zarkower DA, Johnson RL: Targeted disruption of the DM domain containing transcription factor *Dmrt2* reveals an essential role in somite patterning. *Dev Biol* 290 (2006) 200–210
- Stankiewicz P, Lupski JR: Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 18 (2002) 74–82
- Starostik P, Manshouri T, O'Brien S, Freireich E, Kantarjian H, Haidar M, Lerner S, Keating M, Albitar M: Deficiency of the ATM protein expression defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 58 (1998) 4552–4557

- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB: A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 6062–6067
- Takahashi K, Kohno T, Ajima R, Sasaki H, Minna JD, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J: Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int J Oncol* 28 (2006) 321–328
- The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 329 (1993) 987–994
- Tosi S, Scherer SW, Giudici G, Czepulkowski B, Biondi A, Kearney L: Delineation of multiple deleted regions in 7q in myeloid disorders. *Genes Chromosomes Cancer* 25 (1999) 384–392
- Trask BJ: DNA sequence localization in metaphase and interphase cells by fluorescence in situ hybridization. *Methods Cell Biol* 35 (1991) 3–35
- Travis LB, Curtis RE, Boice JD, Hankey BF, Fraumeni JF: Second cancers following non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 67 (1991) 2002–2009
- Van Ommen GJ, Breuning MH, Raap AK: FISH in genome research and molecular diagnostics. *Curr Opin Genet Dev* 5 (1995) 304–308
- Velagaleti GV, Bien-Willner GA, Northup JK, Lockhart LH, Hawkins JC, Jalal SM, Withers M, Lupski JR, Stankiewicz P: Position effects due to chromosome breakpoints that map approximately 900 Kb upstream and approximately 1.3 Mb downstream of SOX9 in two patients with campomelic dysplasia. *Am J Hum Genet* 76 (2005) 652–662
- Verma A, Kambhampati S, Parmar S, Plataniias LC: Jak family of kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22 (2003) 423–434
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ: NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 3688–3691
- Vogelstein B, Gillespie D: Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 (1979) 615–619
- Warburton D: De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 49 (1991) 995–1013
- Weigel D, Jäckle H: The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors. *Cell* 63 (1990) 455–456
- Wendtner CM, Eichhorst BF, Hallek MJ: Advances in chemotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 41 (2004) 224–233
- Wessendorf S, Barth TF, Viardot A, Mueller A, Kestler HA, Kohlhammer H, Lichter P, Bentz M, Döhner H, Möller P, Schwaenen C: Further delineation of chromosomal consensus regions in primary mediastinal B-cell lymphomas: an analysis of 37 tumor samples using high-resolution genomic profiling (array-CGH). *Leukemia* 21 (2007) 2463–2469
- Wiley JS, Dao-Ung LP, Gu BJ, Sluyter R, Shemon AN, Li C, Taper J, Gallo J, Manoharan A: A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet* 359 (2002) 1114–1119
- Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zürcher G, Ziemiecki A: Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 11 (1991) 2057–2065

- Wirth J, Nothwang HG, van der Maarel S, Menzel C, Borck G, Lopez-Pajares I, Brøndum-Nielsen K, Tommerup N, Bugge M, Ropers HH, Haaf T: Systematic characterisation of disease associated balanced chromosome rearrangements by FISH: cytogenetically and genetically anchored YACs identify microdeletions and candidate regions for mental retardation genes. *J Med Genet* 36 (1999) 271–278
- Yoshiura K, Machida J, Daack-Hirsch S, Patil SR, Ashworth LK, Hecht JT, Murray JC: Characterization of a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation t(2;19)(q11.2;q13.3) in a family with cleft lip and palate. *Genomics* 54 (1998) 231–240
- Yu MK: Epigenetics and chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 81 (2006) 864–869
- Yue Y, Grossmann B, Holder SE, Haaf T: De novo t(7;10)(q33;q23) translocation and closely juxtaposed microdeletion in a patient with macrocephaly and developmental delay. *Hum Genet* 117 (2005) 1–8
- Yue Y, Stout K, Grossmann B, Zechner U, Brinckmann A, White C, Pilz DT, Haaf T: Disruption of TCBA1 associated with a de novo t(1;6)(q32.2;q22.3) presenting in a child with developmental delay and recurrent infections. *J Med Genet* 43 (2006) 143–147
- Zhang MQ: Computational prediction of eukaryotic protein-coding genes. *Nat Rev Genet* 3 (2002) 698–709
- Zhang YW, Bae SC, Huang G, Fu YX, Lu J, Ahn MY, Kanno Y, Kanno T, Ito Y: A novel transcript encoding an N-terminally truncated AML1/PEBP2 alphaB protein interferes with transactivation and blocks granulocytic differentiation of 32Dcl3 myeloid cells. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 4133–4145

7 Thesen

1. Die molekulare Charakterisierung balancierter Chromosomenanomalien (Translokationen, Inversionen), die mit phänotypischen Veränderungen einhergehen, eröffnet die Möglichkeit, krankheitsassoziierte Kandidatengene zu identifizieren.
2. Mithilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) lassen sich die Bruchpunkte einer konstitutionellen Translokation $t(6;9)(p12;p24)$ bei einem Patienten mit chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie innerhalb der Chromosomenbanden 6p12.1 und 9p24.3 kartieren.
3. FISH-Analysen mit BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Klonen spezifisch für die chromosomale Region 6p12 ordnen den Translokationsbruchpunkt der DNA-Sequenz von BAC-Klon *RP11-399A15* (160 kb) zu, die das humane Gen *HCRT2* (*hypocretin/orexin receptor 2*) enthält.
4. FISH-Analysen mit BAC-Klonen spezifisch für die chromosomale Region 9p24 ordnen den Translokationsbruchpunkt der DNA-Sequenz von BAC-Klon *RP11-147I11* (173 kb) zu, die das humane Gen *DMRT2* (*doublesex and mab-3 related transcription factor*) enthält.
5. Eine molekularzytogenetische Feinkartierung der chromosomalen Bruchpunkte gelingt über FISH-Analysen mit *long range* PCR-Subfragmenten der Bruchpunkt-überspannenden Klone.
6. Ein von *RP11-399A15* amplifiziertes 11 kb *long range* PCR-Produkt überspannt den 6p12.1-Bruchpunkt. Diese Region enthält keine bekannten Gene.
7. FISH-Analysen mit einem 12 kb *long range* PCR-Fragment von *RP11-147I11* und einem cDNA-Klon für *DMRT2* kartieren den 9p24.3-Bruchpunkt maximal 8 kb stromaufwärts vom 5'-Ende von *DMRT2*, innerhalb der putativen Promotorregion dieses Gens.
8. Obwohl keine bekannten Gene durch die Translokation unterbrochen wurden, ist es möglich, dass der Translokationsprozess einen Einfluss auf die Expression nahe lokalisierter (z. B. *DMRT2*) oder sogar weiter distanzierter Gene (Positionseffekt) hat.

Lebenslauf

Jörn Rüssel

Geburtsdatum/-ort	01.08.1979 in Wesel
Anschrift	Lessingstr. 7, 06114 Halle (Saale)
E-Mail	joern.ruessel@medizin.uni-halle.de
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulbildung/Zivildienst

1986–1999	Grundschule und Gymnasium in Wesel
1999–2000	Stationäre Krankenpflege, Evangelisches Krankenhaus Wesel

Studium

10/2000–05/2007	Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/2002	Ärztliche Vorprüfung
09/2003	1. Staatsexamen
09/2005	2. Staatsexamen
09/2005–04/2006	Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Freisemester zur experimentellen Laborarbeit im Rahmen der Dissertation
04/2006–03/2007	Praktisches Jahr
05/2007	3. Staatsexamen und Approbation als Arzt

Praktisches Jahr

Innere Medizin:	Universitätsklinikum Halle (Saale), Klinik für Innere Medizin IV –Onkologie/Hämatologie Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll
Chirurgie:	Städtisches Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dölau, Klinik für Unfallchirurgie/Klinik für Allgemeinchirurgie Chefärzte: Dr. med. Lutz Lindemann-Sperfeld, Dr. med. Christian Richter

Anästhesie: Universitätsklinikum Halle (Saale), Klinik für Anästhesiologie
u. Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Radke

Famulaturen

Innere Medizin: Evangelisches Krankenhaus Wesel (2003)
Chirurgie: Gemeinschaftspraxis Dres. Steinbring/Beßelmann/von Stoltzenberg/Bürskens, Wesel (2004)
Flugmedizin: Flugmedizinisches Institut der Luftwaffe, Fürstenfeldbruck (2004)
Interdisziplinäres kardio- Herz- und Gefäßklinik Bad Neustadt, Abteilungen für Kardio-
vaskuläres Praktikum: logie, Radiologie, Herzchirurgie, Gefäßchirurgie, Anästhesio-
logie, Neurologie und Intensivmedizin (2005)

Berufliche Erfahrung

Seit 08/2007 Assistenzarzt und Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Innere Medizin IV – Onkologie/Hämatologie am Universitätsklinikum Halle (Saale)
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll

Studienbegleitende Tätigkeit/Praktische Erfahrung

12/2003–03/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Anatomie und Zellbiologie (Betreuung des Präparierkurses)
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer
09/2003–10/2003 Molekularbiologisches Praktikum am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ingo Hansmann

Halle (Saale), den 16.02.2009

Jörn Rüssel

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 16.02.2009

Jörn Rüssel

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den 16.02.2009

Jörn Rüssel

Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit

Rüssel J, Dutta U, Wand D, Hansmann I, Schlote D: Characterization of a constitutional translocation t(6;9)(p12;p24) in a patient with B-CLL. *Medgen* 19 (2007) 106

Rüssel J, Dutta U, Wand D, Schlote D, Hansmann I: The 9p24.3 breakpoint of a constitutional t(6;9)(p12;p24) in a patient with chronic lymphocytic leukemia maps close to the putative promoter region of the DMRT2 gene. *Cytogenet Genome Res* 125 (2009) 81–86

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ingo Hansmann, danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit durch Überlassung des interessanten Themas, die fachlich-kritische Unterstützung bei der Auswertung der FISH-Daten und viele bereichernde Gespräche während der Betreuung der einzelnen Arbeitsphasen. Vor allem für das mir stets entgegengebrachte Vertrauen möchte ich mich bei ihm ganz besonders bedanken.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. Dietmar Schlote für seine immer offene Tür bei der Betreuung der täglichen Arbeit an der Laborbank und der Erarbeitung des Manuskriptes.

Falko Matthes und Usha Dutta danke ich herzlich für ihre freundschaftliche Kollegialität im gemeinsamen Labor, die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei allen technischen Problemen und zahlreiche kritische Anregungen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und Medizinische Biologie gebührt großer Dank für das angenehme Arbeitsklima. Besonders aber möchte ich mich bei den Teams der humangenetischen Beratungsstelle und der Abteilung für Zytogenetik bedanken, in deren Etage ich geduldig in die Welt der Chromosomenanalyse eingeführt wurde und etliche Stunden bei der Durchführung der eigenen FISH-Analysen in sympathischer Atmosphäre verbringen durfte. Namentlich nennen möchte ich dabei in alphabetischer Reihenfolge Frau Petra Demuth, Frau Ruth Enders, Frau Uta Grasemann, Frau Dr. Christiane Höfers, Frau Dipl.-Med. Dorothea Wand und Frau Sylvia Weißflog, die mir alle auf ihre eigene Art und Weise großartig beigestanden haben.

Bei dieser Danksagung darf schließlich meine Familie nicht vergessen werden, besonders meine geliebte Frau Nicole und meine lieben Eltern, die mich auch über mein Studium hinaus innig unterstützen und mir ständig ein seelischer Rückhalt sind.